

Određivanje cinka, bakra i selena i njihova fiziološka uloga

Vuković, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:760070>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Lucija Vuković

**Određivanje cinka, bakra i seleno u
pseudožitaricama i njihova fiziološka uloga**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju „Klinička biokemija organa i organskih sustava 2“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u „Sample Control“ firmi pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Donatelle Verbanac i suvoditeljstvom dipl. ing. Anamarije Ilijaš.

Rad je napravljen u sklopu IRI projekta „Food forensics – izrada neuronskih mreža i naprednih analitičkih metoda kao alata za forenzičko ispitivanje hrane, dodataka prehrani i ljekovitog bilja“ prijavitelja SAMPLE CONTROL d. o. o. i partnera Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (KK.01.2.1.02.0142).

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	3
3. MATERIJALI I METODE.....	4
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	7
4.1. Heljda.....	7
4.2. Kvinoja.....	9
4.3. Amarant.....	11
4.4. Proso.....	13
4.5. Cink.....	16
4.5.1. Homeostaza cinka.....	16
4.5.2. Cink i imunosni sustav.....	18
4.5.3. Antioksidacijsko djelovanje cinka.....	20
4.5.4. Sadržaj cinka u pseudožitaricama.....	21
4.6. Bakar.....	22
4.6.1. Homeostaza bakra.....	22
4.6.2. Uloga bakra u enzimima.....	23
4.6.3. Bakar i antimikrobni učinak.....	25
4.6.4. Sadržaj bakra u pseudožitaricama.....	26
4.7. Selen.....	27
4.7.1. Homeostaza selena.....	27
4.7.2. Selenoproteini.....	29
4.7.3. Sadržaj selena u pseudožitaricama.....	32
5. ZAKLJUČCI.....	33
6. LITERATURA.....	34
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	39
8. PRILOZI.....	41
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD.....	45

1. UVOD

Danas, živeći u vrlo užurbanom svijetu često opterećeni svakodnevnim obavezama i nedostatkom vremena, pravilna i kvalitetna prehrana bitnija je nego ikad. Jedan je od temeljnih elemenata zdravlja na koje možemo utjecati, što izravno doprinosi cjelokupnoj kvaliteti života. Upravo iz tog razloga, osviještenost o namirnicama koje unosimo prehranom sve više raste. Stoga ne čudi da pseudožitarice, pomalo zaboravljena skupina namirnica koja u posljednjih nekoliko godina opravdano dobiva sve veću pozornost, postaje sveprisutna.

Njihov uzgoj započeo je još prije nove ere, a pojedine vrste koristile su i drevne civilizacije Maja, Inka i Azteka (Valcárce-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012). Nutritivno su bogatije od tradicionalnih žitarica, kao što su pšenica, riža i kukuruz, sadrže nešto manje ugljikohidrata, ali više proteina i lipida, kao i vitamina i minerala te topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana (Bekkering i Tian, 2019).

U sastav proteina tih namirnica ulaze esencijalne aminokiseline koje su visoke bioraspoloživosti, u povoljnom omjeru, bez limitirajućih aminokiselina. Limitirajuće aminokiseline su one koje su u pojedinoj namirnici prisutne u najmanjoj količini, zbog čega ne dolazi do dovoljne i pravilne sinteze proteina. U skupini žitarica, lizin je često limitirajuća aminokiselina, dok je u skupini pseudožitarica prisutan u dovoljnoj količini potrebnoj za pravilnu sintezu proteina kod odraslih osoba, ali i djece u rastu i razvoju. Nizak je udio prolamina u proteinima, što pseudožitarice čini pogodnom zamjenom za namirnice koje sadrže gluten (Valcárce-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012). To je posebno važno za ljude oboljele od celijakije.

Pseudožitarice sadrže i širok spektar mikronutrijenata - vitamina i minerala. Oni su osobito važni za pravilno funkcioniranje cijelog organizma. Od vitamina su u većoj mjeri prisutni vitamini A, E, B6 i folna kiselina, dok se od minerala ističu fosfor, kalcij, kalij, magnezij i željezo. Posebno treba istaći mikroelemente u tragovima – cink, bakar i selen (Bekkering i Tian, 2019). Oni imaju važnu ulogu u antioksidacijskom sustavu organizma, kao i pravilnoj funkciji imunskog sustava te brojnim drugim fiziološkim procesima, a upravo kroz unos pseudožitarica možemo osigurati dio preporučenog dnevnog unosa.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U radu su prikazane vrijednosti fiziološki važnih elemenata u tragovima: cinka, bakra i selen izmjerenih metodom masene spektroskopije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) te su iste uspoređene s podacima iz literature. Nadalje, opisan je utjecaj bioaktivnih sastavnica pseudožitarica na zdravlje s naglaskom na elemente u tragovima (cink, bakar i selen), čija je fiziološka uloga pobliže opisana.

3. MATERIJALI I METODE

Za određivanje cinka, bakra i seleno u uzorcima pseudožitarica (heljda, kvinoja, amarant i proso) primijenjena je metoda masene spektroskopije s induktivno spregnutom plazmom (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Mjerenje je odrađeno u „Sample Control“ firmi na ICP MS Agilent 7800.

UZORCI ZA ANALIZU

Za mjerenje su upotrijebljeni uzorci heljde, kvinoje, amaranta i prosa, koji su deklarirani kao „BIO“ proizvodi te uzorci heljde, kvinoje i prosa koji nisu deklarirani kao „BIO“ proizvodi. Uzorci „BIO“ heljde, kvinoje i prosa kupljeni su u „bio&bio“ trgovini (proizvođač: Biovega d.o.o.), „BIO“ amaranta u „Müller“ trgovini (proizvođač: Garden d.o.o.). Uzorci heljde, kvinoje i prosa koji nisu deklarirani kao „BIO“ proizvodi, kupljeni su u „Konzum“ trgovini (proizvođač - heljda: Čakovečki mlinovi d.d.; proizvođač – kvinoja: Fertitecnica Colfiorito; proizvođač – proso: MLINOTEST Živilska industrija d.d.).

INSTRUMENTI

- Mehanički mlin (*Cemotec 1090*)
- Analitička vaga (*Sartorius Croatia*)
- Mikrovalna peć *Speedwave Xpert* (*Berghof*)
- *Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometer Agilent 7800*

KORIŠTENE KEMIKALIJE I REAGENSI

- koncentrirana dušična kiselina (*LabExpert*)
- 30%-tni vodikov peroksid (*Lach-Ner*)
- *TraceSELECT* ≥69%-tna dušična kiselina (*Honeywell*)
- *TraceSELECT* 43-47%-tna klorovodična kiselina (*Honeywell*)
- standard zlata - 1000 µg/mL Au u 20% HCl, (*Agilent Technologies*)

PRINCIP METODE

Metoda induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS) se temelji na djelovanju plina, najčešće argona ili helija, koji se na vrlo visokoj temperaturi, koja može iznositi i do 10000 K, ionizira i pretvara u plazmu. Uz visoku temperaturu i napon, dolazi do ubrzanog gibanja iona argona (kationa) i elektrona pod utjecajem električnog polja u nastaloj plazmi te velikog broja sudara iona plina, pri čemu nastaje vrlo visoka energija ionizacije. Nastala energija dovoljna je za kidanje kemijskih veza između atoma različitih molekula u uzorku, odnosno za atomizaciju molekula elemenata u tragovima. Zbog toga što im je prva energija ionizacije niža od prve energije ionizacije plina (argona ili helija), gotovo svi atomi periodnog sustava elemenata se pod utjecajem visoke temperature plazme i ioniziranog plina ioniziraju. Nastali ioni odvajaju se metodom masene spektrometrije. Odvajanje se temelji na omjeru mase i naboja te se najčešće odvija pomoću kvadrupola filtera masa. Odvojeni ioni dolaze do detektora te nastaje signal koji detektirane ione obilježava u jedinicama *counts per second (CPS)*. CPS se odnose na broj iona koji detektor zabilježi u jednoj sekundi. Vrijednost CPS se prevodi u jedinicu koncentracije na temelju prethodno napravljene kalibracije standarda, iz koje se izvodi kalibracijska krivulja pomoću koje se očitaju dobivene koncentracije pojedinih elemenata u uzorku (Wilschefski i Baxter, 2019.).

PRIPREMA UZORAKA

Uzorci su prvotno smljeveni pomoću mehaničkog mlina. Zatim je na analitičkoj vagi odvagano po 2 grama svakog uzorka. Uzorci su vagani u plastičnim čašicama koje su sastavni dio kiveta u kojima se provodi spaljivanje. Čašice su prije samog postupka vaganja zajedno s kivetama podvrgnute postupku čišćenja s 5 mL koncentrirane dušične kiseline i 5 mL destilirane vode uz zagrijavanje u mikrovalnoj (Speedwave Xpert, Berghof). Nakon vaganja uslijedila je priprema uzoraka za spaljivanje. Čašice s izvaganim uzorcima ubačene su u očišćene kivete te je u svaku dodano po 1 mL 30%-tnog vodikovog peroksida (Lach-Ner) i 3 mL *TraceSELECT* $\geq 69\%$ -tne dušične kiseline (Honeywell). Zatim su pripremljene kivete s uzorcima postavljene u mikrovalnu te je pokrenut program spaljivanja u trajanju od 40 minuta, pod tlakom od 35 bara uz zagrijavanje do 190 °. Po završetku postupka spaljivanja i hlađenja, sadržaj svake kivete prebačen je u zasebnu *Falcon* kivetu volumena 50 mL. U svaku *Falcon* kivetu s uzorkom dodano je 700 μL *TraceSELECT* 43-47%-tne klorovodične kiseline (Honeywell), 250 μL standarda zlata (1000 $\mu\text{g/mL}$ Au u 20% HCl, Agilent Technologies) te

je ostatak volumena do 50 mL nadopunjen destiliranom vodom. Uzorci su kao takvi pripremljeni za mjerenje.

MJERENJE

Pozicije uzoraka najprije su upisane u *Microsoft Excel* tablicu povezanom sa softwareom ICP-MS-a (Agilent 7800), uzorci su postavljeni na *autosampler*, pušten je argon potreban za ionizaciju uzoraka te je pokrenuta kalibracija nakon koje je uslijedilo mjerenje. Mjerenje je odrađeno u triplikatu.

REZULTATI

Dobivenim rezultatima (*CPS*) izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija. Konačni je rezultat prikazan kao (*mg/100 g; mcg/100 g*) svakog elementa od interesa (cink, bakar i selen) u odabranim uzorcima namirnica (heljda, kvinoja, amarant i proso).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. HELJDA

Heljda (*Fagopyrum esculentum Möench*), kao i ostale pseudožitarice, pripada u skupinu dikotidnih biljaka. Taksonomski je podijeljena u više vrsta, a dvije vrste se ističu prema nutritivnom sastavu te se koriste u prehrambene svrhe - *F. esculentum* i *F. tataricum* (Rodríguez i sur., 2020). Dobar je izvor proteina visoke biološke vrijednosti uključujući arginin i lizin, aminokiseline koje su limitirajuće u većini žitarica. Gotovo polovicu ukupnog udjela proteina čine albumini i globulini. Sadrže niski udio prolamina koji se prema sastavu razlikuju od onih prisutnih u žitaricama, što heljdu čini pogodnom namirnicom u svrhu prevencije i kontrole celijakije i ostalih bolesti gastrointestinalnog trakta. Zbog visokog udjela prehrambenih vlakana te ugljikohidrata niskog glikemijskog indeksa, pogodna je za prevenciju dijabetesa, pretilosti te ostalih kardiovaskularnih bolesti kao što su hiperkolesterolemija i hipertrigliceridemija. Osim toga, sadrži visoki udio neprobavljivog škroba (33-38%) koji se, kao i topljiva prehrambena vlakna, djelovanjem crijevne mikroflore fermentira u debelom crijevu (Christa i Soral-Šmietana, 2008). Zbog visokog udjela butirata u kratkim lancima masnih kiselina nastalih fermentacijom, dolazi do povoljnog učinka u prevenciji nastanka kolorektalnog karcinoma te smanjuje ukupnu koncentraciju kolesterola i triglicerida (Christa i Soral-Šmietana, 2008; Kreft i Germ, 2008).

Ističe se i prema prisustvu raznih antioksidativnih spojeva kao što su flavonoidi (rutin, kvercetin, orientin, homoorientin, viteksin, izoviteksin), flavoni, fitosterol i fagopirini. Posebno treba istaknuti rutin, koji je prisutan u dovoljnoj količini da osim što djeluje kao antioksidans, ima i antikancerogeno te protuupalno djelovanje. Postoji nekoliko mehanizama njegovog djelovanja. Izravno uklanja reaktivne kisikove vrste (ROS), povećava sintezu reduciranog oblika glutationa (GSH) kao i važnih antioksidativnih enzima superoksid dimutaze i katalaze, Također inhibira ksantin oksidazu, enzim koji sudjeluje u sintezi ROS (Enogieru i sur., 2018).

Bogatom nutritivnom sastavu heljde u velikoj mjeri doprinose i mikronutrijenti. Sadrži vitamine B kompleksa – tiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B7), pantotensku kiselinu (B5), piridoksin (B6) i folnu kiselinu (B9). U značajnoj količini prisutan je i vitamin C, a od

vitamina topljivih u mastima vitamin K i E. Od minerala se ističu kalij, magnezij i fosfor, a od elemenata u tragovima cink, bakar i selen (Rodríguez i sur., 2020).

Koncentracija cinka, bakra i selen u uzorcima heljde izmjerena je metodom masene spektroskopije s induktivno spregnutom plazmom. Mjerenje je provedeno na dva uzorka, na uzorku heljde koji je klasificiran kao „BIO proizvod“ i uzorku heljde koji nema oznaku „BIO“. Da bi proizvod dobio oznaku „BIO“, treba biti uzgajan u ekološkim uvjetima, bez upotrebe pesticida te ne smije sadržavati teške metale. Mjerenje oba uzorka ponovljeno je tri puta. Dobiveni rezultati izraženi kao srednja vrijednost uz standardnu devijaciju prikazani su u tablici zajedno s podacima iz literature (Tablica 1.).

Tablica 1. Sadržaj cinka, bakra i selen u uzorcima heljde i literaturni podaci
(www.nutritiondata.self.com)

	„BIO“ heljda	Heljda	Heljda (literatura)
Cink (Zn)/(mg/100g)	1,64 ± 0,24	1,91 ± 0,04	2,4 ± 0,0
Bakar (Cu)/(mg/100g)	0,46 ± 0,11	0,59 ± 0,00	1,1 ± 0,0
Selen (Se)/(µg/100g)	6,5 ± 3,7	4,03 ± 3,31	8,3 ± 0,0

Sadržaj cinka i bakra (mg/100g) u „BIO“ heljdi niži je nego u heljdi koja nema oznaku „BIO“, dok je sadržaj selen (µg/100g) u „BIO“ heljdi viši. Literaturni podaci navode nešto više vrijednosti svih triju navedenih mikroelemenata.

4.2. KVINOJA

Kvinoja se, kao i ostale pseudožitarice, svrstava u razred *Dicotyledoneae*. Pripada u porodicu Chenopodiaceae te rod *Chenopodium* koji se dijeli u približno 250 vrsta, od kojih se najčešće uzgaja *Chenopodium quinoa Willd* (Valcárcel-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012). Njezina vrijednost prepoznata je još 5000 – 7000 godina prije nove ere, kada je započet uzgoj u području Anda na prostoru današnjih država Perua i Bolivije (Gordillo-Bastidas i sur., 2016). Upravo mogućnost uzgoja na različitim nadmorskim visinama i tlu siromašnom nutrijentima, kao i otpornost na različite klimatske uvjete te širok raspon optimalne temperature za uzgoj (-1°C – 35°C), čine kvinoju pogodnom za uzgoj na različitim klimatskim područjima (Jancurovà i sur., 2009). Iako nije zahtjevna za uzgoj, namirnica je visoke nutritivne kvalitete. Osim povoljnog omjera proteina, masti i ugljikohidrata, dobar je izvor vitamina, minerala te spojeva sa značajnim antioksidativnim djelovanjem kao što su polifenoli i flavonoli (Rodríguez i sur., 2020).

Sadrži viši udio proteina (12,9 – 6,5%) u usporedbi s klasičnim žitaricama (10,2 – 14,3%), a osim kvantitativne značajna je i kvalitativna vrijednost proteina jer sadrže sve potrebne esencijalne aminokiseline, uključujući lizin i metionin koje su često limitirajuće u žitaricama (Gordillo-Bastidas i sur., 2016; Valcárcel-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012). Sadrži vrlo nizak udio prolamina (0,5-7,0%), zbog čega je pogodna za oboljele od celijakije (Jancurovà i sur., 2009). Sadržaj ugljikohidrata iznosi od 58,1% do 64,2% (Gordillo-Bastidas i sur., 2016). U manjem udjelu su prisutni jednostavni šećeri (monosaharidi, disaharidi, polioli) te oligosaharidi (Valcárcel-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012). Većinu udjela ugljikohidrata čini škrob s niskim udjelom amiloze od približno 11%. Niski glikemijski indeks (35-53) kao i visoki udio prehrambenih vlakana pogoduju smanjenju rezistencije na inzulin, što je od iznimne važnosti za oboljele od dijabetesa, kao i za prevenciju dijabetesa te kardiovaskularnih bolesti pošto utječu i na lipidni profil (Gordillo-Bastidas i sur., 2016). Udio lipida u kvinoji iznosi od 5,2% do 9,7%, od kojih većinu čine nezasićene masne kiseline, dok se zasićene masne kiseline prisutne u udjelu od 14%. Od nezasićenih masnih kiselina najviše je linolne, oleinske i α -linolenske kiseline, dok je od zasićenih kiselina većinski prisutna palmitinska kiselina. Unatoč visokom stupnju nezasićenosti lipida prisutnih u kvinoji, oni uglavnom ne podliježu procesu oksidacije masnih kiselina. Tome doprinosi visoka koncentracija vitamina E u obliku α -tokoferola i γ -tokoferola

(Valcárcel-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012). α -tokoferol ima najizraženija antioksidativna svojstva od sva četiri oblika tokoferola vitamina E (α -, β -, γ -, δ -tokoferol). Antioksidacijski mehanizam je takav da α -tokoferol djeluje na lipidni peroksilni radikal (LOO•) tako da donira vodik s jedne od tri metilnih skupina koje sadrži na kromanolnom prstenu te tako sam postaje radikal (α -Toc•), a istovremeno neutralizira lipidni peroksilni radikal u lipidni hidroperoksid (LOOH) (Miyazawa i sur., 2019).

Osim vitamina E, kvinoja je dobar izvor tiamina (B1), folne kiseline (B9), vitamina C, piridoksina (B6) i pantotenske kiseline (B5) (Gordillo-Bastidas i sur., 2016). Od minerala su u značajnoj količini prisutni kalij, fosfor, magnezij, kalcij i željezo (Jancurovà i sur., 2009). Od elemenata u tragovima ICP-MS metodom određena je količina cinka, bakra i selen u uzorcima kvinoje. Rezultati tri mjerenja izraženi kao srednja vrijednost uz standardnu devijaciju su navedeni u tablici (Tablica 2.).

Tablica 2. Sadržaj cinka, bakra i selen u uzorcima kvinoje i literaturni podaci
(www.nutritiondata.self.com)

	„BIO“ kvinoja	Kvinoja	Kvinoja (literatura)
Cink (Zn)/(mg/100g)	2,24 ± 0,08	2,36 ± 0,55	3,1 ± 0,0
Bakar (Cu)/(mg/100g)	0,48 ± 0,007	0,44 ± 0,02	0,6 ± 0,0
Selen (Se)/(µg/100g)	10,1 ± 5,54	3,63 ± 1,00	8,5 ± 0,0

Mjerenje je provedeno na uzorku „BIO“ kvinoje i uzorku kvinoje koja nema oznaku „BIO“. Sadržaj cinka i bakra (mg/100g) je podjednak u oba uzorka, dok je selen (µg/100g) u uzorku „BIO“ kvinoje viši. Dobiveni rezultati su uspoređeni s literaturnim podacima. Sadržaj cinka u uzorcima je podjednak navodu iz literature, sadržaj bakra je nešto niži, dok je sadržaj selen u „BIO“ kvinoji viši, a u kvinoji koja nije klasificirana kao „BIO“ proizvod je niži nego što je navedeno u literaturi.

4.3. AMARANT

Amarant (*Amaranthus spp.*) je pseudožitarica čiji je uzgoj započeo na prostoru Južne Amerike na području Anda (Valcárcel-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012). Uzgoj je započeo još prije nove ere, a uzgajale su ga i drevne civilizacije Maja, Inka i Azteka (Caselato-Sousa i Amaya-Farfán, 2012). Pripada redu *Caryophyllales*, porodici *Amaranthaceae* te rodu *Amaranthus* u koji je uključeno oko 60 vrsta. Najčešće uzgajane vrste su *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* i *A. caudatus* (Valcárcel-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012).

U odnosu na klasične žitarice sadrži viši udio proteina koji iznosi od 13,1% do čak 21,0%. Sadrži visoki udio lizina koji je limitirajuća aminokiselina u većini žitarica, ali nešto niži udio leucina, izoleucina i valina. Stoga ga je potrebno konzumirati s drugim žitaricama kako bi se zadovoljile dnevne potrebe za esencijalnim aminokiselinama. Unatoč tome, sadrži optimalnu količinu ostalih esencijalnih aminokiselina koje su dobro probavljive, a time je i njihova bioraspoloživost veća (Rodríguez i sur., 2020). Kao i ostale pseudožitarice, sadrži nizak udio prolamina, što ga čini pogodnom namirnicom za oboljele od celijakije (Valcárcel-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012). Sadrži 60-65% ugljikohidrata, od čega većinu čini škrob s niskim udjelom amiloze te znatno višim udjelom amilopektina (89-99%). Visoki udio amilopektina, kao i mala veličina zrna amaranta osiguravaju visoki kapacitet vezanja vode što doprinosi dobroj topljivosti, a time i probavljivosti (Rodríguez i sur., 2020). Ovisno o vrsti, 11,14-20,6% ugljikohidrata čine topljiva i netopljiva prehrambena vlakna. Topljiva vlakna doprinose smanjenju kolesterola u serumu, dok netopljiva potiču peristaltiku crijeva (Valcárcel-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012). Udio lipida kreće se od 1,9% do 9,7%, ovisno o vrsti (Caselato-Sousa i Amaya-Farfán, 2012). Većinu tog udjela čine nezasićene masne kiseline (75 – 77,1%), od čega pretežito linolna kiselina (47,5-47,8%) i oleinska kiselina (23,7-32,9%) (Valcárcel-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012), dok je linolenska kiselina prisutna u nešto manjoj količini (1,4%) (Caselato-Sousa i Amaya-Farfán, 2012). Od zasićenih masnih kiselina prisutna je palmitinska kiselina u udjelu od 12,3% do 20,9%. Među lipidima treba istaknuti i ostale biološki aktivne spojeve kao što su skvalen, tokoferoli, fosfolipidi i fitosteroli (Rodríguez i sur., 2020). Skvalen je triterpen otvorenog lanca visokog stupnja nezasićenosti. Osim što je prisutan u pojedinim namirnicama (egzogeni), sintetizira se i endogeno kao prekursor u sintezi kolesterola u jetri. Egzogeni skvalen ima povoljan utjecaj

na smanjenje kolesterola, na način da interferira u procesu sinteze kolesterola te tako inhibira sintezu (Valcárcel-Yamani i Caetano da Silva Lannes, 2012). Osim što povoljno djeluje na lipidni profil, djeluje kao antioksidans te pokazuje antikancerogeno i antibakterijsko djelovanje (Rodríguez i sur., 2020).

Od vitamina u značajnom udjelu sadrži tiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3) i vitamin C, dok su od minerala prisutni kalcij, željezo, magnezij i cink. Sadrži i pojedine elemente u tragovima. U tablici (Tablica 3.) su prikazane vrijednosti dobivene mjerenjem ICP-MS metodom, prikazane kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Kao uzorak je korišten amarant koji ima oznaku „BIO proizvoda“.

Tablica 3. Sadržaj cinka, bakra i selena u uzorku amaranta i literaturni podaci
(www.nutritiondata.self.com)

	„BIO“ Amarant	Amarant (literatura)
Cink (Zn)/(mg/100g)	2,17 ± 0,03	2,9 ± 0,0
Bakar (Cu)/(mg/100g)	0,49 ± 0,02	0,5 ± 0,0
Selen (Se)/(µg/100g)	31,73 ± 2,43	18,7 ± 0,0

Izmjereni sadržaj cinka na 100 g uzorka „BIO“ amaranta je nešto manji od vrijednosti navedene u literaturi, dok se sadržaj bakra gotovo u potpunosti slaže s podacima iz literature. Sadržaj selena je nešto viši (31,73 µg/100g) od vrijednosti navedene u literaturi (18,7 µg/100g).

4.4. PROSO

Iako se smatra pravom žitaricom, često se u današnjim trgovinama specijaliziranom hranom i namirnicama proso stavlja u skupinu pseudožitarica. Dijeli određene karakteristike s pseudožitaricama, ali ne pripada u razred *Dicotyledoneae*, već je monokotidna biljka koja pripada u porodicu trava (*Gramineae/Paniceae*). Porodica *Gramineae/Paniceae* je podijeljena u desetak rodova i 20 vrsta (Singh i Singh Raghuvanshi, 2012). U skupinu prosa se ubrajaju vrste iz nekoliko različitih rodova porodice *Gramineae/Paniceae* (*Panicum*, *Setaria*, *Echinochloa*, *Pennesetum*, *Eleusine*), a zajedničke karakteristike su im to što sve imaju vrlo sitno zrno te se uzgajaju kao žitarice u sušnim subtropskim i tropskim područjima (Saleh i sur., 2013; Singh i Singh Raghuvanshi, 2012). Vrste koje se najčešće uzgajaju su *Panicum miliaceum*, *Setaria italica*, *Echinochloa frumentacea*, *Eleusine coracana* i *Paspalum scrobiculatum* (Singh Raghuvanshi, 2012).

Za razliku od kukuruza i pšenica, koje također pripadaju u skupinu običnih žitarica, proso uspijeva u ekstremnim klimatskim uvjetima u područjima gdje prevladavaju visoke temperature i suša te je zemlja manje plodna, niskog pH i visokog saliniteta (Krishnan i Meera, 2018). Takve klimatske uvjete ima veliki broj zemalja u razvoju na subsaharskom području Afrike, Kine i Indije. Zbog svog kvalitetnog nutritivnog sastava, proso uvelike doprinosi rješavanju problema malnutricije stanovništva, što je iznimno česta pojava u zemljama u razvoju, te doprinosi boljoj kvaliteti života njihovih stanovnika (Saleh i sur., 2013).

Dobar je izvor proteina, čiji udio ovisno o vrsti iznosi od 7,7 do 12,5% te većine esencijalnih aminokiselina, dok su limitirajuće aminokiseline u većini vrsta lizin i treonin (Saleh i sur., 2013). Iznimka je vrsta *E. coracana* koja sadrži više lizina, treonina i valina od ostalih vrsta što doprinosi boljoj biološkoj iskoristivosti prilikom sinteze proteina (Singh i Singh Raghuvanshi, 2012). Udio ugljikohidrata iznosi 55-72% (Saleh i sur., 2013), od čega najveći udio čini rezistentni škrob s visokim udjelom amilopektina te niskim udjelom amiloze (Singh i Singh Raghuvanshi, 2012). Takav sastav utječe na manje izraženi porast glukoze u krvi te smanjenje koncentracije kolesterola i triglicerida što doprinosi prevenciji i kontroli dijabetesa i karidovaskularnih bolesti. Nizak GI kao i značajne koncentracije β -glukana, vrste topljivih prehrambenih vlakana, također doprinose prevenciji dijabetesa, metaboličkog sindroma i kardiovaskularnih bolesti (Renganathan i sur., 2020; Rodríguez i sur., 2020).

β -glukan je polisaharid koji se sastoji od jedinica D-glukoze povezanih β -1,3 i β -1,4 glikozidnom vezom. Pokazuje brojne pozitivne učinke na različite sustave u organizmu. Jedan od takvih učinaka je taj da snižava koncentraciju LDL-kolesterola i time doprinosi prevenciji kardiovaskularnih bolesti, na način da veže micela žučnih kiselina koje sadrže masti te tako onemogućuje vezanje micela s transporterima luminalne membrane na epitelu crijeva. Posljedica je izlučivanje lipida, uključujući i kolesterol te žučnih kiselina defekacijom. Također, prolaskom kroz gastrointestinalni trakt molekule β -glukana dolaze do debelog crijeva, gdje se djelovanjem crijevne mikrobiote pretvaraju u masne kiseline kratkog lanca (SCFA – *short chain fatty acids*) – acetatnu, propansku i butansku kiselinu (Nakashima i sur., 2018). Masne kiseline kratkog lanca se vežu za GPR43 receptore na adipocitima te tako reguliraju metabolizam i preveniraju pretilost na način da sprječavaju nakupljanje suvišnih lipida u adipoznom tkivu. Uz to, SCFA u GIT-u doprinose održavanju zdrave crijevne mikrobiote suprimirajući rast bakterija roda *Clostridium* (Nakashima i sur., 2018).

Osim povoljnog utjecaja β -glukana i kvalitetnog sastava proteina u visokom udjelu s obzirom na ostale žitarice, treba spomenuti i lipidni sastav prosa. Udio lipida iznosi od 1,5 do 4,8% (Saleh i sur., 2013), od čega se u visokom udjelu nalaze polinezasićene masne kiseline (PUFA) – oleinska, linolna te u nešto manjem udjelu linolenska kiselina. Od zasićenih masnih kiselina, kojih je znatno manje od zasićenih masnih kiselina, u većinskom udjelu je prisutna palmitinska kiselina (Singh i Singh Raghuvanshi, 2012).

Za razliku od heljde, kvinoje i amaranta, proso sadrži vitamin A u značajnoj količini, ali manje vitamina B kompleksa, s iznimkom niacina (B3) i riboflavina (B2), te ne sadrži vitamin C (Krishnan i Meera, 2018; Saleh i sur., 2013). Mineralni sastav je nešto bogatiji te se proso smatra dobrim izvorom željeza, magnezija, bakra, mangana, kalija i fosfora (Krishnan i Meera, 2018). Osim minerala, sadrži i elemente u tragovima – cink, bakar i selen. Njihov sadržaj u prosu izmjeren je metodom ICP-MS te su rezultati (mg/100g; mcg/100g) prikazni kao srednja vrijednost uz standardnu devijaciju (Tablica 4.). Za mjerenje su korištena dva uzorka. Jedan uzorak je klasificiran kao „BIO proizvod“, dok drugi uzorak nije.

Tablica 4. Sadržaj cinka, bakra i selena u uzorcima prosa i literaturni podaci
(www.nutritiondata.self.com)

	„BIO“ proso	Proso	Proso (literatura)
Cink (Zn)/(mg/100g)	1,92 ± 0,14	1,69 ± 0,17	1,7 ± 0,0
Bakar (Cu)/(mg/100g)	0,47 ± 0,10	0,33 ± 0,11	0,7 ± 0,0
Selen (Se)/(µg/100g)	6,97 ± 5,68	7,90 ± 4,87	2,7 ± 0,0

Izmjereni sadržaj cinka u uzorku „BIO“ prosa i prosa koji nema oznaku „BIO“ je približno isti te se slaže s navodom iz literature (1,7 mg/100g). Sadržaj bakra je u oba uzorka nešto niži nego što je navedeno u literaturi, dok je sadržaj selena u oba uzorka viši od navoda iz literature.

4.5. CINK

Cink je kemijski element koji pripada u skupinu prijelaznih metala. U ljudskom organizmu se nalazi u vrlo malim količinama, zbog čega se ubraja u skupinu elemenata u tragovima (mikroelementa). Prema zastupljenosti u organizmu slijedi odmah nakon željeza, što ga čini drugim najzastupljenijim mikroelementom u organizmu (Read i sur., 2019; Jarosz i sur., 2017). Raspodijeljen je u različitim organskim sustavima i tkivima. Najviše ga je u mišićima i kostima (85%), zatim u koži i jetri (11%) (Jarosz i sur., 2017), dok je ostatak raspodjeljen u prostati, gušterači, srcu, bubrezima, oku i mozgu (4%) (Wessels i sur., 2017; Jarosz i sur., 2017). Iako je prisutan u vrlo maloj količini od svega 50 µg/kg (Lin i sur., 2017), uključen je u brojne katalitičke, strukturne i regulatorne funkcije u različitim fiziološkim procesima. Ima iznimno važnu ulogu u održavanju integriteta cjelokupnog imunološkog sustava, uključujući pravilan imunološki odgovor. Isto tako, sudjeluje u aktivaciji i inhibiciji kao kofaktor brojnih enzima i transkripcijskih faktora, diferencijaciji i proliferaciji stanica, apoptozi, sintezi i popravku DNA i RNA, staničnoj signalizaciji, stabilizaciji strukture stanične membrane, održavanju izvanstaničnog matriksa, a pokazuje i antioksidativno djelovanje (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019, Lin i sur., 2017). Djeluje i na središnji živčani sustav (CNS) gdje sudjeluje u regulaciji sna i pamćenja (Cherasse i Uradete, 2017) te doprinosi održavanju mentalnog zdravlja (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019). Deficit kao i suvišak cinka dovode do neravnoteže u izvođenju navedenih fizioloških procesa, a posljedično i do narušavanja homeostaze organizma, stoga je za pravilno odvijanje fizioloških funkcija nužna optimalna koncentracija cinka (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019; Wessels i sur., 2017).

4.5.1. Homeostaza cinka

Cink se apsorbira iz tankog crijeva (duodenuma, jejunuma i ileuma) pomoću transportnih proteina specifičnih za cink te rjeđe pasivnom difuzijom (Jarosz i sur., 2017; Wessels i sur., 2017). Koncentracija u plazmi mu je vrlo niska, 13,8-22,9 µmol/L (Jarosz i sur., 2017). Rijetko se u krvi nalazi u slobodnom obliku, već je najčešće vezan za transportne proteine – albumin (niski afinitet), α₂-makroglobulin (srednji afinitet) i transferin (visoki afinitet) te tako vezan putuje kroz krvotok do tkiva (Wessels i sur., 2017). U stanici je raspodijeljen unutar cinkosoma, specifičnih vezikula za pohranu cinka koje sadrže oko 50%

ukupnog staničnog cinka), jezgre (30-40%), a ostatak se nalazi u ostalim organelima i u citoplazmi, gdje je vezan za metalotioneine (Wessels i sur., 2017). Metalotioneini (MT) su unutarstanični proteini male molekularne mase. Bogati su cisteinom što omogućuje vezanje metala, uključujući cink. Izoforme MT1 i MT2 su u visokoj koncentraciji prisutni u jetri te u velikoj mjeri doprinose homeostazi cinka u organizmu (Coyle i sur., 2002). Ulaskom cinka u stanicu putem specifičnog membranskog transportera, dolazi do aktivacije specifičnog transkripcijskog faktora za vezanje metala (MTF1 – *metal-responsive transcription factor*) koji započinje transkripciju metalotioneina vezanjem cinka za promotor gena. Vezanjem cinka za sintetizirani metalotionein spriječeno je nakupljanje slobodnog cinka u stanici, a time i citotoksični efekt cinka na stanicu i štetno djelovanje slobodnih radikala (Read i sur., 2019).

Osim metalotioneina, ulogu u održavanju homeostaze cinka u stanici u niskoj piko- i nanomolarnoj koncentraciji imaju i transportni proteini specifični za cink te ionski kanali (kalcijevi kanali ovisni o naponu) i različiti receptori (nikotin acetilkolinski receptori, glutamatni receptori) (Wessels i sur., 2017). Transportni proteini uključeni u homeostazu cinka podijeljeni su u dvije skupine. U prvu skupinu pripadaju ZnT proteini koji pripadaju u porodicu SLC30A (solute-linked carrier 30). Njih deset je odgovorno za transport cinka izvan stanice ili u stanične organele, čime smanjuju koncentraciju cinka u citoplazmi. U drugu skupinu pripada 14 ZIP proteina, koji su dio SLC39A porodice. Njihova uloga je obrnuta od uloge ZnT proteina. Prenose izvanstanični cink unutar stanice i iz staničnih organela u citoplazmu te na taj način povećavaju koncentraciju cinka u citoplazmi (Read i sur., 2019; Jarosz i sur., 2017).

Deficit cinka je zdravstveni problem s visokom incidencijom, pogotovo u zemljama u razvoju na području Afrike i Azije te je procijenjeno da se očituje kod čak 20% cjelokupne svjetske populacije (Read i sur., 2019). Rjeđi je u razvijenim zemljama, gdje se najčešće javlja kod starije populacije te kod ljudi koji ne konzumiraju meso i čija se prehrana temelji isključivo na namirnicama biljnog podrijetla. Očituje se u kompromitiranom upalnom odgovoru, razvoju autoimunih bolesti i alergija, razvoju tumora, nemogućnosti djelovanja različitih enzima iz svih skupina (transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, oksidoreduktaze i ligaze), pojačanom djelovanju slobodnih radikala koji dovode do oksidativnog stresa, poremećaju rasta i razvoja kod djece te u brojnim drugim fiziološkim funkcijama (Read i sur., 2019; Wessels i sur., 2017). Češći je blaži oblik deficita, uzrokovan nedovoljnim unosom cinka kroz prehranu. Može dovesti do gubitka apetita te posljedično i težine, promjena na

koži, oligospermije, hiperamonijemije, smanjena reproduktivnost dok se promjene u funkciji imunskog sustava vjerojatnije kod starijih osoba (Wessels i sur., 2017; Jarosz i sur., 2017). Uzrok težeg deficita je pretežito malapsorpcija cinka u crijevima uzrokovana kroničnom dijarejom, liječenjem penicilaminom, parenteralnom prehranom koja ne sadrži cink te pretjeranom konzumacijom alkohola. Kod pacijenata dolazi do narušavanja imunološkog sustava što posljedično dovodi do limfopenije, disbalansa pomagačkih (Th-) i citotoksičnih (Tc-) limfocita, smanjene aktivnosti NK-stanica te citotoksičnosti monocita (Wessels i sur., 2017). Najteži oblik deficita je Acrodermatitis Enteropathica, nasljedni autosomno recesivni malapsorpcijski sindrom, nastao uslijed mutacije transportnog proteina ZIP4 koji se nalazi u crijevima. Dovodi do gubitka težine, dijareje, rekurentnih bakterijskih i virusnih infekcija, dermatitisa, gubitka kose, i neuroloških simptoma (Wessels i sur., 2017; Shankar i Prasad, 1998). Za razliku od deficita, suvišak cinka je vrlo rijedak te je uglavnom povezan s deficitom bakra (Jarosz i sur., 2017).

4.5.2. Cink i imunski sustav

Cink ima nezamjenjivu ulogu u regulaciji i funkcioniranju imunskog sustava. Sudjeluje u širokom spektru njegovog djelovanja – hematopoezi, sazrijevanju i diferencijaciji stanica, progresiji staničnog ciklusa (Wessels i sur., 2017) pa sve do specifičnog i nespecifičnog imunološkog odgovora što uključuje pravilnu funkciju imunskih stanica te regulaciju stanične signalizacije (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019).

Imunski sustav je vrlo osjetljiv na promjene koncentracije cinka (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019). Uslijed deficita, kao i suviška cinka dolazi do značajnih promjena u načinu njegovog djelovanja uključujući odgovor urođene i stečene imunosti na prisutnost patogena. Cink je nužan za održavanje integriteta „prve linije obrane“ od patogena – epitelnih stanica kože te mukoznih membrana u gastrointestinalnom traktu i plućima (GALT i BALT). Uz to potiče sekreciju antimikrobnog peptida iz epitelnih stanica te na taj način doprinosi djelovanju urođene imunosti preko kože i mukoznih barijera (Jarosz i sur., 2017). Deficit, kao i suvišak cinka sprječavaju kemotaksiju i fagocitozu polimorfonuklearnih leukocita (neutrofila) te je u stanju deficita njihov broj smanjen. Deficit također sprječava fagocitnu aktivnost makrofaga, dok suvišak uzrokuje njihovu izravnu aktivaciju. Uz fagocitozu, na patogene djeluje i NADPH (nikotinamid dinukleotid fosfat), a deficit i suvišak cinka smanjuju njegovu aktivnost. Narušena homeostaza cinka utječe i na NK-stanice. U

deficitu je broj raspoloživih NK-stanica manji te je suprimiran njihov citotoksični efekt lize membrane stanice patogena kojim ih uništavaju. Smanjena sposobnost citotoksičnosti NK-stanica uočena je i u stanju suviška cinka. Deficit potiče sintezu proupalnih citokina (IL-1 β , IL-6 i TNF- α) što narušava imunostnu ravnotežu između pro- i protuupalnog odgovora (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019; Jarosz i sur., 2017).

Osim što utječe na funkciju urođene imunosti, cink također ima bitnu ulogu u pravilnom funkcioniranju stečene imunosti. Sudjeluje u procesu sazrijevanja T i B-limfocita te utječe na njihov broj i funkciju (Wessels i sur., 2017). Deficit negativno utječe na razvoj T-limfocita dovodeći do atrofije timusa (Jarosz i sur., 2017). Cink također sudjeluje kao kofaktor u sintezi timulina, peptidnog hormona kojeg luče timusne stanice, koji regulira sazrijevanje T-stanica u timusu i daljnje sazrijevanje nakon otpuštanja u krvotok (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019). Deficit uzrokuje disbalans i između Th1 i Th2 odgovora u smjeru Th2, koji je usmjeren na eliminaciju izvanstaničnih patogena (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019).

Cink djeluje na nekoliko signalnih puteva uključenih u regulaciju imunostnog sustava (Wessels i sur., 2017), uključujući i signalizaciju putem jednim od glavnih transkripcijskog faktora NF κ B (The nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Jarosz i sur., 2017). NF κ B ima brojne uloge unutar imunostnog sustava, a neke od njih su adhezija stanica, proliferacija, remodeliranje tkiva, uključen je u imunološki odgovor urođene i stečene imunosti, upalne procese. Također potiče ekspresiju proupalnih citokina (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1), kemokina, proteina akutne faze (CRP, fibrinogen), metaloproteinaza matriksa (MMP), adhezijskih molekula, faktora rasta, COX-2, iNOS i brojnih drugih sastavnica imunološkog odgovora (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019; Jarosz i sur., 2017). Iako je poznato da je cink modulator aktivnosti NF κ B te da djeluje neizravno različitim mehanizmima, točan mehanizam djelovanja cinka na NF κ B nije do kraja poznat te zahtijeva daljnje istraživanje. Prema literaturi, različita istraživanja su dala drugačije, kontradiktorne rezultate. Dio istraživanja je dokazao kako cink inducira transkripcijski faktor NF κ B te potiče njegovu proupalnu aktivnost, dok je u drugim istraživanjima utvrđeno suprotno, da cink inhibira aktivaciju transkripcijskog faktora NF κ B (Jarosz i sur., 2017).

4.5.3. Antioksidacijsko djelovanje cinka

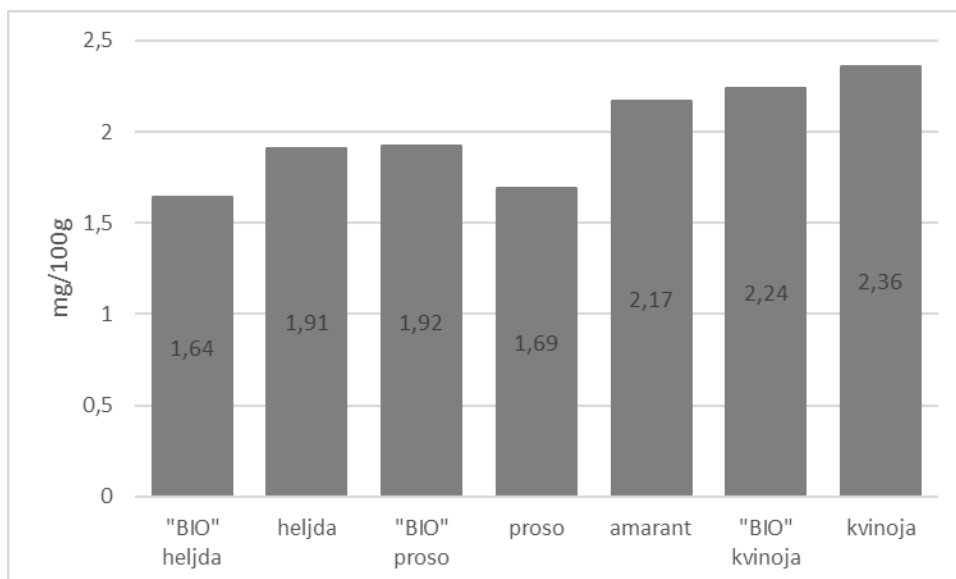
Iako reaktivne kisikove i dušikove vrste (ROS i RNS) imaju bitnu ulogu u imunološkom odgovoru, njihov suvišak može izazvati negativne posljedice na organizam. Njihovo nakupljanje postepeno dovodi do oksidativnog stresa, koji je posljedica neravnoteže pro- i antioksidativnog sustava. Oksidativni stres uzrokuje oštećenje proteina, lipida i nukleinskih kiselina, što je podloga za razvoj brojnih bolesti imunološkog sustava kao što su ateroskleroza, dijabetes, reumatoidni artritis, rak i neurodegenerativne bolesti (Jarosz i sur., 2017).

Cink je dio jednog od najvažnijih antioksidativnih enzima – superoksid dismutaze (SOD). SOD katalizira reakciju disproporcije štetnog superoksidnog radikala na vodikov peroksid i kisik. Prisutna je u tri izoforme, a cink je zajedno s bakrom vezan za bočne ogranke aminokiseline histidin na SOD te zajedno čine sastavni dio SOD1 i SOD3 (CuZnSOD). Njihova uloga je stabilizacija tercijarne strukturu enzima sprječavanjem njegove denaturacije (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019).

Osim što je sastavnica SOD, cink je uključen i u druge antioksidativne mehanizme, koji se dijele na kronične i akutne. Kronični učinci antioksidativnog mehanizma cinka se primarno odnose na djelovanje metalotioneina (poglavlje 5.1.1.). Dokazana su dva akutna mehanizma. Prvi se odnosi na sprječavanje oksidacije stabilizacijom sulfhidrilnih skupina proteina, što se odvija na tri načina. Izravnim vezanjem cinka za tiolnu skupinu, vezanjem na mjesto u blizini tiolne skupine te vezanjem na drugi dio proteina, čime dolazi do promjene konformacije. Drugi akutni mehanizam antioksidativnog djelovanja cinka se odnosi na antagonizam reakcija kataliziranih prijelaznim metalima, u ovom slučaju cinka, čime se smanjuje udio nastalog radikala. Primjer takve reakcije je nastajanje hidroksilnog radikala iz vodikovog peroksida i superoksidnog aniona (Jarosz i sur., 2017).

4.5.4. Sadržaj cinka u pseudožitaricama

Sadržaj cinka u uzorcima pseudožitaricama izmjeren je ICP-MS metodom. Usporedba srednjih vrijednosti rezultata prikazana je vertikalnim stupčastim dijagramom (Slika 1.). Uzorak „BIO“ heljde sadrži najmanje cinka, a kvinoje najviše. Na 100 g kvinoje izmjereno je 2,36 mg cinka. Na apsorpciju cinka utječe fitinska kiselina. Ona veže cink u gastrointestinalnom traktu te tako smanjuje njegovu apsorpciju (Roohani i sur., 2013). Iz tog razloga, preporučeni dnevni unos cinka ovisi o dnevnom unosu fitinske kiseline te može iznositi od 7,5 do 12,7 mg (www.efsa.gitlab.io/multimedia/drvs/index.htm).



Slika 1. Usporedba sadržaja cinka (mg/100g) u pseudožitaricama

4.6. BAKAR

Bakar je kemijski element koji pripada u skupinu prijelaznih metala (Guengerich, 2018). Iako je u ljudskom organizmu prisutan u tragovima (približno 100 mg) (Bost i sur., 2016; Collins i Klevay, 2011), bitan je kofaktor u brojnim enzimima što ga čini esencijalnim mikronutrijentom (Kirsipuu i sur., 2020; Bost i sur. 2016). Neki od procesa u kojima sudjeluje su oksidativna fosforilacija (kofaktor citokrom-c oksidaze), apsorpcija željeza (ceruloplazmin) te sudjeluje u obrani od slobodnih radikala (Tapiero i sur., 2003). Važnu ulogu ima i u obrani od patogena (Besold i sur., 2016). Pretežito se nalazi u jetri i bubrezima, dok ga je nešto manje u mozgu i u srcu (Collins i Klevay, 2011). U krvi je najvećim dijelom vezan na proteine, od koji najviše na ceruloplazmin (70%), zatim na albumin (15%), α 2-makroglobulin (10%) te manjim dijelom na aminokiselinu histidin (Kirsipuu i sur., 2020).

4.6.1. Homeostaza bakra

Bakar se apsorbira iz proksimalnog dijela tankog crijeva (Bost i sur. 2016) te manjim dijelom iz želuca kroz mukoznu membrana koja je sastavni dio stijenke crijeva. Prenosi se pasivnim transportom, preko membranskih proteina nosača, a u slučaju niske i visoke koncentracije difuzijom (Tapiero i sur., 2003). Apsorbira se 55-75% bakra unesenog prehranom (Tapiero i sur., 2003), što ovisi o različitim čimbenicima, od kojih su neki dob, spol, vrsta hrane te upotreba oralnih kontraceptiva kod žena. Također, kod žena se u prosjeku apsorbira 10% više bakra, nego kod muškaraca (Bost i sur., 2016). Nakon apsorpcije u krvotok, većim dijelom portalnom venom dolazi do jetre (75%), dio odlazi u druga tkiva, pretežito u kosti, mišiće, bubrege, mozak i srce (Collins i Klevay, 2011), dok ostatak ostaje u krvi vezan pretežito za albumin. Veći dio apsorbiranog bakra se u jetri veže za transportni protein ceruloplazmin (80%) te se takav nastali kompleks dolazi u perifernu cirkulaciju, dok se ostalih 20% secernira natrag u gastrointestinalni trakt (Bost i sur., 2016). U krvi ostaje vezan za transportne proteine, ceruloplazmin, albumin i α 2-makroglobulin, koji sudjeluju u transportu bakra iz krvi u tkiva kada je to potrebno, s kojih se kada dođe do tkiva otpusti (Kirsipuu i sur., 2020). Izlučuje se primarno putem žući, ali i slinom, želučanim sokovima i ostalim gastrointestinalnim tekućinama te su to glavni mehanizmi održavanja homeostaze, dok izlučivanje urinom bitno ne utječe na homeostazu bakra (Bost i sur., 2016). Poremećaji homeostaze bakra mogu dovesti do progresije upale, razvoja karcinoma, ateroskleroze,

Alzheimerove bolesti i drugi neurodegenerativnih bolesti te Wilsonova i Menkesove bolesti (Kirsipuu i sur., 2020).

Wilsonova bolest je autosomno recesivni poremećaj metabolizma bakra, u kojem dolazi do nakupljanja bakra u organizmu (Tapiero i sur., 2003). Bolest uzrokuje mutacija na ATP7B genu (kromosom 13), koji kodira za P-tip ATP-aze, transmembranski protein specifičan za transport bakra. Time je onemogućeno izlučivanje bakra putem žuči, čime se narušava njegova homeostaza u organizmu te sinteza ceruloplazmina (Czlonkowska i sur., 2019). Posljedično dolazi do nakupljanja bakra, primarno u hepatocitima što dovodi do oštećenja jetre te u krajnjem stadiju i do ciroze jetre, uzrokovane prisutnosti slobodnog bakra koji potiče stvaranje ROS (Tapiero i sur., 2003). Višak bakra se, osim u jetri, nakuplja i u mozgu, što dovodi do neuroloških simptoma. Ukoliko je na vrijeme otkrivena, bolest se uspješno liječi terapijom koja uključuje kelaciju slobodnog bakra. Ukoliko se terapija ne započne na vrijeme, može završiti smrtnim ishodom (Czlonkowska i sur., 2019; Tapiero i sur., 2003).

Menkesova bolest je poremećaj metabolizma bakra, u kojemu deficit bakra u mozgu i jetri dovodi do progresivne neurodegeneracije i poremećaja vezivnog tkiva (Tapiero i sur., 2003). Nasljeđuje se X-vezano recesivno te je učestalija kod muške populacije. Do bolesti dolazi uslijed mutacije na ATP7A genu koji kodira za transportni protein ATP7A. ATP7A protein je P-tip ATPaze, koji je eksprimiran na epitalnim stanicama crijeva, mozgu te manjim dijelom na stanicama jetre. Uloge ATP7A transportnog proteina su sekrecija bakra do metaloproteina na koje se veže te izbacivanje viška bakra iz stanice. Bolest u najtežem obliku dovodi do smrti još u ranom djetinjstvu, dok je kod blažih oblika u početku bolesti primjenjiva terapija bakrom vezanog na histidin, kojom se pacijentu može značajno produžiti život (Tümer i Møller, 2010).

4.6.2. Uloga bakra u enzimima

Bakar djeluje kao kofaktor u brojnim enzimima koji sudjeluju u oksidativnom metabolizmu i stvaranju energije te imaju antioksidativno djelovanje (Tümer i Møller, 2010). Jedan od najvažnijih je citokrom-c oksidaza (Tapiero i sur. 2003), krajnji enzim lanca prijenosa elektrona, metaboličkog procesa koji se događa na unutarnjoj membrani mitohondrija u sklopu oksidativne fosforilacije, u kojem reducira molekularni kisik u vodu

(Konstantinov, 2011). Sastoji se od četiri aktivna mjesta na koja su vezani metali koji imaju redoks svojstva, od koji su 2 aktivna mjesta za hem koja vežu željezo, dok druga dva vežu bakar (CuA i CuB), što bakar čini esencijalnim elementom za funkciju enzima, a time i stvaranjem energije procesom oksidativne fosforilacije (Rak i sur., 2016).

Drugi važan enzim u kojemu bakar ima ključnu ulogu je Cu/Zn-SOD (Bost i sur., 2016; Tapiero i sur., 2003) izoforma superoksid dismutaze, jednog od glavnih enzima u antioksidacijskom lancu. Prevodi superoksidne radikale u vodikov peroksid koji se detoksicira u daljnjim procesima kataliziranim katalazom i glutation peroksidazom (Tapiero i sur., 2003). Cu/Zn-SOD se nalazi u citoplazmi, jezgri, mikrosomima te u prostoru između vanjske i unutarnje mitohondrijske membrane (Miao i St. Clair, 2010). Mutacija Cu/Zn-SOD uzrokuje amiotrofičnu lateralnu sklerozu (ALS), tešku neurodegenerativnu bolest koja pogađa motorne neurone, moždano deblo i leđnu moždinu (Miao i St. Clair, 2010; Tapiero i sur., 2003).

Dva važna enzima za čije je djelovanje nužan bakar su lizil oksidaza i diamin oksidaza (Tapiero i sur., 2003; Bost i sur., 2016). Lizil oksidaza je enzim koji djeluje u području izvanstaničnog matriksa različitih organa i tkiva, uključujući kosti i hrskavice, gdje ima važnu ulogu u stvaranju, sazrijevanju i stabilizaciji vezivnog tkiva (Tapiero i sur., 2003). Unutar izvanstaničnog matriksa sudjeluje u stvaranju intra- i intermolekularnih križnih veza komponenti izvanstaničnog matriksa, što doprinosi stvaranju tkivno-specifičnog izvanstaničnog matriksa pojedinog tkiva, pretežito izvanstaničnog matriksa kože, pluća, kardiovaskularnog i epitelnog tkiva. Za aktivaciju lizil oksidaze neophodan je optimalna koncentracija bakra, kao i transportni proteini specifični za bakar (CTR1) i ATP7A ATP-aza (Laczko i Csiszar, 2020). Diamin oksidaza (DAO) je enzim kodiran AOC1 genom. Njegova funkcija je oksidativna deaminacija primarnih amina, pretežito egzogenog histamina. Djeluje u maternici, bubrezima, plućima, tankom crijevu, plućima te manjim dijelom u mozgu. Kod deficita bakra, smanjena je aktivnost DAO što može dovesti do intolerancije na histamin (McGrath i sur., 2009). Histamin je sastavni dio brojnih prehrambenih proizvoda (ribe, mesa, i mesnih prerađevina, mliječnih proizvoda, alkohola). Intolerancija na histamina nastaje kao posljedica narušavanja ravnoteže između nakupljanja histamina i njegove razgradnje katalizom DAO, što dovodi do raznih simptoma koji nalikuju na simptome alergijske reakcije. Neki od njih su proljev, glavobolja, rinokonjunktivitis, astma, hipotenzija, aritmija, urtikarija, pruritis (Comas-Basté i sur., 2020; Maintz i Novak, 2007).

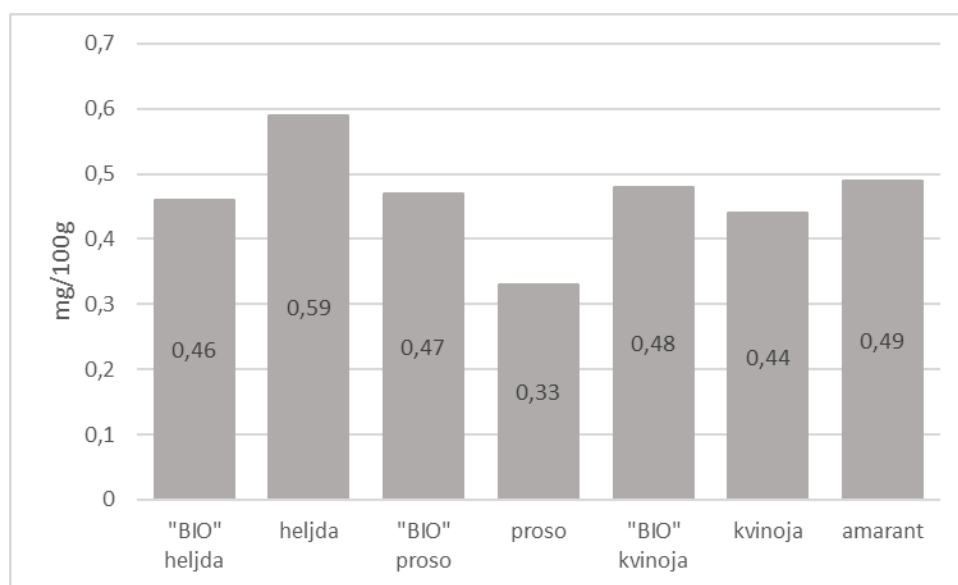
4.6.3. Bakar i antimikrobni učinak

Bakar u suvišku djeluje toksično, što se očituje u stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) Fentonovom reakcijom. ROS oštećuju okolna tkiva djelujući na stanične proteine, lipide i nukleinske kiseline (Bost i sur., 2016; Tapiero i sur., 2003). Ipak, takav mehanizam toksičnosti doprinosi imunološkom odgovoru urođene imunosti protiv određenih vrsta patogena u kojemu sudjeluju makrofagi. Susretom makrofaga i mikroba dolazi do nastanka fagolizosoma, u kojemu se odvija razgradnja mikroba uslijed djelovanja ROS, koji su dijelom nastali zbog prisutnosti povišene koncentracije bakra, kao i niskog pH, RNS i proteaza. Unos više koncentracije bakra u makrofage se odvija putem CTR1 transportera visokog afiniteta i aktivacijom ATP7A, ATP-aze specifične za bakar. Takav mehanizam je uočen kod infekcije *M. tuberculosis*, *E. coli*, *Salmonelle* i *C. albicans*. Osim toga, domaćin se protiv mikroba brani tako da im ograničava dostupnost bakra potrebnog za aktivaciju enzima. Kao odgovor na takav imunološki odgovor domaćina, mikrobi su razvili vlastite mehanizme rezistencije. Sadrže ATP-aze koje suvišan bakar odvođe iz stanice te metalotioneine koji vežu suvišan bakar te na taj način sprječavaju njegovo toksično djelovanje (Besold i sur., 2016).

Povišena koncentracija bakra u serumu može biti pokazatelj upalnog stanja u organizmu, naročito upale uzrokovane bakterijama, virusima i gljivicama (Besold i sur., 2016). Koncentracija bakra se može mjeriti i indirektnom metodom mjerenja ceruloplazmina. Ceruloplazmin je monomerni glikoprotein, koji veže 6 atoma bakra (Kirsipuu i sur., 2020), zbog čega i blagi porast ceruloplazmina u serumu dovodi do izraženog porasta koncentracije bakra. Uz to što je protein akutne faze pa time njegova koncentracija raste u stanju upale, postoji teorija da prenosi bakar na mjesto upale te da pojedina tkiva i limfociti sadrže receptore za ceruloplazmin preko kojih bakar ulazi u stanicu (Besold i sur., 2016).

4.6.4. Sadržaj bakra u pseudožitaricama

Sadržaj bakra u uzorcima pseudožitaricama izmjeren je ICP-MS metodom. Usporedba srednjih vrijednosti rezultata prikazana je vertikalnim stupčastim dijagramom (Slika 2.). U prosu je izmjeren najmanji sadržaj bakra – 0,33 mg na 100 g uzorka. Heljda sadrži najviše bakra. 0,59 mg na 100 g, što iznosi oko 40% preporučenog dnevnog unosa (www.efsa.gitlab.io/multimedia/drvs/index.htm).



Slika 2. Usporedba sadržaja bakra (mg/100g) u psudožitaricama

4.7. SELEN

Selen je kemijski element koji pripada u skupinu prijelaznih metala. U ljudskom organizmu je prisutan u vrlo malim količinama, ali ima vrlo važnu ulogu, stoga se kao i cink i bakar ubraja u skupinu esencijalnih elemenata u tragovima (Roman i sur., 2014). U organizmu je prisutan u obliku selenoproteina, kojih je do sada u ljudskom organizmu pronađeno 25 (Avery i Hoffmann, 2018). Prehranom se pretežito unosi u obliku selenometionina (SeMet), selenata, selenita i selenocisteina (SeCys). Selenometionin i selenocistein su organski oblici koji se smatraju aminokiselinama, dok se selenat i selenit ubrajaju u anorganske oblike (Roman i sur., 2014). Ima ulogu u brojnim fiziološkim procesima u kojima sudjeluje kao antioksidans, utječe na metabolizam hormona štitnjače, oksido-redukcijske reakcije te na reproduktivni i imunostani sustav (Avery i Hoffmann, 2018; Thomson, 2004). Kofaktor je antioksidativnih enzima iz skupine glutaciona peroksidaza i tioredoksin reduktaza (Kiełczykowska i sur., 2016; Roman i sur., 2014) te jodotironin dejodinaza, skupine enzima uključenih u metabolizam hormona štitnjače (Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). Deficit selena može biti podloga za razna patološka stanja, kao i suvišak, kada pokazuje toksičan učinak (Rayman, 2020; Avery i Hoffmann, 2018; Kiełczykowska i sur., 2016).

4.7.1. Homeostaza selena

Apsorpcija selena odvija se u tankom crijevu u području duodenuma te na samom početku debelog crijeva, u visokom udjelu od 70-90% (Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). Odvija se različitim mehanizmima, ovisno o obliku u kojemu je selen unesen u organizam (Roman i sur., 2014). Selenometionin se apsorbira na tri načina. Prvi je transportom ovisnim o natrijevim ionima. Putem drugog mehanizma se prvo transformira u selenocistein, zatim u selenid koji se kao takav apsorbira putem membranskih transportnih proteina. Treći mehanizam je takav da se selenometionin nespecifično veže za serumski albumin i hemoglobin tako da se ugradi u proteinski lanac umjesto metionina, kao i aminokiseline, zbog čega se i smatra aminokiselinom. Selenit se u visokom udjelu apsorbira indirektno putem glutaciona, koji je prisutan u gastrointestinalnoj tekućini. Selenit reagira neenzimatski s tiolnim skupinama glutaciona pri čemu nastaje selenodiglutacion, koji se uz enzim glutacion reduktazu postepeno razgrađuje do krajnjeg produkta selenida. Direktnom

apsorpcijom selenit se apsorbira u manjem udjelu, do 60%. Mehanizam je isti kao kod indirektna apsorpcije, osim što se reakcija redukcije odvija na eritrocitima. Treći mehanizam apsorpcije selenita je direktna redukcija do selenida tijekom reakcije u kojoj sudjeluje enzim tioredoksin reduktaza, čiji je supstrat. Selenat se apsorbira paracelularno pasivnom difuzijom (Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013).

Nakon apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, produkti odlaze u jetru koja je ključan organ u daljnjem metabolizmu selena do različitih selenoproteina te njihovog izlučivanja iz organizma (Roman i sur., 2014). U jetri se između ostalih metabolita sintetizira i selenoprotein-P koji veže do 60% apsorbiranog selena, čija je uloga prijenos selena kroz krvotok te distribucija u tkiva (Roman i sur., 2014; Brown i Arthur, 2001). Najviše selena se pohranjuje u obliku selenometionina u jetri (30%) i mišićima (30%), zatim u bubrezima (15%), plazmi (10%), a ostatak (15%) u ostalim organima, od kuda se selen nadoknađuje u slučaju deficita (Mehdi i sur., 2013).

Put i mehanizam izlučivanje selena iz organizma ovisi o njegovoj koncentraciji u organizmu. U slučaju suviška selena, krajnji produkt koji se izlučuje je trimetilselenid. Nastaje dodatnom metilacijom metiltransferazama već metiliranih produkata, najčešće selenometilcisteina i selenobetaina. Kao međuprodukt u toj reakciji nastaje dimetilselenid, koji se za razliku od trimetilselenida koji se izlučuje urinom, izlučuje izdisanjem. Pri normalnoj koncentraciji selena, iz selenida nastaje intermedijarni konjugat seleno-šećera, koji podliježe daljnjoj transformacijom te se krajnji produkt izlučuje urinom (Roman i sur., 2014).

Deficit selena može biti podloga za razvoj raznih patoloških stanja. Dvije rijetke bolesti karakteristične za područja Kine i Rusije su Keshanova i Kashin-Beckova bolest (Rayman, 2020; Avery i Hoffmann, 2018; Roman i sur., 2014). Osobe u deficitu su također podložne virusnim infekcijama te dolazi do slabljenja funkcije cjelokupnog imunskog sustava, a u težem deficitu i do smanjene fertilitet, poremećaja štitnjače, demencije, dijabetesa tipa II, karcinoma prostate, kolorektalnog karcinoma i brojnih drugih patoloških stanja (Rayman, 2020). Suvišak selena uzrokuje selenozu, patološkog stanja u kojemu dolazi do ispadanja kose, deformacije noktiju, propadanja zubi, neugodnog zadaha, gastrointestinalnih smetnji, osipa te neuroloških simptoma (Roman i sur., 2014). Suvišak također može uzrokovati brojna patološka stanja kao što su alopecija, dermatitis,

hepatomegalija, polineuritis, može povećati rizik od određenih vrsta karcinoma, narušiti funkciju endokrinog i imunološkog sustava (Rayman, 2020; Roman i sur., 2014).

4.7.2. Selenoproteini

Do sada je pronađeno 25 proteina uključenih u ljudski proteom koji u svojoj strukturi sadrže selen. Njihov zajednički naziv je selenoproteini (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014). U skupinu selenoproteina se, između ostalih proteina, ubrajaju i pet enzima iz skupine glutathion peroksidaza, tri iz skupine jodotironin dejodinaza te tri iz skupine tioredoksin reduktaza (Mangiapane i sur., 2014). Osnovna funkcija im je transport i skladištenje selena u organizmu. Iako sve njihove uloge još uvijek nisu do kraja istražene, neke su već poznate. Osim što su važan dio antioksidativne obrane organizma, uključeni su u sintezu deoksiribonukleozid trifosfata (dNTP), monomera čijom polimerizacijom nastaje DNA. Imaju ulogu u redukciji oksidiranih proteina i membrana, regulaciji transkripcijskih faktora redukcijско-oksidacijskim procesima, regulaciji apoptoze, imunomodulaciji, regulaciji hormona štitnjače, smatanju proteina u endoplazmatskom retikulumu (Roman i sur., 2014).

Skupina antioksidacijskih enzima glutathion peroksidaza (GPx) sadrži osam izoformi enzima, od kojih pet sadrži ogranak selenocisteina, zbog čega se ubrajaju u skupinu selenoproteina (Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). To su glutathion peroksidaza 1 (GPx1), GPx2, GPx3, GPx4 i GPx6 (Mangiapane i sur., 2014). Njihova glavna funkcija je neutralizacija vodikovog peroksida te lipidnih i drugih organskih hidroperoksida redukcijom uz glutathion u unutar- i izvanstaničnim odjeljcima (Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). Svih pet izoformi ima isti katalitički mehanizam (Mangiapane i sur., 2014). Selen se nalazi u aktivnom središtu enzima kojeg stabilizira i aktivira katalitička trijada bočnih ogranaka selenocisteina, triptofana i glutamina (Roman i sur., 2014). Istovremeno s redukcijom vodikovog peroksida se događa oksidacija ogranka selenocisteina (selenoatnog aniona – selenola) u kiselinu. Nastala kiselina zatim reagira s reduciranim oblikom glutathiona te nastaje selenosulfidni adukt (E-Se-SG). U zadnjem koraku dolazi do regeneracije aktivnog oblika enzima, kada druga molekula reduciranog glutathiona razdvoji adukt na disulfidni glutathion (GS-SG) i aktivni oblik enzima (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014). Od svih pet izoformi glutathion peroksidaze, najviše je izoforme GPx1 (Mangiapane i sur., 2014). GPx1 je homotetramerni enzim koji je aktivan u citosolu, te manjim dijelom u mitohondriju. Prisutan je u cijelom organizmu, a najveća aktivnost je zabilježena u tkivu jetre, u eritrocitima,

bubrezima i plućima (Mnagiapanei sur., 2014; Mehdi i sur. 2013). Najosjetljiviji je na promjene koncentracije selena od svih izoformi GPx (Mangiapane i sur., 2014) te mu je enzimska aktivnost izravno proporcionalna unosu selena (Mehdi i sur., 2013). GPx2 je aktivan u području gastrointestinalnog trakta, gdje štiti crijevni epitel i epitel skvamoznih stanica jednjaka od slobodnih radikala uzrokovanih oksidativnim stresom u organizmu. Aktivnost GPx2 je zabilježena i u jetri (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). GPx3 se smatra biomarkerom koncentracije ukupnog selena u plazmi unesenog prehranom te sadrži 10-30% ukupnog selena u plazmi, ovisno o trenutnoj koncentraciji selena (Mangiapane i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). Glikozilirani je protein homotetramerne strukture koji se sintetizira u bubregu, u proksimalnom tubularnom epitelu i u parijetalnim stanicama Bowmanove kapsule. Dio enzima ostaje vezan u bubregu, dok se dio raspodjeljuje u plazmu (Roman i sur., 2014). Aktivnost GPx3 je zabilježena i u gastrointestinalnom sustavu, srcu, štitnjači, plućima, maternici i muškom reproduktivnom sustavu (Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). GPx4 je monomerni unutarstanični enzim prisutan u citoplazmi, mitohondriju i jezgri (Roman i sur., 2014). Njegova aktivnost je primarno uočena u testisima (Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). Doprinosi funkciji plodnosti kod muškaraca jer utječe na sazrijevanje, kretanje i funkciju spermija. Također ima važnu antioksidacijsku ulogu u organizmu. (Mehdi i sur., 2013). Za razliku od ostalih GPx, osim vodikovog peroksida kao supstrat koristi i lipidne hidroperokside koje veže izravno te reducira vodikov peroksid, fosfolipidni-, kolesterol-, kolesteril ester-hidroperoksid i tiamin-hidroperoksid pomoću glutaciona te također pomoću tiolnih skupina drugih proteina (Roman i sur., 2014). GPx6 je peta izoforma GPx. Bliski je homolog GPx3 (Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). Njegova aktivnost je uočena u embrijima i olfaktornom epitelu (Roman i sur., 2014).

Jodotironin dejodinaze su skupina membranskih proteina (enzima) koja sadrži tri izoforme. DIO1 i DIO3 su dio stanične membrane, a DIO2 membrane mitohondrija. Pripadaju u skupinu oksidoreduktaza te sadrže selenocistein u aktivnom središtu enzima (Roman i sur., 2014). Uključeni su u metabolizam hormona štitnjače koji sudjeluju u regulaciji raznih metaboličkih procesa kao što su metabolizam lipida, termogeneza, rasta te razvoja mozga kod fetusa (Roman i sur., 2014). Mehanizam djelovanja im je takav da DIO1 i DIO2 kataliziraju aktivaciju, a DIO3 inaktivaciju hormona štitnjače - tiroksina (T4), trijodtironina (T3) i rT3 (Roman i sur., 2014; Brown i Arthur, 2001). Osim u štitnjači, nalaze se i u drugim tkivima. DIO1 je također prisutna u jetri, bubrezima i smeđem adipoznom tkivu.

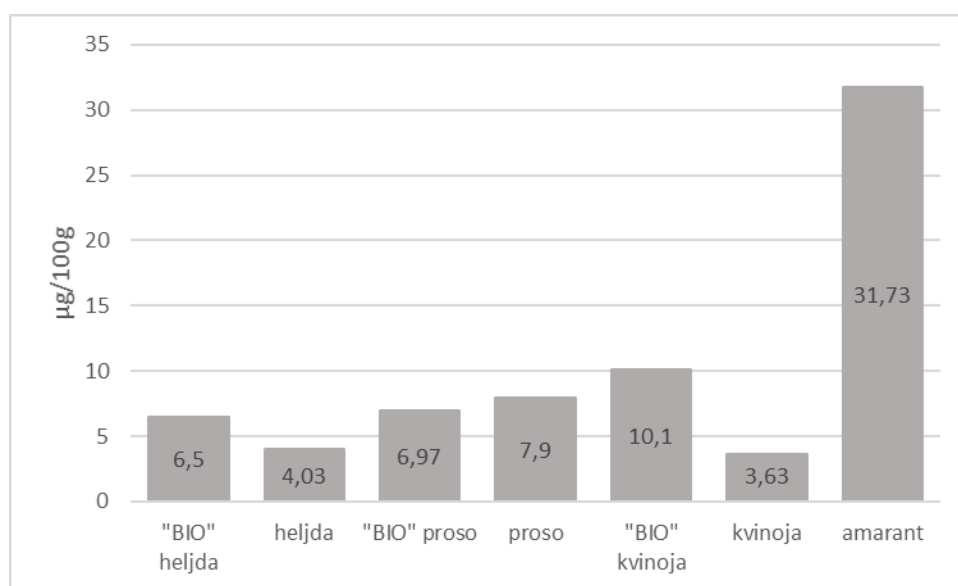
DIO2 je u najvećem udjelu prisutna u središnjem živčanom sustavu, smeđem adipoznom tkivu i skeletnim mišićima, a DIO 3 u tkivu fetusa (Mehdi i sur., 2013).

Tioredotsin reduktaze (TrxR) su homodimeri. Pripadaju u skupinu piridin nukleotid disulfid reduktaze (skupina oksidoreduktaza) (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014). Sadrže selenocistein u aktivnom središtu (Brown i Arthur, 2001). Djeluje u tri izoforme – TrxR1, TrxR2 i TrxR3 (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). TrxR1 se nalazi u citoplazmi i u jezgri stanice, TrxR2 u mitohondriju i to pretežito u stanicama prostate, jetre i tankog crijeva, dok je tioredoksin-glutation reduktaza (TrxR3) specifična za testise (Mangiapane i sur., 2014). Sadrže FAD prostetičku skupinu, stoga prema strukturi pripadaju u skupinu flavoproteina. FAD služi kao posrednik u prijenosu elektrona s NADPH na aktivno mjesto enzima prilikom njegove aktivacije (Roman i sur., 2014). Aktivirani enzim zatim reducira oksidirani oblik tioredoksina (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014). Tioredoksini su skupina proteina male molekulske mase (10-12 kDa) koji su uključeni u djelovanje nekoliko enzima kao što su ribonukleotid reduktaza, tioredoksin peroksidaza te određenih transkripcijskih faktora (Roman i sur., 2014). Osim što djeluju na tioredoksine, imaju ulogu faktora rasta u sintezi DNA te inihibiraju apoptozu (Mehdi i sur., 2013). Treba napomenuti i da se povećana aktivnost TrxR se povezuje s nekoliko vrsta tumora i tumorskih staničnih linija (Mangiapane i sur., 2014).

Od ostalih selenoproteina koji nisu sastavni dio enzima treba istaknuti selenoprotein P, glikozilirani protein koji sadrži deset bočnih ogranaka selenocisteina, čija je funkcija transport i skladištenje selena u organizmu (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014). Sintetizira se u jetri iz selena unesenog prehranom, nakon čega odlazi u plazmu kojom se distribuira u tkiva. U tkivima se selen oslobađa iz kompleksa selenoproteina P te se koristi za sintezu drugih selenoproteina (Mangiapane i sur., 2014). Prenosi oko 60% selena u plazmi (Brown i Arthur, 2001). Osim transportne funkcije, bitan je i u antioksidacijskoj obrani organizma jer je uključen u aktivnost glutacion peroksidaze (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014; Brown i Arthur, 2001). Povezan je i s patofiziologijom Alzheimerove bolesti, kod koje je uočeno kako patološki β -amiloidni plakovi zamjenjuju selenoprotein P u mozgu (Mangiapane i sur., 2014).

4.7.3. Sadržaj selena u pseudožitaricama

Sadržaj selena u uzorcima pseudožitaricama izmjeren je ICP-MS metodom. Usporedba srednjih vrijednosti rezultata prikazana je vertikalnim stupčastim dijagramom (Slika 3.). Pseudožitarica koja sadrži najmanje selena je kvinoja. Sadrži 3,63 μg selena na 100 g, dok ga je u uzorku „BIO“ kvinoje gotovo tri puta više. Značajno viši sadržaj selena izmjeren je u amarantu, čak 31,73 μg na 100g, što čini 45% preporučenog dnevnog unosa koji iznosi 70 μg za odrasle osobe (www.efsa.gitlab.io/multimedia/drvs/index.htm).



Slika 3. Usporedba sadržaja selena ($\mu\text{g}/100\text{g}$) u pseudožitaricama

5. ZAKLJUČCI

1. Pseudožitarice (heljda, kvinoja, amarant i proso) su skupina namirnica visoke nutritivne kvalitete, stoga njihovo uključivanje u prehranu može povoljno utjecati na cjelokupno zdravlje. Imaju povoljan omjer makronutrijenata (ugljikohidrata, masti i proteina) te su dobar izvor mikronutrijenata (vitamina i minerala) kao i ostalih bioaktivnih spojeva kao što su bio i polifenoli te flavonoidi.

2. Metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektroskopijom (ICP-MS) u ispitivanim uzorcima izmjerena je značajna količina cinka, bakra i selena, mikroelemenata važnih za odvijanje brojnih fizioloških procesa u organizmu. Njihov deficit kao i suvišak mogu dovesti do raznih fizioloških poremećaja u organizmu te biti podloga za razvoj brojnih kroničnih bolesti.

3. Izmjereni sadržaj cinka u uzorcima pseudožitarica iznosi od 1,64 do 2,36 mg na 100 g, ovisno o vrsti pseudožitarice. Bioraspoloživost mu je smanjena zbog prisustva fitinske kiseline, koja djeluje inhibirajuće na apsorpciju cinka na način da veže cink u gastrointestinalnom traktu. Cink ima važnu ulogu u funkciji imunološkog sustava, staničnoj signalizaciji, aktivaciji brojnih enzima i transkripcijskih faktora djelujući kao njihov kofaktor, mehanizmima sinteze i popravka DNA i RNA, antioksidacijskom sustavu te u brojnim drugim fiziološkim procesima.

4. Izmjereni sadržaj bakra u uzorcima pseudožitarica iznosi od 0,33 do 0,59 mg na 100 g uzorka, ovisno o vrsti pseudožitarice, što je oko 40% preporučenog dnevnog unosa. Sudjeluje kao kofaktor u brojnim enzimima u procesu oksidativne fosforilacije gdje je uključen u lanac prijenosa elektrona, u procesu apsorpcije željeza, funkciji imunološkog sustava te u djelovanju antioksidacijskog sustava organizma.

5. Izmjereni sadržaj selena u uzorcima iznosi od 3,63 do 31,73 μg na 100g, ovisno o vrsti pseudožitarice. Kao i cink i bakar, selen ima vrlo bitnu ulogu u funkciji cjelokupnog organizma zbog svog antioksidativnog djelovanja. Uz to utječe na metabolizam hormona štitnjače, oksido-redukcijske reakcije, na reproduktivni i imunološki sustav.

6. LITERATURA

1. Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, Selenoproteins and Immunity. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1203.
2. Bekkering CS, Tian L. Thinking Outside of the Cereal Box: Breeding Underutilized (Pseudo) Cereals for Improved Human Nutrition. *Front Genet*, 2019, 10: 1289.
3. Besold AN, Culbertson EM, Culotta VC. The Yin and Yang of Copper During Infection. *J Biol Inorg Chem*, 2016, 21(2): 137-144.
4. Bost M, Houdartb S, Oberlib M, Kalonji E, Huneauc JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol*, 2016, 35: 107-115.
5. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr*, 2001, 4(2B): 593-599.
6. Cherasse Y, Urade Y. Dietary Zinc Acts as a Sleep Modulator. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2334.
7. Christa K, Soral-Śmietana M. Buckwheat Grains and Buckwheat Products – Nutritional and Prophylactic Value of their Components – a Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 2008, 26(3): 153-162.
8. Collins JF, Klevay LM. Copper. *Advances in Nutrition*, 2: 520-522.
9. Comas-Basté O, Sánchez-Pérez S, Veciana-Nogués MT, Latorre-Moratalla, Vidal-Carou MC. Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules*, 2020, 10(8): 1181.
10. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59(4): 627-647.

11. Czlonkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V, Rybakowski JK, Weiss KH, Schilsky ML. Nature Reviews Disease Primers article: Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 4(1): 21.
12. Dietary Reference Values for the EU, 2019., <https://efsa.gitlab.io/multimedia/drvs/index.htm>, pristupljeno 3.7.2021.
13. Enogieru AB, Haylett W, Hiss DC, Bardien S, Ekpo OE. Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018(1): 1-17.
14. Gordillo-Bastidas E, Díaz-Rizzolo DA, Roura E, Massanés T, Gomis R. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), from Nutritional Value to Potential Health Benefits: An Integrative Review. *J Nutr Food Sci*, 2016, 6:3.
15. Guengerich FP. Introduction to Metals in Biology 2018: Copper homeostasis and utilization in redox enzymes. *J Biol Chem*, 2018, 293(13): 4603–4605.
16. Jancurová M, Minarovičová L, Dandár A. Quinoa – a Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 2009, 27(2): 71-79.
17. Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Młyniec K, Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacol*, 2017, 25(1): 11-24.
18. Kiełczykowska M, Kocot J, Paździor M, Musik I. Selenium – a fascinating antioxidant of protective properties. *Adv Clin Exp*, 2018, 27(2): 245-255.
19. Kirsipuu T, Zadorožnaja A, Smirnova J, Friedemann M, Plitz T, Tõugu V, Palumaa P. Copper(II)-binding equilibria in human blood. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 5686.
20. Konstantinov AA. Cytochrome *c* oxidase: Intermediates of the catalytic cycle and their energy-coupled interconversion. *FEBS Lett*, 2011, 586(5): 630-639.
21. Kreft I, Germ M. Organically Grown Buckwheat as a Healthy Food and a Source Of Natural Antioxidants. *Agronomski Glasnik*, 2008, 70(4): 397-406.

22. Krishnan R, Meera MS. Pearl millet minerals: effect of processing on bioaccessibility. *J Food Sci Technol*, 2018, 55(9): 3362-3372.
23. Laczko R, Csiszar K. Lysyl Oxidase (LOX): Functional Contributions to Signaling Pathways. *Biomolecules*, 2020, 10(8): 1093.
24. Lin PH, Sermersheim M, Li H, Lee PHU, Steinberg SM, Ma J. Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients*, 2017, 10(1): 16.
25. Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr*, 1996, 63: 797-811.
26. Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr*, 2007, 85(5): 1185-1196.
27. Mangiapane E, Pessione A, Pessione E. Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems. *Curr Protein Pept Sci*, 2014, 15(6): 698-607.
28. McGrath AP, Hilmer KM, Collyer CA, Shepard EM, Elmore BO, Brown DE, Dooley DM, Guss JM. The structure and inhibition of human diamine oxidase. *Biochemistry*, 2009, 48(41): 9810–9822.
29. Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules*, 2013, 18: 3292-3311.
30. Miao L, St. Clair DK. Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(4): 344-356.
31. Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, Nakagawa K, Miyazawa T. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life*, 2019, 71(4): 430-441.
32. Nakashima A, Yamada K, Iwata O, Sugimoto R, Atsuji K, Ogawa T, Ishibashi-Ohgo N, Suzuki K. β -Glucan in Foods and Its Physiological Functions. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2018, 64(1): 8-17.
33. Nutrition Data, <https://www.nutritiondata.self.com>, pristupljeno 11.6.2021.

34. Rak M, Bénit P, Chrétien D, Bouchereau J, Schiff M, El-Khoury R, Tzagoloff A, Rustin P. Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Deficiency. *Clin Sci*, 2016, 130(6): 393–407.
35. Rayman MP. Selenium intake, status, and health: a complex relationship. *Hormones*, 2020, 19(9): 14.
36. Read SA, Obeid S, Ahlenstiel C, Ahlenstiel G. The Role of Zinc in Antiviral Immunity. *Adv Nutr*, 2019, 10(4): 696-710.
37. Renganathan VG, Vanniarajan C, Karthikeyan A i Ramalingam J. Barnyard Millet for Food and Nutritional Security: Current Status and Future Research Direction. *Front Genet*, 2020, 11:500.
38. Rodríguez JP, Rahman H, Thushar S, Singh RK. Healthy and Resilient Cereals and Pseudo-Cereals for Marginal Agriculture Molecular Advances for Improving Nutrient Bioavailability. *Front Genet*, 2020, 11:49.
39. Roman M, Jitaru P, Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*, 2014, 6: 25-54.
40. Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci*, 2013, 18(2): 144-157.
41. Saleh ASM, Zhang Q, Chen J, Shen Q. Millet Grains: Nutritional Quality, Processing, and Potential Health Benefits. *Compr Rev Food Sci F*, 2013, 12: 281-295.
42. Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68(2): 447S-463S.
43. Singh P, Singh Raghuvanshi R. Finger millet for food and nutritional security. *African Journal of Food Science*, 2012, 6(4): 77-84.
44. Skrajnowska D, Bobrowska-Korczak B. Role of Zinc in Immune System and Anti-Cancer Defense Mechanisms. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2273.

45. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57(9): 399-411.
46. Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr*, 2004, 58: 391-402.
47. Tümer Z, Møller LB. Menkes Disease. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18: 511-588.
48. Valcárce Yamani B, Caetano da Silva Lannes S. Applications of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) and Amaranth (*Amaranthus* Spp.) and Their Influence in the Nutritional Value of Cereal Based Foods. *Food and Public Health*, 2012, 2(6): 265-275.
49. Wessels I, Maywald M, Rink L. Zinc as a Gatekeeper of Immune Function. *Nutrients*, 2017, 9(12): 1286.
50. Wilschefski SC, Baxter MR. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin Biochem Rev*, 2019, 40(3): 115–133.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Pseudožitarice su skupina namirnica visoke nutritivne vrijednosti. Od običnih žitarica ih razlikuje viši udio proteina povoljnijeg aminokiselinskog sastava, viši udio lipida te nešto niži udio ugljikohidrata, od kojih pretežito sadrže „nerazgradivi“ škrob s visokim udjelom amilopektina koji je jedan od najboljih prebiotika. Također su bogatije mikronutrijentima, posebno elementima u tragovima – cinkom, bakrom i selenom. Sadržaj pojedinih mikronutrijenata/elementa u tragovima u ispitivanim pseudožitaricama (heljda, kvinoja, amarant i proso) određena je metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektroskopijom (ICP-MS). Ti mikroelementi imaju nezamjenjive uloge u pravilnom funkcioniranju ljudskog organizma. Uključeni su u djelovanje imunološkog sustava, kofaktori su brojnih enzima, a djeluju i kao antioksidansi. Ipak, njihov deficit, kao i suvišak, mogu biti uzrok razvoja različitih patoloških stanja u organizmu.

Pseudograins are a group of grains with a better nutritional profile than traditional grains such as corn, rice or wheat. They contain more protein with better amino acid composition, have higher lipid content and fewer carbohydrates, which mostly include resistant starch that is composed of a high percentage of amylopectin and serves as prebiotic. They also have better micronutrient composition, including trace elements – zinc, copper and selenium. They were determined in pseudograins (buckwheat, quinoa, amaranth and millet) by Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) method. Zinc, copper and selenium have irreplaceable roles in the adequate function of human organism. They function as a part of immune system, work as cofactors of numerous enzymes and they are part of the antioxidant system. The deficit, as well as excess, can cause a lot of different pathological conditions in the organism.

8. PRILOZI

Tablica 5. Rezultati mjerenja sadržaja cinka (mg/100g) u pseudožitaricama u triplikatu, srednje vrijednosti i standardne devijacije

	„BIO“ heljda	Heljda	„BIO“ kvinoja	Kvinoja	„BIO“ amarant	„BIO“ proso	Proso
1.	1,55	1,95	2,15	1,92	2,14	2,08	1,68
2.	1,46	1,86	2,29	2,97	2,16	1,84	1,86
3.	1,92	1,92	2,29	2,18	2,20	1,83	1,53
\bar{x}	1,64	1,91	2,24	2,36	2,17	1,92	1,69
SD	0,24	0,04	0,08	0,55	0,03	0,14	0,17

Tablica 6. Rezultati mjerenja sadržaja bakra (mg/100g) u psudožitaricamav u triplikatu, Srednje vrijednosti i standardne devijacije

	„BIO“ heljda	Heljda	„BIO“ kvinoja	Kvinoja	„BIO“ amarant	„BIO“ proso	Proso
1.	0,40	0,59	0,47	0,43	0,52	0,58	0,46
2.	0,38	0,59	0,48	0,44	0,48	0,39	0,25
3.	0,59	0,59	0,48	0,46	0,48	0,43	0,29
\bar{x}	0,46	0,59	0,48	0,44	0,49	0,47	0,33
SD	0,11	0,00	0,007	0,02	0,02	0,1	0,11

Tablica 7. Rezultati mjerenja sadržaja selena ($\mu\text{g}/100\text{g}$) u pseudožitaricama u triplikatu, srednje vrijednosti i standardne devijacije

	„BIO“ heljda	Heljda	„BIO“ kvinoja	Kvinoja	„BIO“ amarant	„BIO“ proso	Proso
1.	<0,5	1,6	<0,5	2,5	33,9	4,2	2,8
2.	5,2	2,7	10,1	4,0	32,2	3,2	12,5
3.	7,8	7,8	10,1	2,2	29,1	13,5	8,4
\bar{x}	6,5	4,0	10,1	2,4	31,7	7,0	7,9
SD	3,7	3,3	5,5	0,6	2,4	5,7	4,9

Tablica 8. DRV (Dietary Reference Values) za cink (mg/dne)
(www.efsa.gitlab.io/multimedia/drvs/index.htm)

Dob	Spol	AR	UL
		(Average requirement)	(Upper limit)
7-11 mjeseci	M/Ž	2,4	ND
1-3 godine	M/Ž	3,6	7
4-6 godina	M/Ž	4,6	10
7-10 godina	M/Ž	6,2	13
11-14 godina	M/Ž	8,9	18
15-17 godina	M	11,8	22
15-17 godina	Ž	9,9	22
≥ 18 godina	M	10,1	25
≥ 18 godina	Ž	8,3	25
trudnice	Ž	(+) 1,6	25
dojilje	Ž	(+) 2,4	25

Tablica 9. DRV (Dietary Reference Values) za bakar (mg/dne)

(www.efsa.europa.eu/multimedia/drvs/index.htm)

Dob	Spol	AI (Adequate intake)	UL (Upper limit)
7-11 mjeseci	M/Ž	0,4	ND
1-2 godine	M/Ž	0,7	1
3 godine	M/Ž	1	1
4-6 godina	M/Ž	1	2
7-9 godina	M/Ž	1	3
10 godina	M	1,3	3
10 godina	Ž	1,1	3
11-17 godina	M	1,3	4
11-17 godina	Ž	1,1	4
≥ 18 godina	M	1,6	5
≥ 18 godina	Ž	1,3	5
trudnice	Ž	1,5	ND
dojilje	Ž	1,5	ND

Tablica 10. DRV (Dietary Reference Values) za selen ($\mu\text{g}/\text{dne}$)

(www.efsa.europa.eu/multimedia/drvs/index.htm)

Dob	Spol	AI (Adequate intake)	UL (Upper limit)
7-11 mjeseci	M/Ž	15	ND
1-3 godine	M/Ž	15	60
4-6 godine	M/Ž	20	90
7-10 godina	M/Ž	35	130
11-14 godina	M/Ž	55	200
15-17 godina	M/Ž	70	250
≥ 18 godina	M/Ž	70	300
trudnice	Ž	70	300
dojilje	Ž	85	300

Određivanje cinka, bakra i selen u pseudožitaricama i njihova fiziološka uloga

Lucija Vuković

SAŽETAK

Pseudožitarice su skupina namirnica visoke nutritivne vrijednosti. Od običnih žitarica ih razlikuje viši udio proteina povoljnijeg aminokiselinskog sastava, viši udio lipida te nešto niži udio ugljikohidrata, od kojih pretežito sadrže „nerazgrađivi“ škrob s visokim udjelom amilopektina koji je jedan od najboljih prebiotika. Također su bogatije mikronutrijentima, posebno elementima u tragovima – cinkom, bakrom i selenom. Sadržaj pojedinih mikronutrijenata/elementa u tragovima u ispitivanim pseudožitaricama (heljda, kvinoja, amarant i proso) određena je metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektroskopijom (ICP-MS). Ti mikroelementi imaju nezamjenjive uloge u pravilnom funkcioniranju ljudskog organizma. Uključeni su u djelovanje imunološkog sustava, kofaktori su brojnih enzima, a djeluju i kao antioksidansi. Ipak, njihov deficit, kao i suvišak, mogu biti uzrok razvoja različitih patoloških stanja u organizmu.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 44 stranica, 3 grafičkih prikaza, 10 tablica i 50 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Pseudožitarice, heljda, kvinoja, amarant, proso, cink, bakar, selen, ICP-MS

Mentor: **Dr. sc. Donatella Verbanac**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lovorka Vujić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of medical biochemistry and haematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Determination of zinc, copper and selenium in pseudograins and their physiological function

Lucija Vuković

SUMMARY

Pseudograins are a group of grains with a better nutritional profile than traditional grains such as corn, rice or wheat. They contain more protein with better amino acid composition, have higher lipid content and fewer carbohydrates, which mostly include resistant starch that is composed of a high percentage of amylopectin and serves as prebiotic. They also have better micronutrient composition, including trace elements – zinc, copper and selenium. They were determined in pseudograins (buckwheat, quinoa, amaranth and millet) by Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) method. Zinc, copper and selenium have irreplaceable roles in the adequate function of human organism. They function as a part of immune system, work as cofactors of numerous enzymes and they are part of the antioxidant system. The deficit, as well as excess, can cause a lot of different pathological conditions in the organism.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 44 pages, 3 figures, 10 tables and 50 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Pseudograins, buckwheat, quinoa, amaranth, millet, zinc, copper, selenium, ICP-MS

Mentor: **Donatella Verbanac, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Roberta Petlevski, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, Ph.D. *Docent*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2021.