

Ana Ajduković

**Koncentracija oksidiranih proteina kod
pacijenata s bolestima štitnjače**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Stanična biologija s osnovama genetike Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ana-Marije Domijan.

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan, na strpljenju, stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju na pruženoj pomoći i korištenju sredstava i potrebne opreme zavoda.

Roditeljima, obitelji i prijateljima se zahvaljujem na bezgraničnoj podršci, pomoći i razumijevanju tijekom studija.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Štitnjača.....	2
1.1.1. Građa štitnjače	2
1.1.2. Hormoni štitnjače i sinteza hormona štitnjače.....	3
1.1.3. Regulacija lučenja hormona štitnjače	4
1.1.4. Bolesti štitnjače.....	5
1.2. Oksidacijski stres	7
1.2.1. Oksidacijski stres	7
1.2.2. Slobodni radikali.....	8
1.2.3. Izvori slobodnih radikala	10
1.2.4. Obrana od oksidacijskog stresa	12
1.2.5. Praćenje oksidacijskog stresa	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1.1. Kemikalije.....	18
3.1.2. Oprema.....	18
3.1.3. Ispitanici i prikupljanje uzoraka	20
3.2. Metode	21
3.2.1. Princip metode spektrofotometrijskog određivanja proteinskih karbonila....	21
3.2.2. Priprema otopina.....	21
3.2.3. Postupak.....	22
3.2.4. Statistička obrada podataka	25
4. REZULTATI	26
4.1. Antropološki podaci ispitanika istraživanja.....	27
4.2. Proteinski karbonili.....	27
5. RASPRAVA	29
6. ZAKLJUČCI.....	35
7. LITERATURA	37
8. SAŽETAK/SUMMARY	43
9. PRILOZI.....	46
9.1. Kratice.....	47

1.UVOD

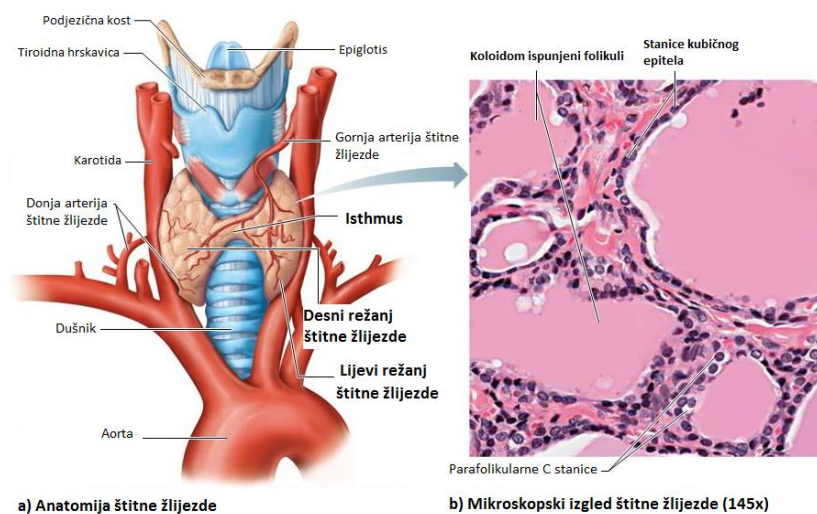
1.1. Štitnjača

1.1.1. Građa štitnjače

Štitna žlijezda ili štitnjača (lat. *thyreoidea*, grč. *thyreos* - štit, *eidos* - oblik) je neparna žlijezda s unutarnjim izlučivanjem koja se ubraja u skupinu najprokrvljenijih organa ljudskoga tijela. Smještena je ispred dušnika u prednjem dijelu vrata te okružuje dušnik (Guyton i sur., 2006; Krmpotić-Nemanić i sur., 2007). Žlijezda je isprepletana limfnim putevima i brojnim živčanim vlaknima.

Sastoji se od dva režnja, lijevoga i desnoga (*lobus dexter* i *lobus sinister*), koje povezuje suženi dio štitne žlijezde (*isthmus gl. thyroideae*) u razini druge do četvrte hrskavice dušnika (Slika 1a). Zbog toga štitna žlijezda ima oblik slova H, odnosno građom nalikuje leptiru. Suženi dio može nedostajati i biti zamijenjen vezivnim tkivom pa se doima da su režnjevi žlijezde međusobno odijeljeni. U približno 50 % osoba nalazimo i treći režanj, *lobus pyramidalis*, koji je vezivnim tkivom pričvršćen za jezičnu kost. Svaki režanj širok je od 2 do 2,5 cm i dugačak 4 cm. Volumen štitnjače je od 15 do 30 cm³, a masa normalne štitnjače iznosi od 15 do 20 g što ovisi o njezinom funkcionalnom stanju, spolu osobe, hormonskom statusu te dobi osobe (Vinter, 2009).

Štitna žlijezda sastoji se od velikoga broja zatvorenih folikula koji su ispunjeni izlučenom tvari nazvanom koloid, a obložene kubičnim epitelnim stanicama (tirociti), koje luče u unutrašnjost folikula (Slika 1b). Glavni sastojak koloida je tireoglobulin, veliki glikoprotein na koji su vezani hormoni štitnjače.



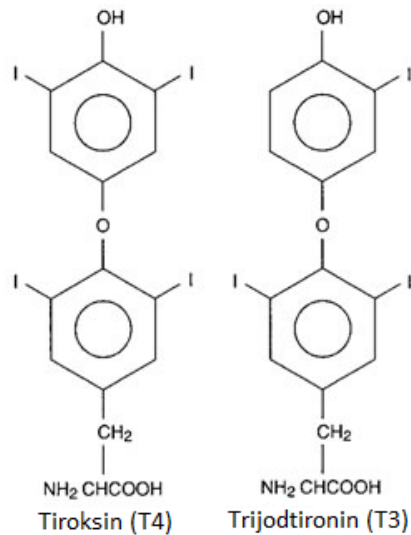
Slika 1.: a) Smještaj štitne žlijezde i b) mikroskopski izgled štitne žlijezde (preuzeto s <http://slideplayer.com/slide/273764/> i prilagođeno)

1.1.2. Hormoni štitnjače i sinteza hormona štitnjače

Štitnjača luči dva važna hormona: tiroksin (T4) i trijodtironin (T3), a njihova kemijska struktura prikazana je na slici 2. Ovi hormoni važni su za uravnoteženu funkciju cijeloga organizma. Djeluju na dišni i krvožilni sustav, mozak, kretanje, spavanje i probavu te rad ostalih žlijezda kao što su spolne žlijezde. T4 i T3 sudjeluju u održavanju bazalnoga metabolizma stanica. Njihov manjak može usporiti metabolizam do 40 %, a višak može ubrzati metabolizam za čak 60 – 100 %. Štitnjača luči i kalcitonin, hormon važan u metabolizmu kalcija (Guyton i Hall, 2006; <http://stitnjaca.com/>).

Za sintezu hormona štitnjače, prvenstveno T4, neophodan je jod. Jodidi se, nakon apsorpcije iz probavnoga sustava u krv, simportom s natrijem prenose u stanice štitnjače, tireocite, gdje se koriste za sintezu hormona štitnjače. U tireocitima se pretvaraju u oksidirani oblik joda (J^0 ili J_3^-) uz pomoć peroksidaze i vodikova peroksida (H_2O_2) kao reducensa. Ta ista peroksidaza katalizira i spajanje oksidiranoga joda s tireoglobulinom, točnije njegovim tirozinskim ostatkom. Tirozin se jodira u monojodtirozin i ponovno u dijodtirozin nakon čega dolazi do međusobnoga povezivanja više jodtirozinskih ostataka. Glavni proizvod toga niza reakcija je hormon T4 koji nastaje spajanjem dviju molekula dijodtirozina. T3 pak nastaje spajanjem monojodtirozina s jednom molekulom dijodtirozina (Guyton i Hall, 2006).

Štitnjača je jedinstvena po tome što jedina među endokrinim žlijezdama ima sposobnost pohraniti sintetizirane hormone u svojim folikulima. Kada se ukaže potreba, sintetizirani hormoni se proteazama odcjepljuju od molekula tireoglobulina i slobodni otpuštaju u krv. Po završetku sinteze hormona štitnjače, svaka molekula tireoglobulina sadrži i do 30 molekula T4 i nekoliko molekula T3. Ovako pohranjeni hormoni dostatni su za opskrbu tijela hormonima tijekom dva do tri mjeseca. Zapravo se otprilike samo četvrtina jodiranog tirozina u tireoglobulinskoj molekuli prevede u hormone štitnjače, a ostatak ostaje u molekuli kao monojodtirozin i dijodtirozin. Ovi jodirani tirozini ne izlučuju se u krv već enzim dejodaza odcjepljuje njihove molekule joda. Tako „pohranjen“ jod može se ponovno iskoristiti u štitnjači za sintezu dodatnih količina hormona (Guyton i Hall, 2006).

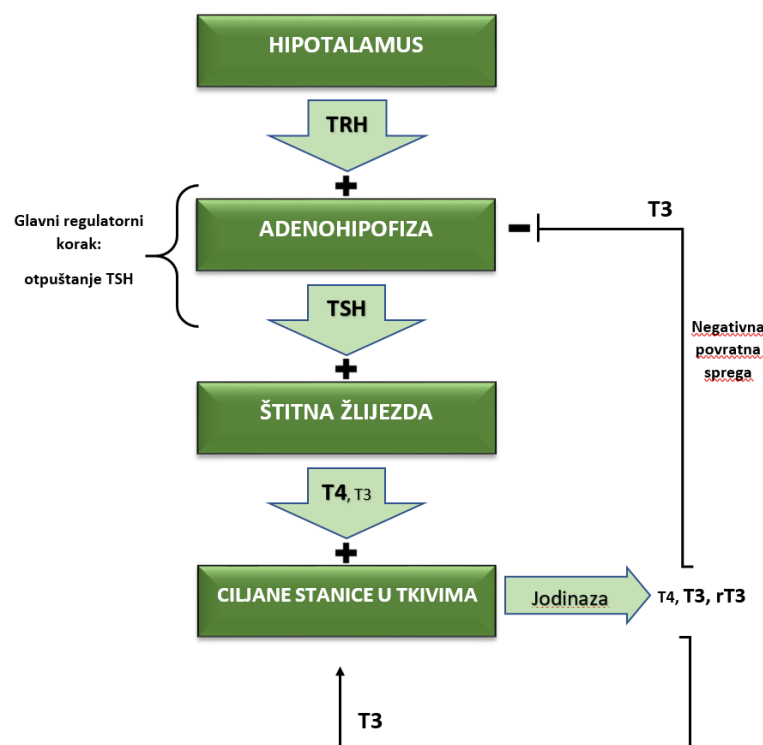


Slika 2.: Kemijska struktura hormona štitnjače T4 i T3 (preuzeto sa <http://medicinabih.info/2011/07/23/tireoidni-hormoni/>)

1.1.3. Regulacija lučenja hormona štitnjače

Kako bi se održala normalna metabolička aktivnost organizma, u svakom trenutku se mora izlučivati točno određena količina hormona štitnjače. Radom štitnjače u fiziološkim okolnostima upravljaju hipotalamus i hipofiza mehanizmom povratne sprege kako je prikazano na slici 3. U kontroli lučenja hormona štitnjače najvažnija je adenohipofiza koja pomoću tireotropina (TSH) potiče štitnjaču na lučenje T4 i T3, ali i na rast, što može dovesti do povećanja štitnjače odnosno gušavosti (strume). TSH aktivira drugi glasnik, ciklički adenzin-monofosfat (cAMP) u stanici, što dovodi do sljedećih učinaka: povećane proteolize tireoglobulina pohranjenoga u folikulima kako bi slobodni T4 i T3 mogli biti otpušteni u krv, povećava se rad jodidne pumpe i jodiranje tirozina, povećava se volumen i sekrecijska djelatnost stanica štitnjače te se povećava broj samih stanica štitnjače (Guyton i Hall, 2006).

Lučenje TSH iz adenohipofize nadzire se iz hipotalamusa hormonom koji oslobađa tireotropin (TRH). TRH izravno potiče žljezdane stanice adenohipofize na povećano lučenje TSH. Pri povećanju koncentracije hormona štitnjače u tjelesnim tekućinama negativnom se povratnom spregom fiziološki smanjuje lučenje TSH i adenohipofize i time prekida daljnja stimulacija lučenja hormona štitnjače (Guyton i Hall, 2006; Krmpotić-Nemanić i sur., 2007).



Slika 3.: Regulacija lučenja hormona štitnjače

1.1.4. Bolesti štitnjače

Bolesti štitnjače oduvijek su predstavljale područje ljudskoga interesa zahvaljujući svojoj širokoj prevalenciji. Prvi zapisi o gušavosti potječu iz 2700. godine prije nove ere. Štitnjača kao organ se spominje već u antičkoj Grčkoj, indijskoj i egipatskoj medicini (Niazi i sur., 2011).

Među bolestima endokrinog sustava, bolesti štitnjače su danas druge po učestalosti u svijetu (odmah iza šećerne bolesti), a njihova incidencija je i dalje u porastu. Pritom žene obolijevaju gotovo deset puta češće od muškaraca (Heuck i sur., 2000). Bolesti štitne žlijezde karakterizirane su kvalitativnim i kvantitativnim promjenama lučenja hormona i/ili povećanjem štitnjače (vidljivo kao guša). Nedostatno lučenje hormona štitnjače rezultira hipotireozom i usporenosti cjelokupnoga organizma dok pojačano lučenje rezultira hipertireozom i ubrzanošću metabolizma. Tumori najčešće uzrokuju lokalizirano povećanje štitne žlijezde (Kujundžić i sur., 2003).

Dijagnostički postupak započinje razgovorom s pacijentom, uzimanjem osobne anamneze i kliničkim pregledom. Nakon toga slijedi laboratorijska dijagnostika koja podrazumijeva određivanje niza parametara koji pomažu u ocjeni funkcije štitnjače. Osnovno je odrediti hormone štitnjače u serumu i TSH. Mogu se odrediti ukupne vrijednosti T4 i T3 u

serumu, ali bolju korelaciju s funkcijom štitnjače pokazuju njihove slobodne frakcije. Ipak, određivanje TSH predstavlja najbolji parametar funkcije štitnjače (Marinković, 2003).

Niske koncentracije T3 i T4 u cirkulaciji u kombinaciji s porastom lučenja TSH karakteristična su slika nedostatne funkcije štitnjače. S druge strane, prekomjerna funkcija štitnjače rezultira povišenim koncentracijama T3 i T4 u cirkulaciji kao i posljedično smanjenim izlučivanjem TSH (Kujundžić i sur., 2003).

Među najučestalije bolesti štitnjače ubrajaju se papilarni karcinom, benigne neoplazije, strume i autoimunosti poremećaji poput Hashimotovog tiroiditisa. Republika Hrvatska zauzima visoko četvrto mjesto po broju oboljelih od raka štitnjače u europskim zemljama dok je smrtnost od karcinoma štitnjače u Republici Hrvatskoj na sedamnaestom mjestu (Vučemilo i sur., 2015).

Papilarni karcinom štitnjače (lat. *Ca papillare glandulae thyreoideae*) je najčešće maligno oboljenje štitne žlijezde, s udjelom od oko 80 %. Bolest je i do tri puta češće zastupljena kod žena, a rijetko se pojavljuje u dječjoj dobi. Ukupna pojavnost se kreće od 3 do 5 slučajeva na 100 000 stanovnika. Histološki slični tkivu štitnjače od kojega nastaje. Karakterizira ga spori rast, a u preko 95 % slučajeva ograničen je na područje vrata. Može se proširiti u okolno tkivo štitnjače, kao i okolne strukture u području vrata, prvenstveno u limfne čvorove. Mutacije nekoliko gena povezuju se s nastankom papilarnog karcinoma štitnjače, i to BRAF, RET, a gubitak funkcije tumora supresorskog gena p53 može dovesti do prijelaza papilarnog u iznimno maligni anaplastični tip. Prvi izbor u liječenju je operativni zahvat. Najčešće se radi totalna tireodektomija, iako se može razmotriti i uklanjanje jednog čvora – lobektomija, i to kod malih tumora do centimetra veličine. Daljnji oblici liječenja uključuju postoperativnu adjuvantnu radioterapiju jodom, a ona se provodi kod visokorizičnih pacijenata s diferenciranim papilarnim karcinomom štitnjače (Vrkljan, 2013). Kirurško liječenje gotovo uvijek dovodi do izlječenja, a hormoni štitnjače se primjenjuju u dozama koje suprimiraju lučenje TSH kako bi se smanjila mogućnost recidiva bolesti (<http://www.cybermed.hr/>).

Folikularni adenom (benigna neoplazija) štitnjače (lat. *adenoma folliculare*) dobroćudna je i učahurena novotvorina građena od folikularnih stanica štitnjače. Bolest se očituje kao povećanje cijele štitnjače ili u obliku čvorića. Pretpostavlja se da oko 20 do 50 % stanovništva ima čvorove u štitnjači. Čvor u štitnjači je promjena koja se palpacijski i/ili ultrazvučno razlikuje od tkiva štitnjače koje ju okružuje. Pojavljuje se kao klinička manifestacija različitih bolesti štitnjače, benignih i malignih. Svojim nastankom i rastom vrši pritisak na okolne strukture, a liječi se kirurški (Jukić i Kusić, 2013).

Struma ili guša (lat. *struma colloidis nodularis*) je povećanje štitne žlijezde koje se javlja kod gotovo svih poremećaja štitnjače. U pravilu nije udruženo s funkcionalnim, upalnim ni neoplastičnim promjenama već je posljedica hipertrofije i hiperplazije folikularnog epitela štitnjače. Može biti izazvana nekim od poremećaja koji koče proizvodnju hormona štitnjače: nedostatnim unosom joda (u pojedinim dijelovima svijeta; endemska gušavost), kemikalijama ili je pak nepoznate etiologije (idiopatski tip). Češće se pojavljuje u žena nego u muškaraca. Karakterističan izgled guše nastaje zbog lokalnoga pritiska povećane štitnjače na okolne strukture, posebice na gornju šuplju venu što dovodi do zastoja krvi u glavi i licu. Također, guša sama može proizvoditi višak hormona (toksična guša) te se javljaju simptomi hipertireoze dok se kod netoksične guše javljaju simptomi hipotireoze (Gamulin i sur., 2005). Povećanje štitnjače može biti difuzno, ravnomjerno, no većinom je nodularno, tj. u obliku pojedinačnih ili višestrukih čvorova (multinodularna struma). Pretpostavlja se da broj oboljelih od strume u svijetu iznosi 200 do 800 milijuna ljudi. Za sprečavanje nastanka ove bolesti provodi se jodiranje kuhinjske soli što je kod nas regulirano zakonom iz 1953. godine, a 1996. godine je donesena dopuna Zakona koja je precizirala da u kuhinjskoj soli mora biti najmanje 25 miligrama kalijeva jodida po kilogramu soli što se smatra optimalnom količinom joda koja osigurava normalan rad štitnjače (Strinović, 2013).

Hashimotov tiroiditis (kronični limfocitni tireoiditis, Hashimotova struma ili autoimuni tireoiditis) predstavlja kroničnu upalu štitne žlijezde. Bolest je karakterizirana infiltracijom štitnjače limfocitima i povećanom vrijednosti protutijela na nekoliko komponenti tkiva štitnjače. Najvažniju ulogu igraju protutijela na tireoglobulin i na tireoidnu peroksidazu. Bolest je češća u žena srednje životne dobi. Predstavlja jedan od najčešćih uzroka primarne hipotireoze jer zbog kroničnoga tijeka bolesti dolazi do progresivne zamjene tkiva štitnjače limfocitima i fibroznim tkivom (Kujundžić i sur., 2003).

1.2. Oksidacijski stres

1.2.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres nastaje kao posljedica poremećaja oksidacijsko-redukcijskih procesa u organizmu pri čemu je ravnoteža pomaknuta prema oksidaciji. Pri tome nastaju slobodni radikali od kojih su najčešći reaktivni kisikovi spojevi (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*), koji oštećuju stanične makromolekule poput proteina, lipida, ugljikohidrata i DNK

(Čepelak i Dodig, 2003; Reuben, 1998). Oštećenje staničnih makromolekula, točnije njihova oksidativna modifikacija, dovodi do niza promjena u stanici poput gubitka fluidnosti staničnih membrana, inaktivacije membranskih enzima, ubrzane proteolize, poremećaja prijenosa signala u stanici i posljedično smrti stanice (Čepelak i Dodig, 2003). Stoga se oksidacijski stres povezuje s nastankom mnogih bolesti. Primjerice šećerna bolest, reumatoidni artritis, psorijaza, kardiovaskularne bolesti, sterilnosti muškaraca, starenje, nastanak raka te niz neuroloških bolesti kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest povezuju se s oksidacijskim stresom.

Ipak, oksidacijski stres ne mora nužno biti štetan. Pri fiziološkim koncentracijama ROS-ovi su uključeni u staničnu signalizaciju, staničnu proliferaciju, sudjeluju u regulaciji koncentracije kalcija u stanici, fosforilaciji proteina i uzrokuju aktivaciju pojedinih transkripcijskih faktora. Niske koncentracije ROS-ova povezuju se s povećanom proliferacijom i preživljavanjem stanica, dok povišene mogu uzrokovati staničnu smrt (Valko i sur., 2006, Hancock i sur. 2001; Circu i Aw, 2010). Danas se u liječenju raznih oblika tumora koriste lijekovi koji uzrokuju visoke i niske razine oksidacijskoga stresa kao što su Pt-spojevi (cisplatin), alkilirajući spojevi (ciklofosamid, ifosfamid, melfan), antimetaboliti, purini/pirimidini i taksani.

1.2.2. Slobodni radikali

Slobodni radikal je bilo koji atom ili molekula koji u svojoj vanjskoj ljusci sadrži jedan ili više nesparenih elektrona (Halliwell, 2007). Kemijski gledano, slobodni radikal je spoj koji posjeduje slobodni elektron ili više njih te se u biološkom sustavu smatra nestabilnom molekulom s niskom specifičnošću za reaktante. Stoga se radikali u kemijskoj reakciji oksidacije brzo i nepredvidivo spajaju s bilo kojom, prostorno bliskom molekulom proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinske kiseline (Reuben, 1998). Ova reaktivnost je rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu te spare nespareni elektron i time postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju. Pri tome mogu nastati novi radikali s mogućnošću pokretanja novoga niza neenzimskih lančanih reakcija.

ROS-ovi su djelomično reducirani i izrazito reaktivni metaboliti kisika koji nastaju uslijed prijenosa elektrona na molekulu kisika. U skupinu ROS-ova ubrajamo slobodne radikale: superoksid radikal (O_2^{\bullet}), hidroksil radikal (HO^{\bullet}), peroksilni (RO_2^{\bullet}) i alkoksilni radikal (RO^{\bullet}), kao i reaktivne intermedijere kisika. Reaktivni intermedijeri kisika su spojevi

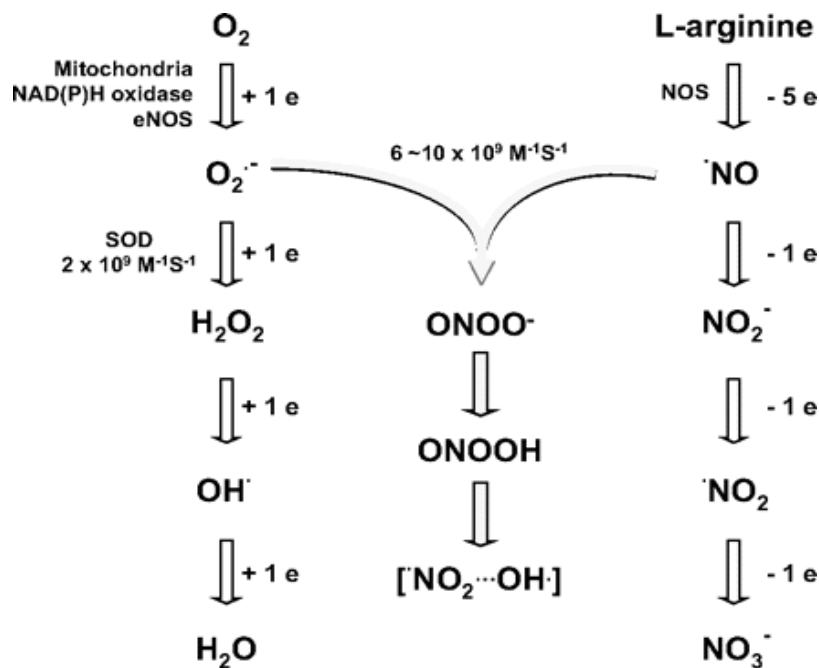
koji nisu slobodni radikali sami po sebi, ali mogu pokrenuti reakcije kojima oni nastaju. To su primjerice vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorna kiselina ($HOCl$), reaktivni (singlet) kisik ($^1\Delta gO_2$) te okolišni i endogeni ozon (O_3). $HO\cdot$ je posebno reaktivan radikal i smatra se izravno odgovornim za oksidacijska oštećenja u biološkim sustavima (Halliwell i Cross, 1994; Fleury i sur., 2002). Vrste ROS-ova prikazane su u tablici 1.

Tablica 1.: Vrste ROS-ova

Radikali		Neradikali	
Superoksid radikal	$O_2^{\cdot-}$	Vodikov peroksid	H_2O_2
Hidroksil radikal	$HO\cdot$	Hipoklorasta kiselina	$HOCl$
Peroksil radikal	RO_2^{\cdot}	Hipobromasta kiselina	$HOBr$
Alkoksil radikal	$RO\cdot$	Ozon	O_3
Hidroperoksil radikal	HO_2^{\cdot}	Singlet kisik	$^1 \Delta gO_2$

Osim ROS-ova, koji su glavni uzročnici oksidacijskoga stresa, postoje još i reaktivni ugljikovi (RCS) te reaktivni dušikovi spojevi (RNS).

Dušikov (II) oksid (NO) u suvišku također djeluje kao slobodni radikal i može prijeći u vrlo reaktivni peroksinitrit anion ($ONOO^-$), $\cdot NO_2$, ili NO_3^- . Peroksinitrit anion ($ONOO^-$) nastaje kao produkt reakcije dušikovog oksida i superoksid radikala i prilikom raspada dovodi do nitracije tirozinskih ostataka na proteinima pri čemu oni gube funkciju (Saran i sur., 1990).

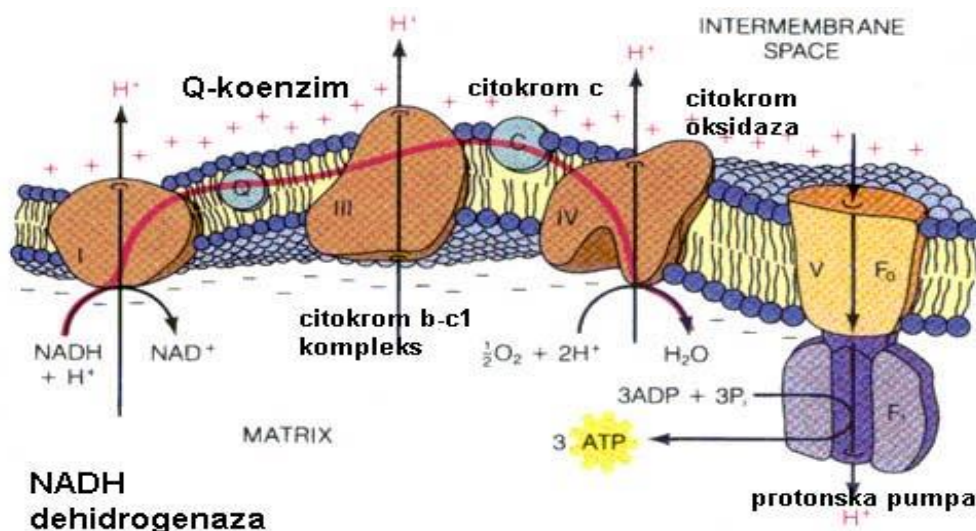


Slika 4.: Nastanak ROS i RNS u organizmu
(preuzeto s <http://circ.ahajournals.org/>)

1.2.3. Izvori slobodnih radikala

U organizmu izvori slobodnih radikala mogu biti endogeni i egzogeni. Endogeni izvori uključuju stanične organele poput mitohondrija i peroksisoma. Slobodni radikali također mogu nastati i metabolizmom pomoću citokroma P450 te prilikom upalnih procesa u stanicama (Inoue i sur., 2003). Egzogeni izvori slobodnih radikala mogu biti ionizirajuće zračenje, neionizirajuće zračenje (UV i mikrovalno), dim cigareta, lijekovi, hrana, pesticidi te različiti toksini (Møller i sur., 1996).

Najvažniji izvor endogeno nastalih ROS-ova je mitohondrij. Na unutrašnjoj membrani mitohondrija slobodni radikali nastaju tijekom procesa oksidativne fosforilacije. U tome procesu uslijed prijenosa elektrona preko kompleksa membranskih proteina u reakcijama oksido-redukcije može doći do prijevremenog „curenja“ elektrona s transportnog lanca na kisik i nastanka superoksidnih radikala kako je prikazano na slici 5. Ovo se događa u svega 3 - 5 % slučajeva i to najčešće na razini kompleksa 1 (NADH dehidrogenaza) i 3 (citokrom b-c1 kompleks) (Smith i sur., 2004; Halliwell i Gutteridge, 2007).



Slika 5.: Prijenos elektrona u procesu oksidativne fosforilacije (preuzeto s <http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/>)

U nekim stanicama, kao što su stanice imunološkog sustava, endotelne stanice, fibroblasti, tireociti i adipociti dolazi do nakupljanja ROS-ova što upućuje na to da endogeno nastali ROS-ovi imaju funkciju u tim stanicama (Cross i Jones, 1991).

Primjerice u stanicama imunološkog sustava (neutrofilima i makrofazima) slobodni radikali nastaju posredstvom enzima NADPH-oksidade (NOX) i mijeloperoksidaze (MPO) i imaju ulogu u imunološkoj obrani organizma. Prilikom fagocitoze, ROS-ovi koje proizvode fagocitni NOX, povezani su s uništavanjem patogena. Neutrofili također proizvode izvanstanični ROS za „napad“ na patogene koji su preveliki da bi bili fagocitozirani, kao što su hife *Aspergillus fulmigatus* (Dupré-Crochet i sur., 2013). Nedavni klinički nalazi upućuju na to da je stvaranje intracelularnog ROS aktivacijom NOX važno za ograničavanje upalnih reakcija i da se unutarstanična i izvanstanična proizvodnja ROS-ova drugačije reguliraju (Bylund i sur., 2010.)

Primjer su i stanice štitnjače gdje su dvojne oksidaze (DUOX), enzimi ključni za nastajanje H₂O₂ u stanicama, neophodni za sintezu hormona kataliziranu peroksidazom štitnjače (TPO). U štitnjači su prisutna dva tipa takvih oksidaza: DUOX1 i DUOX2. Oni djeluju zajedno s DUOXA1 i DUOXA2, što su faktori sazrijevanja koji dozvoljavaju DUOX enzimima translokaciju na folikularnu staničnu membranu i vršenje enzimske aktivnosti (Ohye i Sugawara, 2010). Nadalje, u humanoj štitnjači je nedavno opisan i novi unutarstanični sustav generacije ROS-ova preko NADPH oksidaze 4 (NOX4) (Mancini i sur., 2016).

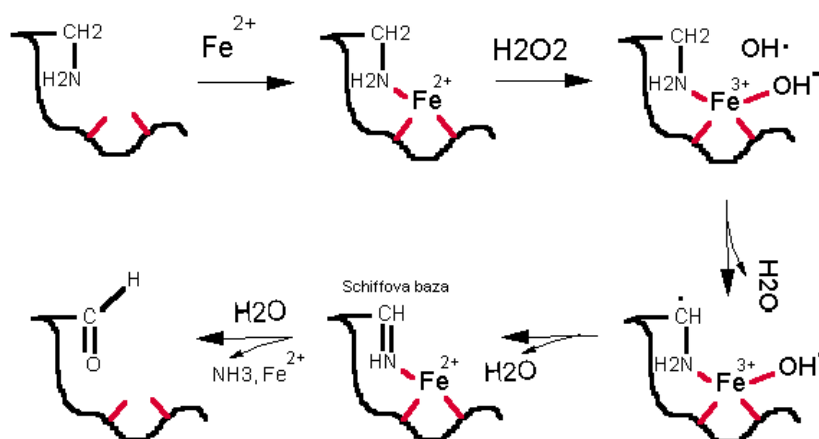
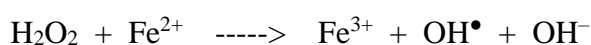
1.2.4. Obrana od oksidacijskog stresa

Za obranu od slobodnih radikala organizam je razvio učinkoviti obrambeni sustav antioksidansa. Pojam antioksidansa odnosi se na svaku molekulu koja ima sposobnost stabilizirati ili deaktivirati slobodni radikal. Antioksidansi mogu biti endogene molekule ili uneseni egzogeno, hranom ili uzimanjem dodataka prehrani. Neki sastojci hrane, koji ne djeluju tako da neutraliziraju slobodne radikale već pojačavaju djelovanje endogenih antioksidansa, također se mogu svrstati u ovu skupinu (Rahman, 2007).

Sam antioksidacijski sustav je vrlo kompleksan i uključuje primarnu antioksidacijsku obranu koja djeluje tako da sprječava nastanak ROS-ova, sekundarnu obranu koja zaustavlja lanac reakcija uzrokovanih ROS-ovima te tercijarnu obranu koja popravlja ili uklanja oštećenja nastala oksidacijskim stresom.

U primarnu obranu uglavnom se ubrajaju proteini koji vežu metale kao što su mioglobin, transferin, feritin i albumin. Oni smanjuju dostupnost iona metala koji imaju važnu ulogu u nastanku slobodnih radikala kao katalizatori pri formiranju Schiffovih baza na ograncima sa slobodnim amino skupinama kako je prikazano na slici 6.

U oštećenjima izazvanim ROS-ovima posebno je važno željezo. Superoksid reducira feri ion (Fe^{3+}) u fero ion (Fe^{2+}), što je potrebno da bi željezo sudjelovalo u formiranju hidroksil radikala koji pojačava oštećenje tkiva:



Slika 5.: Željezom posredovana oksidacija proteina

Sekundarna obrana obuhvaća enzime i neenzimatske antioksidanse koji vežu ili uklanjaju ROS-ove. To su enzimi glutacion peroksidaza (GSH-Px), glutacion reduktaza (GR), superoksid dizmutaza (SOD) i katalaza (CAT) te neenzimatski antioksidansi male molekulske mase kao što su glutacion (GSH), vitamini C i E, melatonin, razni flavonoidi i karotenoidi.

Tercijarnu obranu čine različiti enzimski sustavi koji popravljaju ili uklanjaju proteine i DNK oštećene ROS-ovima. Metionin sulfoksid reduktaza popravlja oksidirane proteine, DNK ligaza i DNK polimeraza 1 uklanjaju oštećenja na molekuli DNK, a poli-ADP-riboza-sintetaza inducira smrt oštećenih stanica kada ih nije moguće popraviti (Packer, 1995).

1.2.5. Praćenje oksidacijskog stresa

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) definirala je biomarker kao bilo koji spoj, strukturu ili proces koji se može izmjeriti u organizmu ili produktima organizma, a koji može poslužiti za predviđanje pojave bolesti ili njenoga ishoda (Frijhoff i sur., 2015).

Markeri oksidacijskoga stresa često ispunjavaju prvi dio kriterija, odnosno mogu se izmjeriti. Kako bi bio klinički koristan, biomarker također mora biti relativno stabilan, prisutan u lako dostupnom tkivu i cjenovno prihvatljiv.

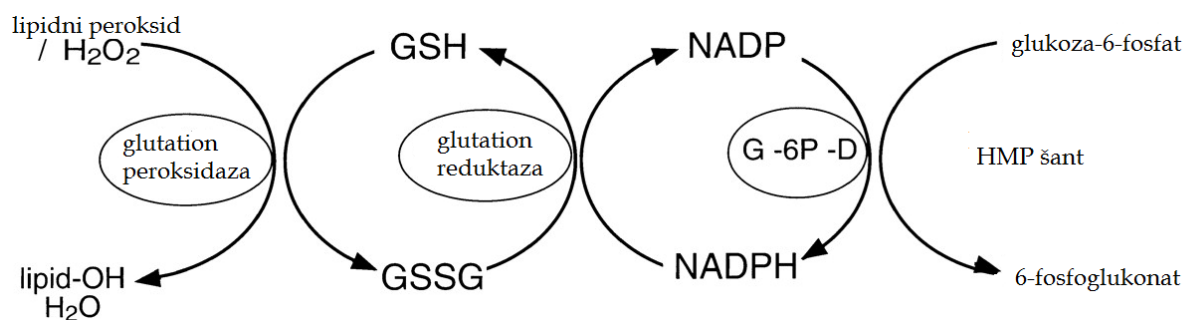
Postoje tri glavne kategorije koje mogu poslužiti za praćenje razine oksidacijskoga stresa u organizmu, a to su:

- 1) antioksidacijska obrana organizma
- 2) nakupljanje ROS-ova u stanicama
- 3) ROS-ovima izazvane modifikacije (Frijhoff i sur., 2015).

Na oksidacijski stres ukazuje snižena razina onih molekula koje sudjeluju u antioksidacijskoj obrani. Najčešće mjereni marker antioksidacijske obrane je GSH. GSH (L- γ -glutamilcisteinilglicin) predstavlja daleko najvažniji neenzimatski antioksidans u većini stanica sisavaca. Ovaj ubikvitarni tripeptid sintetizira se u citosolu i odgovoran je za mnoge stanične funkcije. Biološki aktivan oblik predstavlja reducirani glutacion (GSH) koji čini 90 % glutaciona u stanici. Unutarstanični GSH se uslijed oksidacijskoga stresa prevodi u oksidirani oblik glutacion disulfid (GSSG). GSH peroksidaza, koja katalizira redukciju H_2O_2 u prisutnosti GSH, povezana je s oksidacijom glukoza-6-fosfata i 6-fosfoglukonata koji osiguravaju NADPH potreban za redukciju GSSG pomoću GSSG reduktaze. Ovo je glavni

metabolički put H_2O_2 u većini stanica i važan je za zaštitu stanica od lipidne peroksidacije. Omjer reduciranoga i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG) koristi se kao pokazatelj stupnja oksidacijskoga stresa. Optimalan omjer GSH/GSSG u stanicama ključan je za opstanak stanica, a smanjenje koncentracije GSH predstavlja rizik za razvoj oksidacijskoga oštećenja. Zbog toga ne čudi podatak da je disbalans GSH zabilježen u mnogim bolestima te starenju (Townsend i sur., 2003).

Kako je prikazano na slici 6., GSH pretvara vodikove i lipidne perokside u netoksične spojeve, vodu ili hidroksi masne kiseline pomoću GSH-Px. Glutation disulfid (GSSG) se neprestano reducira u prisustvu NADPH i glutation reduktaze, koje su povezane heksoza monofosfatnim šantom (HMP) s glukoza-6-fosfatom i 6-fosfoglukonom djelovanjem glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (Rahman i MacNee, 1999).



Slika 6.: GSH redoks ciklus (preuzeto iz Rahman i MacNee (1999) i prilagođeno).

Zbog kratkoga poluživota u organizmu ROS-ove je teško izmjeriti. Stoga se češće kao markeri oksidacijskoga stresa koriste oštećenja makromolekula izazvana slobodnim radikalima. Ovih markera je najviše i uključuju produkte oksidacijskog oštećenja proteina (primjerice proteinske karbonile), oksidirane lipoproteine niske gustoće, produkte lipidne peroksidacije te produkte oksidacije DNK i/ili RNK (Frijhoff i sur., 2015).

Odabir biomarkera za mjerenje razine oksidacijskog stresa počinje uzorcima. Pojedini markeri lakše se određuju u određenim vrstama uzorka (stanicama, tkivima, urinu, krvi i dr.). Koncentracija mnogih biomarkera se smanjuje tijekom vremena uslijed njihovog raspada pa najbolje rezultate dobivamo u svježim uzorcima.

2.OBRAZLOŽENJE TEME

Danas bolesti štitnjače zauzimaju drugo mjesto po učestalosti među bolestima endokrinoga sustava u svijetu (odmah iza šećerne bolesti), a njihova incidencija i dalje neprestano raste. U Republici Hrvatskoj se broj oboljelih od štitnjače u zadnjih desetak godina povećao za oko 60 % (<https://www.hzjz.hr/>).

Stanice štitnjače, tireociti, neprestano proizvode umjerene količine ROS-ova koji su potrebni za sintezu hormona štitnjače. Kako bi zadržale integritet stanice su razvile nekoliko zaštitnih mehanizama obrane od ROS-ova kao što su antioksidativni enzimi, peroksiredoksini, katalaza i glutation peroksidaza. Unatoč tome, kada se ROS-ovi proizvode u velikim količinama, odnosno kada je njihova razina viša od antioksidacijskoga kapaciteta stanice, mogu postati toksični za stanicu. Prijašnja istraživanja pokazala su da su toksični produkti koji nastaju kao posljedica lipidne peroksidacije lipofuscini i 4-hidroksinonenal (4-HNE) povišeni kod gušavosti i odumirućih žlijezda (Poncin i sur., 2010). Stoga je za pretpostaviti da bi oksidacijski stres mogao biti povezan s nastankom bolesti štitnjače.

Oksidacijski stres se može pratiti promjenama koje nastaju u oksidacijskom sustavu. Jedan je pristup mjerenje razine antioksidansa čije smanjenje koncentracije ukazuje na izloženost organizma oksidacijskome stresu. Oksidacijski stres može se pratiti i mjerenjem oksidacijskoga oštećenja proteina, lipida i DNK, a čiji porast koncentracije ukazuje na oksidacijski stres (Čepalek i Dodig, 2003).

Cilj ovoga istraživanja je utvrditi postoji li veza između bolesti štitnjače i povećane razine oksidacijskoga stresa. U tu svrhu sakupiti će se krvna plazma ljudi sa dijagnozom bolesti štitnjače i zdravih osoba koje će služiti kao kontrolna skupina. U sakupljenim uzorcima plazme kao parametar oksidacijskoga stresa odrediti će se koncentracija oksidiranih proteina mjerenjem koncentracije proteinskih karbonila. Razlika u koncentraciji proteinskih karbonila između dviju skupina, oboljelih od bolesti štitnjače i kontrolne skupine, ukazat će na povezanost oksidacijskog stresa s razvojem bolesti štitnjače.

3.MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Za određivanje proteinskih karbonila u uzorku krvne plazme korištene su sljedeće kemikalije:

- trikloroocetna kiselina (TCA), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- TitriVal® Kloridna kiselina (HCl), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etanol (C₂H₆O), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etil-acetat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kalij dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- urea, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće. Za pripremu otopina korištena je de-H₂O.

3.1.2. Oprema

Korištena oprema:

- analitička vaga, Acculab, Sartorius group, Bradford, SAD
- miješalica/vortex, VORTEX 3, Ika, Staufen, Njemačka
- centrifuga, Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- ultrazvučna kupelj, Transsonic T570, Elma, Singen, Njemačka
- spektrofotometar, Agilent 8453 UV-Vis, Agilent Technologies, CA, SAD s programom za prikupljanje i obradu podataka, UV-Visible ChemStation Software, Agilent Technologies, CA, SAD
- kiveta, Open-top UV-quartz cell, Agilent Technologies, CA, SAD

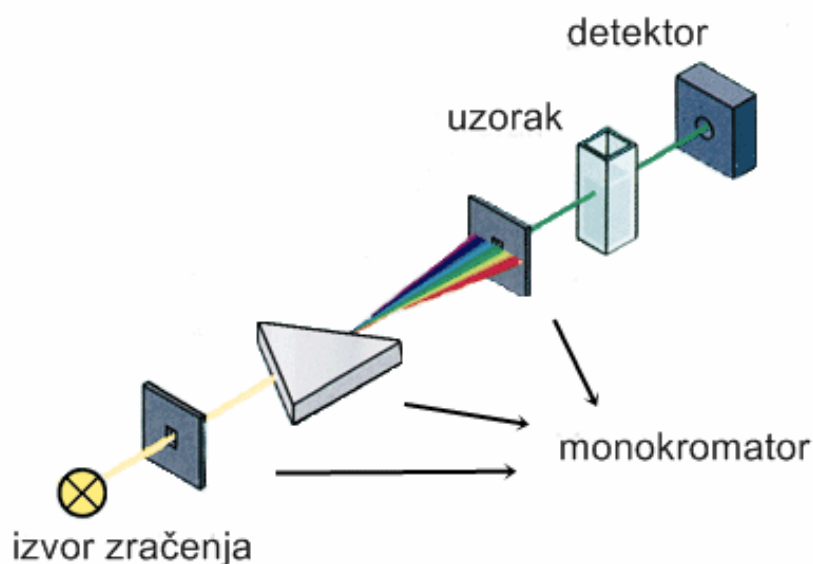
3.1.2.1. UV-Vis spektrofotometar

Za mjerenje koncentracije proteinskih karbonila korišten je UV-Vis spektrofotometar. UV-Vis spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskoga zračenja. Sadrži optički sustav za stvaranje monokromatskog svjetla valne duljine od 190 do 800 nm i odgovarajući detektor za mjerenje apsorbancije. Ispravnost instrumenta se ispituje kalibracijom skale valnih duljina i apsorbancije.

Osnovni dijelovi UV-Vis spektrofotometra su:

- izvor zračenja: deuterijeva lampa za ultraljubičasto područje i živina odnosno volframova lampa za vidljivo područje
- monokromator: optički instrument za izdvajanje zračenja sasvim uskoga područja spektra, tj. za dobivanje tzv. monokromatske (jednobojne) svjetlosti (<http://www.enciklopedija.hr/>). Može biti prizma ili rešetka s ulaznom i izlaznom pukotinom
- nosač uzorka: najčešće kiveteta (u UV području je važno koristiti kivetu od kvarcnog stakla)
- detektor zračenja (Watson, 1999).

Osnovni dijelovi UV-Vis spektrofotometra prikazani su na slici 8.



Slika 8.: Osnovni dijelovi UV-Vis spektrofotometra (preuzeto sa <https://myessozone.wordpress.com/> i prilagođeno)

3.1.2.2. Određivanje koncentracije iz apsorbancije

UV-Vis spektrofotometar funkcionira tako da mjeri apsorpciju zračenja molekule u otopini koja je definirana Beer-Lambertovim zakonom (Slika 9). Mjera količine svjetla koju apsorbira uzorak je apsorbancija. Definirana je kao dekadski logaritam recipročne vrijednosti transmisije (T) monokromatskog svjetla i prikazuje se izrazom:

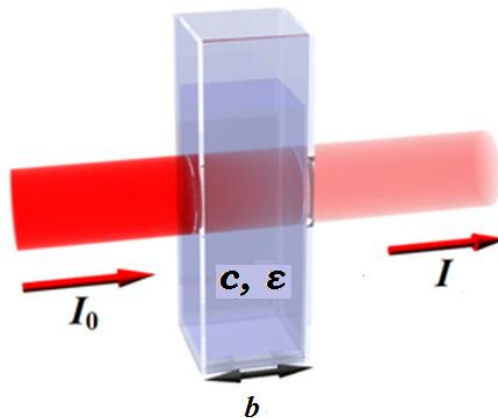
$$A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad \text{odnosno} \quad A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

pri čemu I_0 predstavlja intenzitet ulaznog monokromatskog svjetla, a I intenzitet izlaznog monokromatskog svjetla. $I < I_0$ ukazuje na to da je uzorak apsorbirao dio svjetla.

Beer-Lambertov zakon dovodi u vezu apsorpciju svjetla puštenog kroz otopinu određenog sastava s koncentracijom (c) tvari u otopini i duljinom puta svjetlosti kroz otopinu (b) i prikazuje se izrazom:

$$A = \varepsilon * c * b$$

pri čemu je ε molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) konstantan za određeni spoj i valnu duljinu pri kojoj se mjeri, b se izražava u cm, a c u mol L^{-1} (Nigović i sur., 2007).



Slika 9.: Beer-Lambertov zakon (preuzeto sa <http://cellbiologyolm.stevegallik.org/node/8>)

3.1.3. Ispitanici i prikupljanje uzoraka

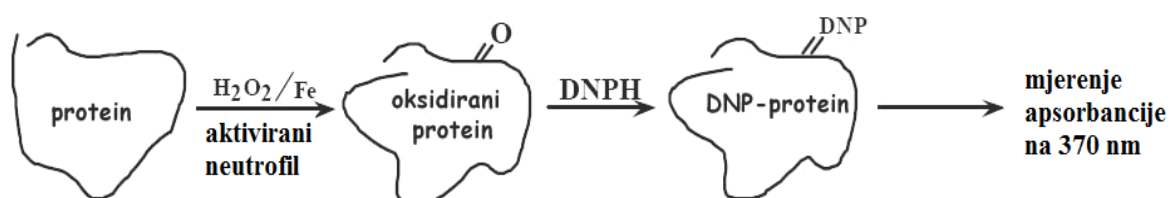
U suradnji s liječnicima bolnice KBC Sestre milosrdnice sakupljeni su uzorci krvne plazme bolesnika s bolestima štitnjače. Ukupno je prikupljeno 24 uzorka krvne plazme pacijenata s bolestima štitnjače koji su bili dijagnosticirani s papilarnim karcinomom, folikularnim adenomom te ostalim oboljenjima štitne žlijezde poput strume i Hashimotova tireoiditisa. Uz ove uzorke sakupljena su i 42 uzorka krvne plazme osoba koje su predstavljale kontrolnu skupinu. Kontrolna skupina sastojala se od zdravih ispitanika koji su po dobi, spolu i konzumaciji duhanskih proizvoda odgovarali skupini pacijenata s dijagnozom bolesti štitnjače.

Prije samoga istraživanja dobivena je potvrda Etičkoga povjerenstva KBC Sestre milosrdnice (broj: EP-717/13-14 iz 24.1.2013. godine) kao i potvrda Povjerenstva za etičnost eksperimentalnoga rada (PEER) Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Istraživanje je provedeno u skladu sa svim važećim i primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje postupaka i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovome znanstvenom istraživanju. Svaki ispitanik je prije sudjelovanja upoznat s detaljima istraživanja te je potpisao suglasnost o sudjelovanju u istraživanju uz pravo na anonimnost svakoga sudionika u istraživanju, uvid u sve svoje rezultate istraživanja, odustajanje iz istraživanja u bilo kojem trenutku bez obaveze navođenja razloga odustajanja.

3.2. Metode

3.2.1. Princip metode spektrofotometrijskog određivanja proteinskih karbonila

Proteinski karbonili određeni su reakcijom s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH). U reakciji dolazi do supstitucije karbonilne skupine proteina s DNPH pri čemu kao produkt reakcije nastaju stabilni 2,4-dinitrofenilhidrazoni koji se kvantificiraju spektrofotometrijski na 370 nm kako je prikazano na slici 10 (Lenz i sur., 1989; Dalle-Donne i sur, 2003).



Slika 10.: Vezanje DNPH za proteinski karbonil (preuzeto sa <https://www.google.com/patents/EP1758561B1> i prilagođeno)

3.2.2. Priprema otopina

10 % TCA

10 % otopina TCA pripremljena je vaganjem 10 g TCA i otapanjem u de-H₂O. Kod vaganja potrebno je obratiti pažnju jer TCA „nakuplja“ vodu. Izvagana količina kvantitativno

je prenesena u odmjernu tikvicu od 100 ml te se nadopunila s de-H₂O do oznake. Moguće je i prethodno u čaši otopiti TCA pa onda tu otopinu TCA preliti u odmjernu tikvicu od 100 ml i nadopuniti do oznake. Otopina je korištena za taloženje proteina u uzorku krvne plazme.

2 N HCl

2 N otopina HCl pripremljena je iz titrivala prema propisu proizvođača koji se nalazi na pakiranju. Otopina je korištena za pripravu reagensa 0,2 % 2,4-DNPH u 2 N HCl.

0,2 % 2,4-DNPH u 2 N HCl

Za pripremu 2,4-DNPH odvagano je 0,2 g 2,4-DNPH i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 100 ml te nadopunjeno do oznake s prethodno pripremljenim 2 N HCl. Otopina je korištena kao reagens za reakciju s proteinskim karbonilima.

etanol : etil-acetat (1:1)

Pomoću menzure uzeti su potrebni volumeni ovih otapala, u omjeru 1:1. Primjerice, uzeto je 50 ml etanola i 50 ml etil-acetata te su pomiješani u čaši volumena 200 ml. Otopina je korištena za ispiranje taloga.

6 M urea u 20 mM K-fosfatnom puferu pH 2,4

Za otopinu 6 M uree u 20 mM K-fosfatnom puferu prvo je pripremljen K-fosfatni pufer. K-fosfatni pufer pripremljen je tako da je izvagano 0,1361 g KH₂PO₄ i otopljeno u 40 ml deH₂O. U toj otopini pufera otopljeno je 18,02 g prethodno izvagane uree i nadopunjeno do 50 ml u odmjernoj tikvici. Ovu odvagu uree teško je prebaciti u odmjernu tikvicu pa je korišten lijevak. Otopina je korištena za otapanje taloga.

3.2.3. Postupak

Prema protokolu svaki uzorak treba imati i slijepu probu. Stoga su, kako bi svaki uzorak bio napravljen u duplikatu, za svaki uzorak pripremljene tri epruvete, jedna za slijepu probu te dvije epruvete za uzorka u kojem će se odvijati reakcija proteinskih karbonila s reagensom. U epruvete je stavljeno po 100 µl uzorka (plazme), a proteini su istaloženi dodatkom 100 µl 10 % TCA. Sadržaj je kratko promiješan na miješalici, centrifugiran 7 minuta na 4500 RPM te dekantiran. Za sve tri epruvete ponovljen je isti postupak. U dobiveni

talog je, za slijepu probu dodano 300 μ l 2N HCl, a u preostale dvije epruvete (uzorci) isti volumen (300 μ l) reagensa 0,2 % 2,4-DNPH. Reakcijska smjesa ostavljena je stajati sat vremena na sobnoj temperaturi u mraku, uz povremeno miješanje kako bi došlo do reakcije između 2,4-DNPH i proteinskih karbonila.

Nakon sat vremena reakcija je zaustavljena dodatkom 200 μ l 10 % TCA (u slijepu probu i u uzorke), uz ponovno taloženje proteina. Smjesa je promiješana, centrifugirana 7 minuta na 4500 RPM i dekantirana.

U uzorcima je višak reagensa ispran dodatkom 500 μ l smjese etanola i etil-acetata, nakon čega je slijedilo miješanje, centrifugiranje i dekantiranje. Postupak je ponovljen dva puta. S obzirom da u slijepu probu nije dodan reagens, slijepu probu nije potrebno prati.

Kako bi se otopio talog, u sve tri epruvete dodano je 2 ml 6M uree te su promiješane i ostavljene 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji.

UV-Vis spektrofotometar je podešen na valnu duljinu 370 nm te je izmjerena apsorbancija svakog uzorka prema svojoj slijepoj probi. Koncentracija proteinskih karbonila izračunata je prema Beer – Lambertovom zakonu danom formulom:

$$A = \epsilon * c * b$$

pri čemu je A izmjerena apsorbancija, molarni ekstinkcijski koeficijent iznosi $\epsilon_{370} = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a b je širina kivete i iznosi 1 cm.

Tablica 2.:Shematski prikaz postupka

Slijepa proba	Uzorak 1	Uzorak 2
100 µl uzorka (plazme) + 100 µl 10% TCA		
↪ miješanje na vorteksu ↪ centrifugiranje 7 minuta na 4500RPM ↪ dekantiranje		
talog + 300 µl 2N HCl	talog + 300 µl 0,2 % 2,4-DNPH	
↪ reakcijska smjesa stoji 1 h na sobnoj temperaturi, u mraku ↪ povremeno miješanje		
talog + 200 µl 10 % TCA		
↪ miješanje ↪ centrifugiranje 7 min na 4500RPM ↪ dekantiranje		
	talog + 500 µl etanol:etil-acetat	
	↪ miješanje na vorteksu ↪ centrifugiranje 7 minuta na 4500RPM ↪ dekantiranje (pranje taloga 2x)	
talog + 2 ml 6 M urea		
↪ miješanje na vorteksu ↪ otapanje taloga u ultrazvučnoj kupelji (20 min) ↪ mjerenje apsorbancije na 370 nm		
↪ Slijepa proba	↪ Uzorak 1	↪ Uzorak 2

3.2.4. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Razlike u koncentraciji proteinskih karbonila između dviju grupa ispitanika, skupine bolesnih i kontrolne skupine, uspoređene su pomoću Student t-testa. Razina značajnosti $p < 0,05$ uzeta je kao statistički značajna razlika.

Za statističku obradu podataka korišten je program Statistica Version 6.0 (StatSoft Inc. 1984-2011, USA).

4. REZULTATI

4.1. Antropološki podaci ispitanika istraživanja

U svrhu ovoga istraživanja u suradnji s liječnicima KBC Sestre milosrdnice prikupljena su 24 uzorka krvne plazme osoba dijagnosticiranih s bolestima štitnjače te 42 uzorka krvne plazme zdravih osoba (kontrolna skupina). Skupinu oboljelih od bolesti štitnjače činili su: 12 uzoraka (50 %), pacijenti dijagnosticirani s papilarnim karcinom, 6 uzoraka (25 %) pacijenti dijagnosticirani s folikularnim adenomom, a preostalih 6 uzoraka (25 %) pacijenti dijagnosticirani s bolestima štitnjače poput strume i Hashimotova tiroiditisa. Antropološki podaci sudionika istraživanja prikazani su tablicom 2.

Tablica 3.: Antropološki podaci ispitanika istraživanja

PARAMETAR	Kontrolna skupina	Skupina s bolestima štitnjače
Dob (godine)	54,9 ± 14,4	52,3 ± 12,1
Spol (ženski/muški)	29/13	16/8
Indeks tjelesne mase (BMI*)	27,7 ± 4,8	26,2 ± 4,1
Pušač/nepušač	13/29	8/16

*BMI, od engl. *body mass index*

4.2. Proteinski karbonili

Postupak mjerenja koncentracije proteinskih karbonila detaljnije je opisan u trećemu poglavlju (Materijali i metode). Proteinski karbonili izmjereni su u uzorcima krvne plazme pacijenata s dijagnozom bolesti štitnjače kao i u uzorcima plazme zdravih ispitanika (kontrolna skupina).

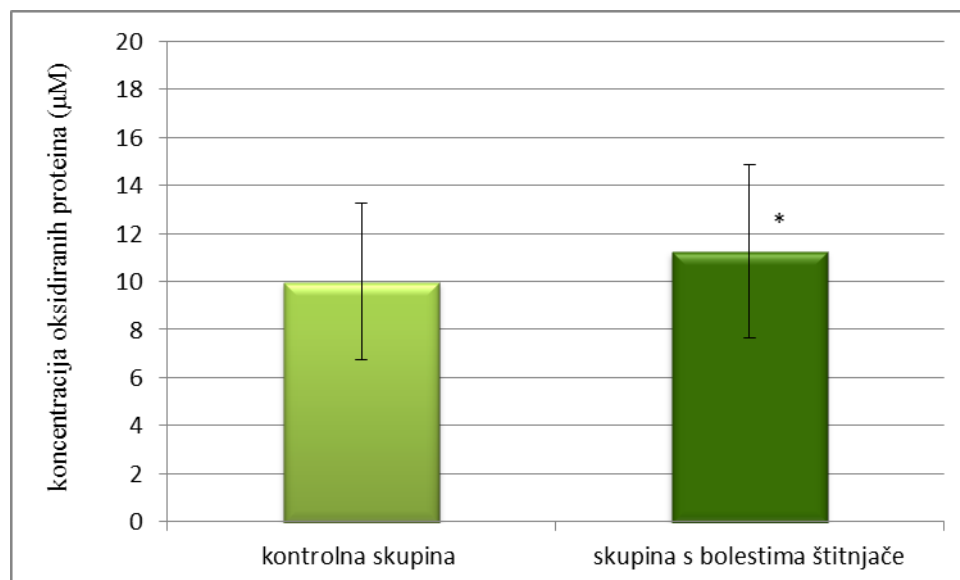
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti ± standardna devijacija koncentracije. Koncentracija proteinskih karbonila u kontrolnoj skupini iznosila je 9,99 ± 3,25 µM, a u skupini oboljelih od bolesti štitne žlijezde 11,27 ± 3,61 µM. Statistička analiza pokazala je da je koncentracija proteinskih karbonila statistički značajno povišena u skupini bolesnih

pojedinaца u odnosu na koncentraciju proteinskih karbonila u kontrolnoj skupini ($p < 0.05$; Student t-test).

Tablica 4.: Koncentracija proteinskih karbonila u kontrolnoj skupini i u skupini bolesnih

	koncentracija oksidiranih proteina (μM)
Kontrolna skupina	9,99 \pm 3,25
Skupina s bolestima štitnjače	11,27 \pm 3,61*

* Statistički značajno različito od kontrolne skupine ($p < 0,05$)



Slika 10.: Koncentracija proteinskih karbonila u kontrolnoj skupini i skupini s bolestima štitnjače; * $p < 0,05$

5. RASPRAVA

Koncept oksidacijskoga stresa prvi put je uveden i postao predmetom istraživanja redoks biologije i medicine prije više od 30 godina (Sies, 2015). Ovo područje vrlo brzo je pridobilo širok interes znanstvene populacije zbog svoje uloge u etiologiji i razvoju brojnih bolesti. Oksidacijski stres u organizmu može se pratiti mjerenjem smanjenja aktivnosti oksidacijskoga sustava, mjerenjem razine slobodnih radikala te mjerenjem razine nastalih oksidacijskih oštećenja makromolekula. Obzirom na nestabilnost slobodnih radikala i složenost antioksidacijskoga sustava, najprihvatljiviji markeri oksidacijskoga stresa su oksidacijska oštećenja makromolekula.

ROS-ovi uzrokuju oštećenja na svim vrstama makromolekula (proteini, lipidi, ugljikohidrati i DNK) u organizmu. Proteini predstavljaju važnu komponentu živih stanica. Njihova složena struktura omogućava visoku specifičnost i selektivnost u izvođenju kompleksnih bioloških funkcija, a relativno male promjene u strukturi dovode do smanjenja njihove aktivnosti (Chevion i sur., 2000). Obzirom da djeluju kao katalizatori bioloških procesa proteini predstavljaju najčešći neposredni uzročnik oksidacijske štete u organizmu pa oksidacijsko oštećenje molekule proteina ima puno veće posljedice na organizam od samoga uništenja molekule (Dalle-Donne i sur., 2003).

Stvaranje karbonilnih skupina na proteinima može biti posljedica aktivnosti oksidativnih i neoksidativnih mehanizama. Primarne modifikacije nastaju promjenom originalne strukture aminokiselina na bočnim ograncima aminokiselinskih ostataka proteina, posebno Pro, Arg, Lys i Thr. Posljedica su izravnoga djelovanja ROS-ova, odnosno oksidacije katalizirane metalima, djelovanjem zračenja, ozona, dušikovog oksida ili nekih drugih jakih oksidansa kao što su peroksinitrit i hipoklorna kiselina. Sekundarne modifikacije nastaju indirektno, kao posljedica reakcija sa sekundarnim produktima oksidacijskoga stresa, progresivnom i kovalentnom reakcijom specifičnih produkata (npr. dim cigarete, aldehidi) s proteinima koji na njima stvaraju karbonilne skupine (Adams i sur., 2001, Dalle-Donne i sur., 2003).

Koncentracija proteinskih karbonila je zapravo najopćenitiji indikator i daleko najčešće korišteni marker za oksidaciju proteina. Korištenje proteinskih karbonila kao biomarkera oksidacijskoga stresa ima nekoliko prednosti u odnosu na mjerenje drugih oksidacijskih produkata zbog njihovog izrazito ranog formiranja i relativne stabilnosti nastalih spojeva. Također, većina metoda za određivanje proteinskih karbonila ne zahtijeva specifičnu i skupu opremu pa se one mogu izvoditi u svakom normalno opremljenom biokemijskom laboratoriju. Zapravo, metode određivanja proteinskih karbonila postale su toliko široko upotrebljavane da su mnogi laboratoriji razvili vlastite postupke za njih.

Za određivanje proteinskih karbonila dostupni su mnogi testovi, a njihov odabir ovisi o uzorku kojim raspolažemo (urin, krv, plazma, homogenat tkiva), kao i samoj bolesti koja se istražuje. Obzirom da postoji znatna varijacija u bazalnim koncentracijama proteinskih karbonila u pojedinim tkivima, a ovisno o načinu izvođenja metode, bitno je navesti korištenu metodu i postupak koji se koristio pri ispitivanju.

Vrlo osjetljivi testovi za detekciju oksidiranih proteina uključuju derivatizaciju karbonilne skupine s 2,4- DNPH, što vodi do nastanka stabilnoga 2,4-dinitrofenil (DNP) hidrazonskog produkta. Mjerenje proteinskih karbonila nakon reakcije stvaranja kovalentne veze s DNPH prvi su razvili Levine i sur. (1990.) i danas ta metoda predstavlja najrašireniju metodu mjerenja oksidacije proteina (Dalle-Dono i sur., 2003).

Nastali DNP se može odrediti na više načina: spektrofotometrijski, metodom enzimskog imunotesta na čvrstoj podlozi ili ELISA testom (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) te jednodimenzionalnom ili dvodimenzionalnom elektroforezom popraćenom Western blotom. DNP skupina apsorbira ultraljubičasto zračenje i to je razlog što se ukupni sadržaj karbonila u proteinima ili smjesi proteina može odrediti spektrofotometrijski. Spektrofotometar se može povezati s frakcioniranjem proteina pomoću HPLC-a kako bi se osigurala veća osjetljivost i specifičnost metode.

U ovome istraživanju koncentracija proteinskih karbonila određena je spektrofotometrijski, nakon derivatizacije karbonilnih skupina proteina s 2,4-DNPH. Postupak je preuzet iz Dalle-Dono i sur. (2003), uz određene modifikacije postupka kako bi se prilagodio uzorcima i uvjetima u kojima se provodilo istraživanje. Za određivanje koncentracije proteinskih karbonila korišteni su uzorci plazme, koji su se uz serum, pokazali najboljim odabirom za spektrofotometrijsko određivanje proteinskih karbonila. Razlog tome je što spektrofotometrijsko određivanje proteinskih karbonila ometaju DNK i kromofori poput hemoglobina i mioglobina. DNK u svojoj strukturi sadrži karbonilne skupine koje mogu reagirati s DNPH, a kromofori apsorbiraju na 370 nm kao i DNPH te tako ometaju reakciju. Općenito, koncentracija proteina u uzorku ne bi trebala biti veća od 5 mg/ml (Dalle-Dono i sur., 2003). Kvantitativna derivatizacija zahtijeva veliku količinu reagensa pa je on prisutan u suvišku, ali kasnije mora biti otklonjen ispiranjem sa smjesom etanol:etil-acetat (1:1) kako bi se omogućilo spektrofotometrijsko određivanje hidrazona vezanog na proteine. Ovaj postupak može utjecati na rezultate na dva načina: nedovoljno ispiranje taloga rezultira zaostalim DNPH koji interferira s mjerenjem, a moguće je i gubitak proteina tijekom postupka ispiranja. Reznick i Packer (1994) tvrde da se u postupcima ispiranja izgubi i do 10-15 % proteina.

Iako ova metoda daje vrijedne informacije o odnosu između nastanka proteinskih karbonila i oksidacijskog stresa i ne zahtijeva skupu i specijaliziranu opremu, to ima i neke nedostatke. Ne daje nikakve informacije o opsegu oksidacijskog oštećenja određenoga proteina u kompleksu poput plazme, homogenata tkiva ili staničnog ekstrakta, zahtijeva više proteina nego što bi moglo biti na raspolaganju iz kliničkih uzoraka, dugotrajna je i radno zahtijevna, koraci za pranje mogu dovesti do varijabilnosti (Dalle-Donne i sur., 2003; Levine i sur., 1994; Reznick i Packer, 1994). Neki od ovih problema mogu se riješiti upotrebom HPLC-a, koji povećava osjetljivost, a Western blotom se može povećati osjetljivost i selektivnost metode. Međutim, ove metode nisu razvijene za kvantitativnu analizu (Buss i sur., 1996). Buss i sur. (1997) i Winterbourn i Buss (1999) razvili su ELISA test koji se temelji na reakciji protein-DNP veze s anti-DNP protutijelom. Slobodni DNPH i neproteinski sastojci uzorka lako se ispiru i uzrokuju minimalne interferencije. Metoda je također lakša za izvođenje, zahtijeva manje vremena i omogućava obradu većega broja uzoraka, a potrebna količina uzorka mjeri se u mikrogramima pa je primjenjiva na male uzorke. Ipak, ni ova metoda ne pruža nikakve informacije o opsegu oksidacijskoga oštećenja određenog proteina i zahtijeva donekle skupu i specijaliziranu opremu (Dalle-Donne i sur., 2003).

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi postoji li veza između oksidacijskoga stresa i bolesti štitnjače. U svrhu istraživanja sakupljeni su uzorci krvne plazme osoba s dijagnozom bolesti štitnjače i zdravih pojedinaca koji su služili kao kontrolna skupina te je u tim uzorcima izmjerena koncentracija proteinskih karbonila.

Koncentracija proteinskih karbonila u skupini oboljelih od bolesti štitne žlijezde ($11,27 \pm 3,61 \mu\text{M}$) bila je značajno viša od izmjerene koncentracije u kontrolnoj skupini ($9,99 \pm 3,25 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) što ukazuje da kod bolesnika s bolestima štitnjače dolazi do oksidacijskoga stresa.

U istraživanju koje su proveli Poncin i sur. (2010) pronađena je povišena razina produkata lipidne peroksidacije u pacijenata s gušavosti, a Koduru i sur. (2010) su u uzorcima krvi pacijenata s rakom štitnjače utvrdili povišenu razinu proteina karbonila prije operacije, u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, svi proučavani parametri oksidacijskoga stresa pokazali su značajnu razliku u njihovoj razini kod bolesnika s karcinomom štitnjače, prije i nakon tiroidektomije. U ukupno 24 sakupljena uzorka bolesnika u ovom istraživanju kod 50 % pacijenata (12 uzoraka) dijagnosticiran je papilarni karcinom, kod 25 % pacijenata (6 uzoraka) folikularni adenom, a kod preostalih 25 % (6 uzoraka) dijagnosticirana su ostala oboljenja štitnjače, guša i Hashimotov tiroiditis. Kod svih uzoraka dokazana je povišena

razina proteinskih karbonila. Ovi rezultati ukazuju na ulogu oksidacijskoga stresa kao patološke implikacije bolesti štitnjače što je u skladu s ranije navedenim istraživanjima.

U ovome istraživanju najveći broj oboljelih bile su žene, njih 16, dok je broj oboljelih muškaraca bio nešto manji, njih 8 (omjer žena u odnosu na muškarce 2:1). Ovaj podatak ne slaže se s omjerom oboljelih žena i muškaraca (4:1) koji su u svome radu o pojavi raka štitnjače u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 1988. do 2010. godine iznijeli Vučemilo i sur. (2015) i više odgovara podatku o broju umrlih od raka štitnjače u danom razdoblju (ovaj omjer iznosi 2:1). Uzrok tome možemo naći u činjenici da je taj podatak dobiven analizom cjelokupne populacije osoba oboljelih od raka štitnjače u razdoblju od 1988. do 2010. godine u Republici Hrvatskoj, dok je naš ispitivani uzorak relativno malen te uključuje i druge bolesti štitnjače, ne samo rak, a uzorkovanje je provedeno u puno kraćem vremenskom periodu. Ipak, veći broj žena u ispitivanoj skupini potvrđuje da žene češće obolijevaju od bolesti štitnjače. Procjenjuje se da će jedna od pet žena u nekom trenutku svoga života biti suočena s dijagnozom bolesti štitnjače. Postoji nekoliko teorija zašto je tome tako, od utjecaja ženskih hormona tijekom puberteta, trudnoće i menopauze do povećanoga korištenja kozmetičkih proizvoda kod žena u odnosu na muškarce (<https://thyroidpharmacist.com/>). Pojedini znanstvenici ovu pojavu objašnjavaju razlikom u imunskom odgovoru između žena i muškaraca (Ferrari i sur., 2017).

U ovome istraživanju ispitivanu skupinu činili su uglavnom nepušači (16 nepušača i 8 pušača) pa podatci ne ukazuju na povećanu incidenciju bolesti štitnjače kod pušača. Krayzler i Nagler (2015) navode da se oksidacija proteina značajno povećava tijekom izloženosti duhanskom dimu te je dim cigarete glavni induktor oralnoga karcinoma, ali isto ne možemo tvrditi za rak i ostale bolesti štitnjače.

Prosječna dob oboljelih bila je $52,3 \pm 12,1$ godina te govori da od bolesti štitnjače najčešće obolijevaju ljudi srednje dobi. Vučemilo i sur. (2015) navode podatak da medijan dobi kod dijagnoze raka štitnjače za razdoblje od 2008. do 2010. u Republici Hrvatskoj iznosi 52 godine, s interkvartilnim rasponom od 39 do 62 godina, što potvrđuje i navedena ispitivana skupina.

Indeks tjelesne mase (BMI) iznosi $26,2 \pm 4,1$ i blago je povišen u odnosu na preporučene vrijednosti. Vrijednosti preporučenog BMI-a iste su za oba spola i iznose $18,5 - 24,9 \text{ kg/m}^2$ za europsko stanovništvo prema klasifikaciji SZO. U svome radu Rumińska i sur. (2016) navode da akumulacija masti dovodi do disfunkcije osi hipotalamus-hipofiza-štitnjača i promjena u funkciji štitnjače. Veća razina TSH obično je pozitivno povezana s tjelesnom težinom i BMI (Pearce, 2012). Međutim, sam indeks tjelesne mase nije savršena mjera pa je

pri procjeni rizika od razvoja bolesti potrebno uzeti u obzir i druge mjere koje ukazuju na raspodjelu masnoga tkiva u tijelu (<https://www.plivazdravlje.hr/>).

U ovome istraživanju nađena je povišena koncentracija proteinskih karbonila, ali da bismo utvrdili jesu li karbonilne skupine na proteinima nastale kao posljedica primarnih ili sekundarnih modifikacija bočnih lanaca aminokiselina potrebno je primijeniti druge metode ispitivanja. Na primjer, mogu se detektirati adukti lipidne peroksidacije korištenjem specifičnih protutijela (Dalle-Donne i sur, 2003), što nije obuhvaćeno ovim istraživanjem.

Potrebno je naglasiti, kako navode Frijhoff i sur. (2015) da je oksidacijski stres vrlo složen fenomen koji je teško karakterizirati, a do današnjega dana ne postoji prihvaćena klasifikacija oksidacijskoga stresa. Jedan biomarker nije nužno bolji od drugoga. Literatura o ovoj temi je vrlo heterogena i često je teško izvući opće zaključke o značaju biomarkera oksidacijskoga stresa, budući da se niz različitih biomarkera koristi samo u ograničenom udjelu bolesti, a različiti biomarkeri su korišteni za proučavanje različitih bolesti. Velika raznolikost oksidacijskog stresa između bolesti i stanja mora se uzeti u obzir prilikom odabira najprikladnijeg biomarkera. Idealnog biomarkera nema, tako da bi ih se trebalo pratiti barem nekoliko kako bi se moglo doći do zaključka o uzroku i tijeku bolesti te utjecaju oksidacijskog stresa na samu bolest.

6. ZAKLJUČCI

1. S obzirom da su proteinski karbonili dobar marker oksidacijskog stresa može se zaključiti da je kod pacijenata sa dijagnosticiranim bolestima štitne žlijezde došlo do oksidacijskog stresa, odnosno da je oksidacijski stres povezan s razvojem bolesti štitnjače.
2. Kako bi se potvrdili dobiveni rezultati potrebno je izmjeriti i druge biomarkere oksidacijskog stresa poput markera lipidne peroksidacije 4-HNE i antioksidacijske obrane GSH.

7. LITERATURA

Adams S, Green P, Claxton R, Simcox S, Williams MV, Walsh K, Leeuwenburgh C. Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Front Biosci*, 2001, 6, 17-24.

Bajek S. Glandula thyroidea, štitasta žlijezda. U: Waldeyerova anatomija čovjeka. Vinter I, urednik, Zagreb, Golden marketing-tehnička knjiga, 2009, str. 337-340.

BMI - Indeks tjelesne mase, <https://www.plivazdravlje.hr/>, pristupljeno 29.06. 2017.

Buss IH, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med*, 1997, 23(3), 361 – 366.

Bylund J, Brown KL, Movitz C, Dahlgren C, Karlsson A. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(12), 1834-1845.

Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res*, 2000, 33, 99-108.

Circu ML i Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(6), 749–762.

Cross AR, Jones OT. G. Enzymic mechanism of superoxyde production. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1057, 281–284.

Čepalek I, Dodig S. Glutation i oksidacijski stres. *Biochem Med*, 2003, 3-4, 93-100.

Dalle-Donne I i sur. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 2003, 329(1), 23–38.

Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol*, 2013, 94(4), 657-670.

Ferrari SM, Fallahi P, Antonelli A i Benvenga S. Environmental Issues in Thyroid Diseases. *Front Endocrinol*, 2017, 8, 1-8.

Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 2002, 84, 131–141.

Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N i sur. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 23(14), 1144-1170.

Guyton AC i Hall JE. Metabolički hormoni štitnjače. U: Medicinska fiziologija. Kukulja-Taradi S, Andreis I, urednici. Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str. 931-943.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*, 1994, 102(Suppl 10), 5-12.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radical Biology and Medicine. London, Oxford Univ. Press, 2007.

Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt 2), 345-50.

Heuck CC, Kallner A, Kanagasabapathy AS, Riese W. Diagnosis and monitoring of diseases of the thyroid. World Health Organization, 2000.

Hormoni štitnjače i TSH, 2015, <http://stitnjaca.com/> pristupljeno 20. 6. 2017.

Incidencija raka u Hrvatskoj 2013. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Bilten 38, Zagreb, 2015. Preuzeto sa https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2013_final.pdf

Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*, 2003, 10, 2495–2505.

Jukić T. i Kusić Z., Čvor u štitnjači i problem karcinoma. Bolesničke novine, 2013, 20, 11.

Koduru B, Tejaswini, Thakur A, Kamath SU, Shenoy KR, Kamath U, Reshma K. Indicators of oxidative stress in thyroid cancer. *Indian J Biochem Biophys*, 2010, 47(2), 121-3.

Krayzler E, Nagler RM. Carbonyl levels and survival rates in oral cancer cells exposed to cigarette smoke. *Anticancer Res*, 2015, 35(4), 1961-1965.

Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb, Medicinska naklada, 2007.

Kujundžić M. i suradnici. Klinička patofiziologija za studente farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2003.

Lenz A, Costabel U, Shaltiel S, Levine L. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Anal Biochem*, 1989, 177, 419 – 25.

Levine RL, Williams J, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 1994, 233, 346 – 357.

Mancini A, Di Segni C, Raimondo S, Olivieri G, Silvestrini A, Meucci E, Currò D. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016, 6757154.

Marinković J. Dijagnostičke mogućnosti u bolestima štitnjače. *Bolesničke novine*, 2013, 20.

Møller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biol Interact*, 1996, 102, 17-36.

Monokromator. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=41722> pristupljeno 27. 06. 2017.

Niazi AK, Kalra S, Irfan A, Islam A. Thyroidology over the ages. *Indian J Endocrinol Metab*, 2011, 15(Suppl2), 121-126.

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković J. Praktikum iz analitike lijekova I.dio, Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska sprektofotometrija. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2007, 34-38.

Ohye H, Sugawara M. Dual oxidase, hydrogen peroxide and thyroid diseases. *Exp Biol Med*, 2010, 235(4), 424–433.

Osnovni dijelovi UV-Vis spektrofotometra, 2013. <https://myessozone.wordpress.com/> pristupljeno 17.06.2017.

Packer JE. Oxidative stress, antioxidants, aging and disease. U: *Oxidative Stress and Aging*, urednici: Gutter RG, Packer LB, Eratum J, Mori A. Basle, Switzerland, Birkhauser Verlag, 1995, str. 152-163.

Papilarni rak štitne žlijezde, 2007., <http://www.cybermed.hr/> pristupljeno 16. 06. 2017.

Pearce EN. Thyroid hormone and obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2012, 19(5), 408-413.

Poncin S, Van Eeckoudt S, Humblet K, Colin IM, Gérard A-C. Oxidative Stress: A Required Condition for Thyroid Cell Proliferation. *Am J Pathol*, 2010, Vol.176(3), 1355-1363.

Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol*, 1999, 277(6 Pt 1), 1067-1088.

Rahman K. Studies on Free Radicals, Antioxidants, and Co-Factors. *Clin Interv Aging*, 2007, 2(2), 219–236.

Reuben C. Opasni slobodni radikali. U: Antioksidansi. Izvori, 1998, str. 20-30.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, 1994, 233, 263 – 357.

Rumińska M, Witkowska-Sędek E, Majcher A, Pyrzak B. Thyroid Function in Obese Children and Adolescents and Its Association with Anthropometric and Metabolic Parameters. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 912, 33-41.

Saran M, Michel C, Bors W. Reactions of NO with O₂⁻. Implications for the action of endothelium-relaxing factor. *Free Radic Res Commun*, 1990, 10, 221-226.

Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 2015, 4, 180–183.

Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem*, 2004, 11(9), 1135-1146.

Strinović M., Jednostavna (netoksična) guša. Bolesničke novine, 2013, 20, 3.

Thyroid gland. 2013, <http://slideplayer.com/slide/273764/> pristupljeno 10. 06.2017.

Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57(3-4), 145-55.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol Inter*, 2006, 160, 1–40.

Vrbanec D. Poremećaji funkcije štitnjače. U: Patofiziologija. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, urednici. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 366-370.

Vrkljan M, Papilarni karcinom štitnjače. Bolesničke novine, 2013, 20, 12-13.

Vučemilo L, Znaor T, Kuliš T, Šekerija M, Znaor A. Thyroid Cancer Incidence and Mortality Trends in Croatia 1988-2010. *Acta Clin Croat*, 2015, 54(1), 30-36.

Watson D. Pharmaceutical analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str. 75-94.

Why Women Have More Thyroid Disorders? 2017. <https://thyroidpharmacist.com/> pristupljeno 20. 06.2017.

Winterbourn CC, Buss IH. Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Methods Enzymol*, 1999, 300, 106 – 111.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Danas bolesti štitnjače zauzimaju drugo mjesto po učestalosti među bolestima endokrinoga sustava u svijetu, a njihova incidencija i dalje neprestano raste. Oksidacijski stres nastaje kao posljedica poremećaja oksidacijsko-redukcijskih procesa u organizmu. Pri tome nastali slobodni radikali, od kojih su najčešći reaktivni kisikovi spojevi (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*), oštećuju stanične makromolekule poput proteina, lipida, ugljikohidrata i DNK i povezuju se s patogeneom brojnih bolesti. Zbog kratkoga poluživota u organizmu ROS-ove je teško izmjeriti. Stoga se češće kao markeri oksidacijskoga stresa koriste oštećenja makromolekula izazvana slobodnim radikalima. Koncentracija proteinskih karbonila predstavlja općeniti i najčešće korišteni marker za praćenje oksidacijskog oštećenja proteina. Kao biomarkeri oksidacijskoga stresa proteinski karbonili imaju nekoliko prednosti u odnosu na mjerenje drugih oksidacijskih produkata prvenstveno zbog njihovog ranog formiranja i relativne stabilnosti.

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi postoji li veza između oksidacijskoga stresa i bolesti štitnjače. U suradnji s liječnicima KBC Sestre milosrdnice sakupljeni su uzorci plazme bolesnika s dijagnozom bolesti štitnjače (n = 24), kao i kontrolna skupina (n = 42). Koncentracija proteinskih karbonila određena je spektrofotometrijski, nakon derivatizacije karbonilnih skupina proteina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (2,4-DNPH).

Koncentracija proteinskih karbonila u oboljelih od bolesti štitne žlijezde ($11,27 \pm 3,61 \mu\text{M}$) bila je značajno viša od izmjerene koncentracije u kontrolnoj skupini ($9,99 \pm 3,25 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) što ukazuje da kod bolesnika s bolestima štitnjače dolazi do oksidacijskoga stresa.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je oksidacijski stres povezan s patogeneom bolesti štitnjače. Ipak, kako bi se moglo doći do zaključka o uzroku i tijeku bolesti te utjecaju oksidacijskoga stresa na samu bolest potrebno je izmjeriti i neke druge markere oksidacijskoga stresa.

Today, thyroid diseases are second most common among the endocrine disorders in the world and their incidence continues to grow. Oxidative stress occurs as a result of imbalance of oxidation-reduction processes in the body. Free radicals, among which the most common are reactive oxygen species (ROS), damage cellular macromolecules such as proteins, lipids, carbohydrates and DNA and are linked to the pathogenesis of many diseases. Because of their short half-life in the body ROS are very difficult to measure. Hence, macromolecule damage induced by free radicals is a good biomarker of oxidative stress. Protein carbonyl content is general and commonly used marker of protein oxidation. The use of protein carbonyls as a biomarker of oxidative stress has several advantages over measuring other oxidation products due to their extremely early formation and relative stability.

The aim of this study was to determine whether there is a link between oxidative stress and thyroid diseases. Plasma samples of patients with thyroid disease diagnosis (n = 24), as well as a control group (n = 42), were collected in collaboration with KBC Sestre milosrdnice. Protein carbonyl groups were quantified spectrophotometrically after derivatization of carbonyl groups with 2,4-dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH).

In samples of patients with thyroid disease carbonyl content ($11.27 \pm 3.61 \mu\text{M}$) was significantly higher than the control group ($9.99 \pm 3.25 \mu\text{M}$, $p < 0.05$) indicating that patients with thyroid disease experience oxidative stress.

It can be concluded that oxidative stress is linked to pathogenesis of thyroid diseases, however, to come to a conclusion about the cause and course of the disease and the effect of oxidative stress on the illness itself other biomarkers of oxidative stress should be assessed.

9. PRILOZI

9.1. Kratice

4-HNE – 4-hidroksinonenal

BMI -Indeks tjelesne mase (eng. *Body mass indeks*)

cAMP - ciklički adenzin-monofosfat

CAT -katalaza (eng. *Catalase*)

DNK - deoksiribonukleinska kiselina (eng. *Deoxyribonucleic acid*, DNA)

DNP - 2,4-dinitrofenil hidrazon

DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazin

DUOX – dvojna oksidaza (eng. *Dual oxidase*)

GR- glutation reduktaza

GSH- Glutation (reducirani)

GSH-Px - Glutation peroksidaza

GSSG- Glutation (oksidirani)

H₂O₂- vodikov peroksid

HCl – kloridna kiselina

HMP – heksoza monofosfatni šant

KH₂PO₄ - kalij dihidrogenfosfat

LPO - lipidna peroksidacija

NADPH- Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NO - Dušikov (II) oksid

NOX – NADPH oksidaza (eng. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*)

RCS- reaktivni ugljikovi spojevi (eng. *Reactive carbonyl species*)

RNS - reaktivni duškovi spojevi (eng. *Reactive nitrogen species*)

ROS - reaktivni kisikovi spojevi (eng. *Reactive Oxygen Species*)

SOD- superoksid dizmutaza (eng. *Superoxide dismutase*)

SZO- Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization, WHO*)

T3 - trijodtironin

T4 - tiroksin

TCA – trikloroocetna kiselina

RNK - Ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid*, RNA)

TRH - hormon koji oslobađa tireotropin

TSH – tireotropin

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku botaniku
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

KONCENTRACIJA OKSIDIRANIH PROTEINA KOD PACIJENATA S BOLESTIMA ŠTITNJAČE

Ana Ajduković

SAŽETAK

Danas bolesti štitnjače zauzimaju drugo mjesto po učestalosti među bolestima endokrinoga sustava u svijetu, a njihova incidencija i dalje neprestano raste. Oksidacijski stres nastaje kao posljedica poremećaja oksidacijsko-redukcijskih procesa u organizmu. Pri tome nastali slobodni radikali, od kojih su najčešći reaktivni kisikovi spojevi (ROS, engl. Reactive Oxygen Species), oštećuju stanične makromolekule poput proteina, lipida, ugljikohidrata i DNK i povezuju se s patogeneзом brojnih bolesti. Zbog kratkoga poluživota u organizmu ROS-ove je teško izmjeriti. Stoga se češće kao markeri oksidacijskoga stresa koriste oštećenja makromolekula izazvana slobodnim radikalima. Koncentracija proteinskih karbonila predstavlja općeniti i najčešće korišteni marker za praćenje oksidacijskog oštećenja proteina. Kao biomarkeri oksidacijskoga stresa proteinski karbonili imaju nekoliko prednosti u odnosu na mjerenje drugih oksidacijskih produkata prvenstveno zbog njihovog ranog formiranja i relativne stabilnosti.

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi postoji li veza između oksidacijskoga stresa i bolesti štitnjače. U suradnji s liječnicima KBC Sestre milosrdnice sakupljeni su uzorci plazme bolesnika s dijagnozom bolesti štitnjače ($n = 24$), kao i kontrolna skupina ($n = 42$). Koncentracija proteinskih karbonila određena je spektrofotometrijski, nakon derivatizacije karbonilnih skupina proteina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (2,4-DNPH).

Koncentracija proteinskih karbonila u oboljelih od bolesti štitne žlijezde ($11,27 \pm 3,61 \mu\text{M}$) bila je značajno viša od izmjerene koncentracije u kontrolnoj skupini ($9,99 \pm 3,25 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) što ukazuje da kod bolesnika s bolestima štitnjače dolazi do oksidacijskoga stresa.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je oksidacijski stres povezan s patogeneзом bolesti štitnjače. Ipak, kako bi se moglo doći do zaključka o uzroku i tijeku bolesti te utjecaju oksidacijskog stresa na samu bolest potrebno je izmjeriti i neke druge markere oksidacijskog stresa.

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

Rad sadrži: 47 stranica, 10 grafičkih prikaza, 4 tablice i 59 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Štitnjača, oksidacijski stres, proteinski karbonili, UV-Vis spektrofotometrija

Mentor: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Suzana Inić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Živka Juričić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Botany
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

PROTEIN CARBONYL CONTENT IN PATIENTS WITH THYROID DISEASES

Ana Ajduković

SUMMARY

Today, thyroid diseases are second most common among the endocrine disorders in the world and their incidence continues to grow. Oxidative stress occurs as a result of imbalance of oxidation-reduction processes in the body. Free radicals, among which the most common are reactive oxygen species (ROS), damage cellular macromolecules such as proteins, lipids, carbohydrates and DNA and are linked to the pathogenesis of many diseases. Because of their short half-life in the body ROS are very difficult to measure. Hence, macromolecule damage induced by free radicals is a good biomarker of oxidative stress. Protein carbonyl content is general and commonly used marker of protein oxidation. The use of protein carbonyls as a biomarker of oxidative stress has several advantages over measuring other oxidation products due to their extremely early formation and relative stability.

The aim of this study was to determine whether there is a link between oxidative stress and thyroid diseases. Plasma samples of patients with thyroid disease diagnosis ($n = 24$), as well as a control group ($n = 42$), were collected in collaboration with KBC Sestre milosrdnice. Protein carbonyl groups were quantified spectrophotometrically after derivatization of carbonyl groups with 2,4-dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH).

In samples of patients with thyroid disease carbonyl content ($11.27 \pm 3.61 \mu\text{M}$) was significantly higher than the control group ($9.99 \pm 3.25 \mu\text{M}$, $p < 0.05$) indicating that patients with thyroid disease experience oxidative stress.

It can be concluded that oxidative stress is linked to pathogenesis of thyroid diseases, however, to come to a conclusion about the cause and course of the disease and the effect of oxidative stress on the illness itself other biomarkers of oxidative stress should be assessed.

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

Thesis includes: 47 pages, 10 figures, 4 tables and 59 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Thyroid gland, oxidative stress, protein carbonyl, UV-Vis spectrofotometry

Mentor: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Suzana Inić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.

