

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Ana Marija Marjanovi

OKSIDACIJSKI STRES U OSOBA  
PROFESIONALNO IZLOŽENIH MIKROVALNOM  
ZRAČENJU

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2009.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod neposrednim vodstvom prof.dr.sc Verice Garaj-Vrhovac i suvoditeljstvom doc.dr.sc Ana-Marije Domijan, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja naziva dipl.ing. biologije, smjer molekularna biologija.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Verici Garaj-Vrhovac na susretljivosti i ljubaznosti prilikom izrade ovog diplomskog rada, a posebno doc. dr. sc. Ana-Mariji Domijan na nesebičnoj pomoći, savjetima, razumijevanju i usmjeravanju prilikom izrade i pisanja rada i naravno svim suradnicima iz Zavoda za toksikologiju na toploj i ugodnoj atmosferi u laboratoriju.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na stalnoj potpori i razumijevanju.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveu ilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matemati ki fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## OKSIDACIJSKI STRES U OSOBA PROFESIONALNO IZLOŽENIH MIKROVALNOM ZRAČENJU

Ana Marija Marjanovi

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, Zagreb

Reaktivne kisikove spojeve (ROS) povezujemo s nastankom oksidacijskog stresa koji ošte uje stani ne makromolekule te se pri tome dovodi u vezu s razli itim bolestima. Faktori koji dovode do stvaranja ROS-ova brojni su i razli iti. Promjene u koncentracijama malondialdehida (MDA), protein-karbonila i glutaciona (GSH) samo su neki od indikatora koji ukazuju na oksidacijski stres. Cilj istraživanja bio je ispitati postoji li zna ajna razlika u koncentraciji spomenutih indikatora oksidacijskog stresa kod osoba profesionalno izloženih mikrovalnom zra enju. Istraživanje je provedeno na uzorcima pune krvi osoba koje su profesionalno izložene mikrovalnom zra enju radara frekvencije 1,5 GHz do 10,9 GHz, gusto e snage elektri nog polja od  $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  do  $10 \text{mW}/\text{cm}^2$ , dok su kontrolnu skupinu inili zaposlenici Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Koncentracije GSH i protein-karbonila izmjerene su spektrofotometrijskom metodom, dok je za mjerenje MDA korištena HPLC tehnika. Dobivene koncentracije izražene su u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina, a razlika izme u kontrolne i izložene skupine prikazana je pomo u Student t-testa za nezavisne uzorke. Statisti kom obradom podataka uo eno je da postoji zna ajna razlika u vrijednosti koncentracija GSH i MDA izme u izložene i kontrolne skupine, dok kod oksidiranih proteina ta razlika nije uo ena. Dobiveni rezultati upu uju na mogu u vezu izme u mikrovalnog zra enja i nastanka ROS-ova te pojavu oksidacijskog stresa.

(46 stranica, 14 slika, 5 tablica, 58 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Klju ne rije i: glutation (GSH)/ HPLC/ malondialdehid (MDA)/ mikrovalno zra enje/  
oksidacijski stres

Voditelji rada: Prof. dr. sc. Verica Garaj-Vrhovac  
Doc. dr. sc. Ana-Marija Domijan

Ocjenjiva i: Prof. dr. sc. Verica Garaj-Vrhovac  
Doc. dr. sc. Željka Vidakovi -Cifrek  
Doc. dr. sc. Maja Matuli

Rad prihva en: 8. travanj 2009.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation thesis

### **OXIDATIVE STRESS IN SUBJECTS OCCUPATIONALLY EXPOSED TO MICROWAVE RADIATION**

Ana Marija Marjanovi

Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, Zagreb

Reactive oxygen species (ROS) are associated with development of oxidative stress that damages cellular macromolecules and are often set in connection with various diseases. Various and many factors lead to formation of ROS. Changes in the levels of malondialdehyde (MDA), protein carbonyl and glutathione (GSH) are just some of the indicators that point to oxidative stress. The aim of this study was to examine whether there is a significant difference in the concentration of the referred indicators of oxidative stress in subjects occupationally exposed to microwave radiation. Research was conducted on the samples of whole blood of subjects occupationally exposed to microwave radiation of radar frequency range of 1,5 GHz to 10,9 GHz, within microwave field of  $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  to  $10 \text{mW}/\text{cm}^2$ , while the control group was made of employees of Institute for Medical Research and Occupational Health. Concentrations of GSH and protein carbonyls were measured by spectrophotometric method, while MDA concentrations were measured using HPLC technique. Gained concentrations were in reference to the concentration of total protein, and the difference between control and exposed group was shown by Student's t-test for independent samples. Statistical analysis shown significant difference in the values of GSH and MDA concentrations between exposed and control group, while the difference among protein carbonyls were not observed. These results indicate a possible link between microwave radiation and the formation of ROS and the appearance of oxidative stress.

(46 pages, 14 figures, 5 tables, 58 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: glutathione (GSH), HPLC, malondialdehyde (MDA), microwave radiation, oxidative stress

Supervisor: Prof.dr.sc. Verica Garaj-Vrhovac  
Doc.dr.sc. Ana-Marija Domijan

Reviewers: Prof.dr.sc. Verica Garaj-Vrhovac  
Doc. dr. sc. Željka Vidakovi -Cifrek  
Doc. dr. sc. Maja Matuli

Thesis accepted: April 8, 2009

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>OKSIDACIJSKI STRES.....</i>	2
1.1.1	<i>REAKTIVNI KISIKOVI SPOJEVI .....</i>	2
1.1.2	<i>OBRANA OD OKSIDACIJSKOG STRESA .....</i>	3
1.1.3	<i>GLUTATION.....</i>	5
1.1.4	<i>MALONDIALDEHID.....</i>	6
1.1.5	<i>OKSIDIRANI PROTEINI.....</i>	7
1.2	<i>MIKROVALNO ZRAČENJE .....</i>	7
<b>2</b>	<b>CILJ .....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>13</b>
3.1	<i>MATERIJALI .....</i>	14
3.1.1	<i>KEMIKALIJE.....</i>	14
3.1.2	<i>APARATURA .....</i>	15
3.1.2.1	<i>SPEKTROFOTOMETAR .....</i>	15
3.1.2.2	<i>TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) .....</i>	16
3.1.3	<i>PRIKUPLJANJE UZORAKA.....</i>	18
3.2	<i>METODE .....</i>	18
3.2.1	<i>POUZDANOST METODE.....</i>	18
3.2.2	<i>ODREĐIVANJE UKUPNIH PROTEINA .....</i>	19
3.2.2.1	<i>PRIPREMA OTOPINA .....</i>	19
3.2.2.2	<i>PRIPREMA STANDARDA.....</i>	19
3.2.2.3	<i>POSTUPAK .....</i>	20
3.2.3	<i>ODREĐIVANJE REDUCIRANOG GLUTATIONA.....</i>	20
3.2.3.1	<i>PRIPREMA OTOPINA.....</i>	21
3.2.3.2	<i>PRIPREMA STANDARDA.....</i>	22
3.2.3.3	<i>POSTUPAK .....</i>	22
3.2.4	<i>ODREĐIVANJE MALONDIALDEHIDA .....</i>	23
3.2.4.1	<i>PRIPREMA OTOPINA .....</i>	23

3.2.4.2	<i>PRIPREMA STANDARDA MDA</i> .....	24
3.2.4.3	<i>POSTUPAK</i> .....	24
3.2.5	<i>MJERENJE OKSIDIRANIH PROTEINA</i> .....	25
3.2.5.1	<i>PRIPREMA OTOPINA</i> .....	26
3.2.5.2	<i>POSTUPAK</i> .....	27
3.2.6	<i>STATISTI KA OBRADA PODATAKA</i> .....	27
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>28</b>
4.1	<i>UKUPNI PROTEINI</i> .....	29
4.2	<i>REDUCIRANI GLUTATION</i> .....	30
4.3	<i>MALONDIALDEHID</i> .....	31
4.4	<i>OKSIDIRANI PROTEINI</i> .....	33
<b>5</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJU CI</b> .....	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>POPIS CITIRANE LITERATURE</b> .....	<b>41</b>

## **KRATICE**

**ATP** – adenzin trifosfat

**BHT** – butilirani hidroksitoluen

**BSA** – albumin gove i serum

**CAT** – katalaza

**DNA** – deoksiribonukleinska kiselina

**DNP**H – 2,4-dinitrofenilhidrazin

**DTNB** – 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoat

**GPx** – glutation peroksidaza

**GR** – glutation reduktaza

**GSH** – glutation

**GSSG** – glutation disulfid

**HPLC** – teku inska kromatografija visoke djelotvornosti

**LPO** – lipidna peroksidacija

**MDA** – malondialdehid

**MPA** – metafosforna kiselina

**NAD** – nikotinamid-adenin-dinukleotid

**NADPH** – nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat

**PUFA** – polyunsaturated fatty acids (višestrukonezasi ene masne kiseline)

**ROS** – reaktivni kisikovi spojevi

**SOD** – superoksid-dizmutaza

**T3** – trijodtironin

**T4** – tetrajodtironin

**TBA** – 2-tiobarbituratna kiselina

**TCA** – trikloroetena kiselina

**TNB** – 2-nitro-5-tiobenzoatna kiselina

**TSH** – tiroid stimuliraju i hormon

**-GCS** –  $\gamma$ -glutamilcistein-sintetaza



# **1 UVOD**

## 1.1 OKSIDACIJSKI STRES

Istraživanja u posljednjih dvadesetak godina pokazala su da kisik, čak i u normalnim koncentracijama oštećuje stanice i dovodi do oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres je posljedica neravnoteže nastajanja i uklanjanja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). ROS-ovi oštećuju stanične makromolekule: proteine, lipide, ugljikohidrate i DNA (epelak i Dodig 2003). Mogu oštetiti DNA na bazama i šećer, što dovodi do degradacije deoksiribonukleinske baza, lomova i mutacija. Peroksidacija baza odvija se najčešće na timinu i guaninu, dok su adenin i citozin manje osjetljivi na oksidacijski stres (Waris i Ahsan 2006). Oksidacijski stres proteina dovodi do modifikacije aminokiselina, fragmentacije peptidnog lanca, povećane osjetljivosti na proteolitičke enzime i formiranje novih reaktivnih grupa (Dean i sur. 1997). Posljedica je gubitak fluidnosti stanične membrana, inaktivacija membranskih enzima, ubrzana proteoliza, starenje, poremećaj prijenosa signala u stanici, maligni procesi i smrt stanice (epelak i Dodig 2003).

Oksidacijski stres povezuje se s nastankom šećerne bolesti, reumatoidnim artritisom, psorijazom, sterilnosti muškaraca, starenjem te nizom neuroloških bolesti (Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest, Downov sindrom), kardiovaskularnim bolestima i rakom. Utvrđeno je da ROS-ovi djeluju kao promotori, aktiviraju drugi stupanj karcinogeneze i stimuliraju transformaciju stanica u stanice raka (Waris i Ahsan 2006).

### 1.1.1 REAKTIVNI KISIKOVI SPOJEVI

ROS-ovi nastaju jednovalentnom redukcijom molekule kisika ( $O_2$ ). Oni se neprestano stvaraju i nakupljaju unutar stanica tijekom normalnih metaboličkih, ali i različitih toksičnih procesa. Ta skupina visoko reaktivnih molekula ima važnu ulogu i u fiziologiji i patologiji stanice (Hancock i sur. 2001). U skupinu ROS-ova ubrajaju se slobodni radikali i aktivni intermedijeri kisika.

Slobodni radikal je bilo koji atom ili molekula koji u svojoj vanjskoj ljusci sadrži jedan ili više nesparenih elektrona. Sve slobodne radikale karakterizira iznimno visoka reaktivnost kao rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu te spare nespareni elektron i time postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju. Pod slobodne

radikale ubrajamo: hidroksilni radikal ( $\text{HO}^\bullet$ ), superoksidni radikal ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), dušikov(II) oksid ( $\text{NO}^\bullet$ ) hidroperoksilni radikal ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) i dr.  $\text{HO}^\bullet$  je posebno reaktivan radikal i smatra se izravno odgovornim za oksidacijska oštećenja u biološkim sustavima (Fleury i sur. 2002). Dušikov(II) oksid ( $\text{NO}$ ) u suvišku također djeluje kao slobodni radikal i može se pretvoriti u vrlo reaktivni peroksinitritni anion ( $\text{ONOO}^-$ ), dušikov(IV) oksid ( $\text{NO}_2$ ), ili pak nitratni anion  $\text{NO}_3^-$ . Peroksinitritni anion nastaje kao produkt reakcije dušikovog oksida i superoksidnog radikala (Saran i sur. 1990).

Razlikujemo endogene i egzogene izvore slobodnih radikala. Endogeni slobodni radikali u organizmu mogu nastati tijekom oksidativnih procesa, fagocitoze, kemotaksije, apoptoze, koagulacije, hipoksije ili hiperoksije. Egzogeni izvor slobodnih radikala mogu biti: neionizirajuće zračenje (dio ultraljubičastog i mikrovalno zračenje), dim cigareta, lijekovi, prehrana, pesticidi, toksini, radon (Møller i sur. 1996).

U stanicama je glavno mjesto stvaranja slobodnih radikala (prvenstveno superoksidnih) unutrašnja membrana mitohondrija kojom se preko niza proteina u reakcijama oksidacije-redukcije vrši transport elektrona. Kao konačni akceptor, kisik se potpuno reducira sa četiri elektrona i nastaju dvije molekule vode. U slučaju prerane i nepotpune redukcije koja se događa u 5 % slučajeva dolazi do stvaranja superoksidnog radikala ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) (Fridovich 1991).

Aktivni intermedijeri kisika su spojevi koji sami po sebi nisu slobodni radikali, ali mogu pokrenuti reakcije u kojima oni nastaju. To su anioni i molekule koji sadrže kisikove atome kao što su: vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hipoklorasta kiselina ( $\text{HClO}$ ), reaktívni (singlet) kisik ( $^1\text{O}_2$ ) te okolišni i endogeni ozon ( $\text{O}_3$ ) (Friedman i sur. 2000).

### *1.1.2 OBRANA OD OKSIDACIJSKOG STRESA*

Naš je organizam razvio više mehanizama kojima se brani od mogućeg oksidacijskog oštećenja. Tvar koja nastaje u organizmu u razmjerno malim koncentracijama sprečava oksidaciju uzrokovanu ROS-ovima nazivamo antioksidansima (Lacković 2002). Antioksidacijski sustav je kompleksan, može se podijeliti na:

- primarnu antioksidacijsku obranu koja sprečava formiranje ROS-ova;
- sekundarnu koja uništi ili završi lanac reakcija uzrokovan ROS-ovima;
- tercijarnu koja popravljá ili uklanjá tkivo oštećeno oksidacijskim stresom.

U primarnu antioksidacijsku obranu spadaju uglavnom proteini koji vežu metale kao što su transferin, feritin, mioglobin, ceruloplazmin, albumin i metalotionein. Ioni metala imaju važnu ulogu u stvaranju slobodnih radikala, a ovi proteini djeluju tako da smanjuju njihovu dostupnost. Za željezo se smatra da je odgovorno za nastanak veine hidroksilnih radikala u tijelu. Zbog činjenice da je slabokrvnost češća pojava kod žena nego kod muškaraca pokazalo se da žene imaju manji rizik od srčanog infarkta. Njihov nivo željeza je niži što smanjuje nastanak hidroksilnog radikala, a samim time i srčanih bolesti.

Postoje dvije vrste sekundarne obrane koje ili uklanjaju ili vežu ROS-ove. To su enzimi glutation peroksidaza (GSH-Px), glutation reduktaza (GR), superoksid dizmutaza (SOD) i katalaza (CAT), neenzimatski sistem, tzv. male molekule kao što su glutation, askorbinska kiselina (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), razni flavonoidi i karotenoidi. Oni djeluju tako što se vežu sa slobodnim radikalima te ih sprečavaju u oštećivanju stanica.

Tercijarnu obranu čine različiti enzimatski sustavi koji uklanjaju ili popravljaju DNA i proteine koji su oštećeni ROS-ovima. To su metionin sulfoksid reduktaza koja popravlja proteine, DNA ligaza i DNA polimeraza I. Postoji i tzv. «final solution» kada je stanica pretrpila previše oštećenja tada se aktivira enzim poli-ADP-riboza-sintetaza koji uzrokuje pad nivoa staničnog NAD i uzrokuje smrt stanice (Packer 1995).

Unos antioksidansa prehranom ili kao dodatak prehrani povezuje se sa smanjenjem uestalosti raka. Epidemiološke studije su pokazale da manji unos antioksidansa povećava pojavu određenih karcinoma. Antioksidansi također mogu ublažiti posljedice kemoterapije (Stanner 2004). Zanimljiv je tzv. «Francuski paradoks»: Francuzi jedu masniju hranu, više puše, piju više, a vježbaju manje od stanovnika Velike Britanije, a opet manje pate od srčanih bolesti. To je u suprotnosti sa svim dosadašnjim studijama koje su srčane bolesti povezivale s masnom hranom i nedostatkom vježbanja. Taj manji broj srčanih bolesti u Francuskoj povezan je s umjerenim konzumiranjem crnog vina izmeđuu obroka. Crno vino zahvaljujući i sadržaju alkohola i flavonoida te visokim koncentracijama folne kiseline, vitamina, natrija, magnezija pozitivno djeluje na kardiovaskularni sustav. Istraživanja pokazuju da polifenoli u crnom vinu, kao što su flavonoidi i rezveratrol, usporavaju nastanak i progresiju ateroskleroze. Također sprečavaju stvaranje ugrušaka u krvi, odnosno smanjuju veličinu ugrušaka i smanjuju rizik od moždanog udara (Vidavalur i sur. 2006).

### 1.1.3 GLUTATION

Tripeptid glutation (L- -glutamilcisteinilglicin, GSH) najrasprostranjeniji je unutarstani ni tiol kojeg nalazimo u gotovo svakoj eukariotskoj stanici. Ve i dio stani nog GSH prisutan je u citosolu, dok se ostatak nalazi u mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu. GSH se sintetizira iz glutamata, cisteina i glicina djelovanjem citosolnih enzima  $\gamma$ -glutamilcistein-sintetaze ( -GCS) i GSH-sintetaze uz utrošak ATP-a u tzv.  $\gamma$ -glutamil ciklusu u stanicama svih organa, prvenstveno jetre. Koncentracija GSH u stanicama kre e se u vrijednosti od 0,5-10 mM, dok se u krvnoj plazmi i mokra i nalazi u mikromolarnim ( $\mu$ M) koncentracijama. U stanicama, GSH nalazimo u reduciranom (GSH), oksidiranom (GSSG) obliku ili vezanog na proteine ( epalek i Dodig 2003).

U organizmu GSH djeluje kao reducens i antioksidans u razli itim biokemijskim reakcijama, služi kao izvor cisteina, štiti stanice od lipidne peroksidacije (LPO), detoksicira egzogene i endogene tvari (uklju uju i ROS-ove i teške metale), sudjeluje u stani noj proliferaciji i razvoju. Tako er je neophodan za sintezu proteina i nukleinskih kiselina, održavanju enzima u njihovoj aktivnoj formi te održanju stani ne membrane ( wiergosz-Kowalewska i sur. 2006). GSH je tako er bitna komponenta enzimatskih sustava koji sadrži oksidaze i reduktaze. Visoki redoks potencijal GSH pripisuje se –SH skupini cisteina. U reduciranom obliku tiolna skupina cisteina donira elektron ROS-ovima te sama postaje reaktivna, a u reakciji s drugom reaktivnom molekulom GSH stvara GSSG. Glutation-reduktaza omogu uje regeneraciju GSH iz nastalog GSSG gdje se kao izvor elektrona koristi NADPH.



GSH-peroksidaza koristi se oksidacijom GSH za uklanjanje vodikovog peroksida nastalog u citosolu djelovanjem SOD-a (Valencia i sur. 2001).



Koncentracija GSH smanjuje se izlaganjem egzogenim uzročnicima stresa kao što su: pušenje, farmaceutski proizvodi (lijekovi), fizički napor, manjak metionina, ionizirajuće zračenje, operacijski zahvati, septički šok, unos alkohola, bakterijske i virusne infekcije (Epalek i Dodig 2003).

#### 1.1.4 MALONDIALDEHID

Malondialdehid (MDA) nastaje kao produkt LPO, reaktivan je i može nastaviti lananu reakciju oksidacijskog oštećenja te se stoga koristi kao biomarker u mjerenju razine oksidacijskog stresa u organizmu (Esterbauer i sur. 1991).

LPO je najviše proučavani proces oksidacijskog stresa. Stanični fosfolipidi nalaze se na mjestima gdje se stvaraju ROS-ovi što ih čini lakim endogenim ciljevima. Najviše su osjetljive višestrukonezasićene masne kiseline (PUFAs). LPO dovodi do lanane reakcije u kojoj se stvaraju lipidni peroksidi. Lipidni peroksidi ulaze u jezgru gdje stupaju u reakciju sa željezovim(II) kationima ( $Fe^{2+}$ ) pri čemu nastaje alkoksilni radikal koji napada DNA (Fraga i Tappel 1988). Također, kao rezultat oksidacijskog oštećenja membrana, u stanicama se povećava koncentracija kalcijevih(II) kationa ( $Ca^{2+}$ ) koji također ulaze u jezgru gdje mogu aktivirati nukleaze koje uzrokuju lomove DNA lanaca (McConkey i sur. 1989). Produkti LPO su različiti karbonili i alkeni.

Što je veći stupanj nezasićenosti masne kiseline to je ona podložnija oksidativnom oštećenju. Ukoliko taj početni korak peroksidacije nije kontroliran sustavom antioksidacijske obrane, može započeti lananu reakciju koja dovodi do oštećenja okolnih molekula, a na kraju i smrti stanice. LPO ometa sintezu proteina, funkciju membrane te povećava permeabilnost krvnih žila. Oksidacijsko oštećenje proteina dovodi do promjene fizikalno-kemijskih svojstava ili gubitka funkcija pogotovo ako je protein stanični receptor ili aktivno mjesto enzima.

Produkti LPO djeluju kao drugi glasnici slobodnih radikala. Za razliku od ROS-ova, aldehidi imaju duže vrijeme poluživota pa se putem krvi mogu proširiti s mjesta svog nastanka i napadati ciljeve koji su prilično udaljeni od mjesta početnog događaja u kojem su nastali slobodni radikali (Martínez-Blasco i sur. 1996). Od svih organa upravo je mozak zbog svoje izrazite metaboličke aktivnosti i velike količine nezasićenih masnih kiselina najviše podložan djelovanju LPO.

### 1.1.5 OKSIDIRANI PROTEINI

Koli ina prisutnih protein-karbonila je pokazatelj oksidacije proteina. Protein-karbonili nastaju oksidacijskim oštećenjem proteina prilikom čega dolazi do vezanja kisika za atom ugljika (Stadtman i Oliver 1991). Do stvaranja karbonilnih grupa na proteinima može doći i putem oksidativnih kao i neoksidativnih mehanizama u primarnim i sekundarnim modifikacijskim reakcijama. Primarna modifikacija nastaje promjenom originalne strukture aminokiselina kao posljedica procesa oksidacije koja je katalizirana metalima, djelovanjem zračenja, ozona, dušikovog oksida ili nekih drugih jakih oksidansa kao što su hipoklorasta kiselina i peroksinitrit. Sekundarna modifikacija nastaje progresivnom i kovalentnom reakcijom specifičnih produkata (npr. dim cigarete, aldehidi) sa proteinima koji na njima stvaraju karbonilne skupine (Adams i sur. 2001).

Kationi željeza i bakra mogu se vezati za specifična mjesta na proteinu te uz pomoć vodikovog peroksida ili kisika transformirati bojni lanac amino skupine nekih aminokiselina (lizin, arginin, prolin ili histidin) u karbonile (Reznick i sur. 1992).

Smatra se da su neka patološka stanja kao i proces starenja povezani s oksidacijom proteina. Oksidacijskom modifikacijom enzimi su obilježeni za proces degradacije uz pomoć neutralne alkalne proteaze. Oksidacijom proteina povećava se količina oštećenih enzima što zbog nemogućnosti popravka dovodi do povećanog oštećenja DNA (Stadtman 1992).

## 1.2 MIKROVALNO ZRAČENJE

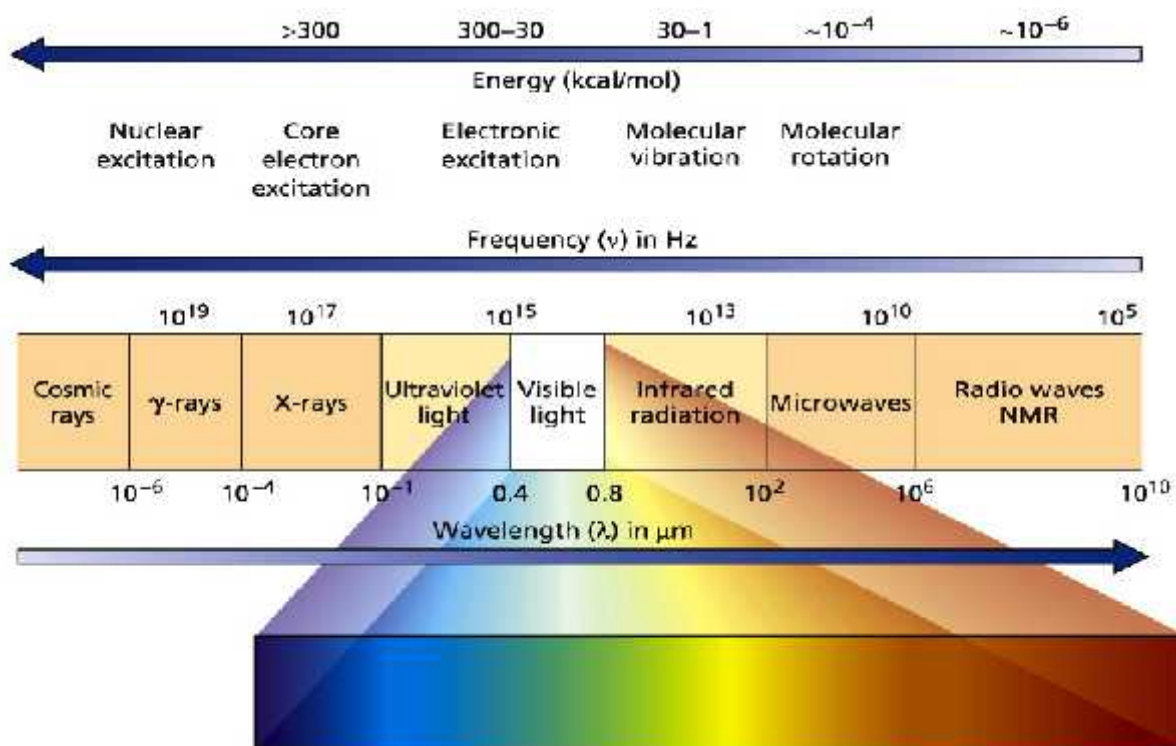
Radiovalno i mikrovalno zračenje su elektromagnetska zračenja frekvencijskog područja od 3 kHz do 300 GHz (Slika 1). Obično se mikrovalno zračenje smatra dijelom radiovalnog zračenja iako alternativna konvencija smatra radiovalno i mikrovalno zračenje kao dva zasebna spektralna područja. Radiovalovi obuhvaćaju spektralno područje između 3 kHz i 300 MHz, dok su mikrovalovi u području između 300 MHz i 300 GHz. Mikrovalovi imaju sposobnost prenošenja informacije sa jednog mjesta na drugo zahvaljujući energiji koja može prodrijeti kroz svjetlo, kišu, snijeg, oblake i maglu. Koriste se pri telekomunikaciji, a neki od izvora mikrovalnog zračenja

su mobilni telefoni, mikrovalne pećnice, radari, sateliti, televizijski odašiljači i (www.who.int).

Mikrovalovi nemaju dovoljno energije kako bi direktno uzrokovali kemijsku promjenu tvari stvaraju i nabijene ione. Oni uzrokuju ekscitaciju atoma i molekula pri čemu dolazi do povećanja brzine vibracije te ih zbog toga ubrajamo u neionizirajućeg zračenja. Spektar neionizirajućeg zračenja možemo podijeliti u dvije osnovne skupine: optičko zračenje i elektromagnetsko polje. U optičko zračenje ubrajamo ultraljubičasto, infracrveno zračenje te vidljivu svjetlost, dok mikrovalno i radiovalno zračenje ubrajamo u područje elektromagnetskog polja. Sposobnost neionizirajućeg zračenja da prođe kroz ljudsko tijelo te uzrokuje zdravstvene promjene kao i njegova apsorpcija najvećim dijelom ovisi o frekvenciji (Kwan-Hoong 2003).

Uinci mikrovalnog zračenja prema intenzitetu dijele se na dvije skupine. Termalni uinci zračenja posljedica su porasta temperature izloženog biološkog materijala za 1 °C ili više te su dobro istraženi. Ako u biološkom materijalu ne dolazi do promjene temperature ili se temperatura biološkog materijala povećava za manje od 1 °C uinci zračenja nazivaju se netermalnima. Jako se malo zna o molekularnom mehanizmu koji je uključen u netermalni uinak. Prevladava mišljenje da uinak na biološki materijal nastaje zbog rezonantnog mehanizma udjelovanja elektromagnetskog zračenja i biološkog materijala. Budući da gotovo sve biološke molekule posjeduju električni dipolni moment, postoji mogućnost da vanjsko elektromagnetsko polje uzrokuje stvaranje unutarstaničnih elektromagnetskih polja čiji se uinci u biološkoj jedinki mogu očitovati na različite načine (Pavlić 2004). U zadnjih nekoliko godina dobiveni su rezultati koji povezuju netermalni uinak mikrovalnog zračenja sa promjenom membranske strukture i funkcije, promjenom permeabilnosti liposoma i izoliranih stanica (Porcelli i sur. 1997, Fesenko i sur. 1995, Phelan i sur. 1994, Orlando i Mossa 1994). S druge strane neki autori dovode u pitanje postojanje takvih uinaka (Bergqvist i sur. 1994, Marani i Feirabend 1993).





Slika 1 Spektar elektromagnetskog zračenja

Utjecaj mikrovalnog zračenja na ljudsko zdravlje još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Do danas su provedena brojna istraživanja kako bi se ispitala povezanost mikrovalnog zračenja sa bolestima imunološkog, kardiovaskularnog, živčanog i reproduktivnog sustava, utjecaj na hormone, pojavu kromosomskih aberacija i tumora (Jauchem 2007, Lali i sur. 2001, Garaj-Vrhovac i Orešanić 2009, Garaj-Vrhovac i sur. 2009). Većina provedenih istraživanja međusobno su kontradiktorna. Rezultati koji upućuju na negativan utjecaj mikrovalnog zračenja često se dovode u pitanje i povezuju s mogućim utjecajem drugih faktora (socio-ekonomskih, medicinskih, životnim stilom, stresom). Također su tu često upitne i same kontrole, njihov broj i odabir. Promjene koje se dovode u vezu s različitim bolestima uglavnom su premale i smatra se da se ne mogu izravno povezati s utjecajem na zdravlje (Dada i sur. 1999, Hjollund i sur. 1997, Jauchem 2007).

Neka od istraživanja pokazala su da je mikrovalno zračenje imalo utjecaja na promjene u kardiovaskularnom sustavu što je dovelo do promjene srčanog ritma, povećanja krvnog tlaka te povećanog protoka krvi (Vangelova i sur. 2006, Jauchem 2007). Istraživanja provedena na ljudima koji rade na televizijskom odašiljaču i satelitskim komunikacijskim centrima pokazala su promjene u imunološkom sustavu. Zabilježen je porast limfocita te IgG i IgA kao i smanjen omjer T-pomoćnih i T-

supresorskih limfocita (Jauchem 2007). Proučavanjem žena koje žive na geografskom području sa povećanim brojem radio/televizijskih odašiljača uočena je smanjena razina interferona- $\gamma$  (Del Signore sur. 2000). Dada i sur. (1999) proveli su istraživanja na tehničarima zaposlenim na radio i televizijskim postajama te su uočili ili povišene razine estradiola, progesterona, testosterona kao i povećanu koncentraciju trijodtironina (T3), tetrajodtironina (T4) i tiroid stimulirajućeg hormona (TSH). Istraživanja različitih laboratorija također su pokazala da mikrovalno zračenje dovodi do povećanja kromosomskih aberacija, što bi upućivalo na genotoksičnost takvog zračenja (Lalić i sur. 2001, Jauchem 2007).

## **2 CILJ**

Oksidacijski stres koji nastaje kao posljedica nemogu nosti organizma da se obrani od štetnog djelovanja ROS-ova povezuje se s nizom bolesti. Iako se spominje kao uzročnik šećerne bolesti, psorijaze, kardiovaskularnih te neurodegenerativnih bolesti, pojave tumora kao i procesa starenja. Zbog svog kratkog „života“ u organizmu ROS-ove je teško izmjeriti. Međutim, promjene koje oni uzrokuju na biomolekulama (lipidi, DNA, proteini) trajnije su. Stoga se promijenjene biomolekule smatraju biomarkerima oksidacijskog stresa. Također se promjenama koje nastaju u antioksidacijskom sistemu može pratiti oksidacijski stres. MDA nastaje kao produkt LPO, dok oksidirani proteini nastaju uslijed oksidativnih, ali i neoksidativnih procesa. Njihove povećane koncentracije ukazuju na oksidacijski stres. GSH je glavni antioksidans u našem organizmu i smanjenje koncentracije ukazuje na izloženost organizma stresu (Šepić i Dodig 2003).

Mikrovalno zračenje navodi se kao jedan od egzogenih izvora slobodnih radikala. Iako je isto kontradiktorna, brojna istraživanja dovode mikrovalno zračenje u vezu sa različitim bolestima koje su vezane uz imunološki, kardiovaskularni, živčani i reproduktivni sustav (Lalić i sur. 2001, Dadić i sur. 1999, Jauchem 2007).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li utjecaj mikrovalnog zračenja na oksidacijski stres. U tu svrhu sakupljena je krv osoba izloženih mikrovalnom zračenju kao i kontrolnih skupina. U sakupljenim uzorcima pune krvi mjerene su koncentracije GSH, MDA i oksidiranih proteina. Dobiveni rezultati ukazali bi na povezanost mikrovalnog zračenja s oksidacijskim stresom.

### **3 MATERIJALI I METODE**

## 3.1 MATERIJALI

### 3.1.1 KEMIKALIJE

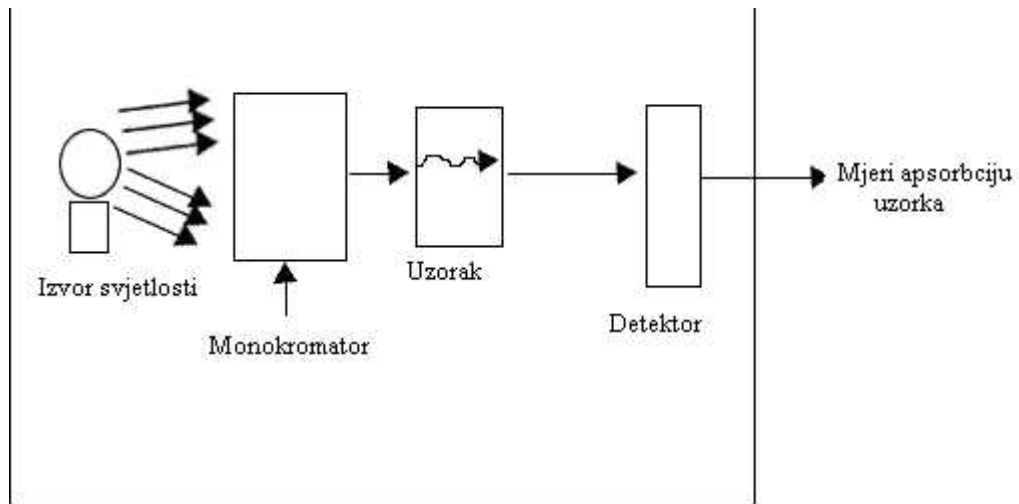
- natrijev dihidrogenfosfat dodekahidrat, kristalni,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrijev dihidrogenfosfat dihidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 5, 5' ditiobis-2-nitrobenzoat (DTNB), Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- pufer otopina pH 7,00 (fosfat), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- pufer otopina pH 4,00 (citrati/kloridna kiselina), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- metafosforna kiselina, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- reducirani glutation (GSH), Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- mravlja kiselina,  $\text{CH}_2\text{O}_2$ , 98-100 % (bezvodna), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Serva blue G, ekvivalentna s Coomassie brilliant blue 6-250, min 91 % isto e
- albumin gove i serum (BSA), 98-99 % isto e, Sigma Chemical Co, St.Louis, SAD
- ortofosforna kiselina, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- etanol,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- fosforna kiselina,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , min 85 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 2-tiobarbituratna kiselina (TBA), Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- metanol HPLC isto e, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- voda HPLC isto e, Merck, Darmstadt, Njema ka
- 1,1,3,3-tetrametoksi-propan malonaldehid bis (dimetil acetal), Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- kalijev dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck, Darmstadt, Njema ka
- butilirani hidroksitoluen (BHT), min 99 %, Sigma Chemical Co, St.Louis, SAD
- guanidin-hidroklorid, min 99 % Cl, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- klorovodik, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- trikloroetena kiselina (TCA), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 2, 4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etil-acetat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

### 3.1.2 APARATURA

- pH metar, MA 5730, Iskra Pio d.o.o Šentjernej, Slovenija
- analiti ka vaga, H54AR, Mettler, Švicarska
- analiti ka vaga, P136, Mettler, Švicarska
- spektrofotometar Cecil 9000, Cecil Instruments Limited, Cambridge, Velika Britanija, s pisa em Star LC 100
- miješalica, Vibromix 114, Tehnica, Železnik, Slovenija
- klini ka centrifuga, International Equipment Co, Boston Mass, 220V
- centrifuga, MPW – 223e, MPW Medical – Instruments, Poljska
- ultrazvu na kupelj, Sonis 4, Iskra Pio d.o.o, Šentjernej, Slovenija
- vodena kupelj, Termo-medicinski aparati Bodalec & Havoi , Dugo selo, Zagreb
- HPLC se sastojao od pumpe LC-20 AD, autosamplera SIL-20AC, UV/VIS detektora SPD-20AV, termostata CTO-20 A, softwara LC solution version 1,22 SP1, sve Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan i analiti ke kolone (C18), Merck, Darmstadt, Njema ka

#### 3.1.2.1 SPEKTROFOTOMETAR

Spektrofotometar je ure aj za analizu spektra elektromagnetskog zra enja. Sastoji se od izvora zra enja, monokromatora i detektora. Svjetlost lampe prolazi kroz monokromator koji iz spektra svjetlosti izdvaja svjetlo odre ene valne duljine. Svjetlo pri tome prolazi kroz uzorak koji mjerimo, dio svjetla apsorbira sam uzorak, a dio prolazi kroz njega i dolazi do detektora. Bilježenjem intenziteta zra enja koje je uzorak apsorbirao, propustio ili reflektirao ovisno o valnoj duljini nastaje spektar (Slika 2).



**Slika 2** Shematski prikaz rada spektrofotometra

Spektrofotometar kvantitativno mjeri količinu svjetla koja prođe kroz otopinu. Omjer intenziteta svjetla koji prolazi kroz uzorak koji mjerimo i pripadaju u slijepu probu prikazujemo kao apsorbanciju

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

Ako je  $I < I_0$  znači da je uzorak apsorbirao dio svjetla. Vrijednost izmjerene apsorbancije svjetla u uzorku ovisi o koncentraciji uzorka u otopini, ali i o duljini puta zrake svjetlosti kroz uzorak, tj. o širini kivete. Ta ovisnost prikazana je Beer-Lambertovim zakonom o apsorbanciji svjetla gdje je  $A$  apsorbancija svjetla,  $\varepsilon$  je molarni ekstinkcijski koeficijent koji je konstantan za određeni spoj i valnu duljinu pri kojoj se mjeri,  $c$  je koncentracija uzorka u otopini, a  $l$  je širina kivete (standardne kivete imaju  $l = 1$  cm) ([www.chemguide.co.uk](http://www.chemguide.co.uk)).

$$A = \varepsilon l c$$

### 3.1.2.2 TEKU INSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

HPLC je vrsta tekućinske kromatografije koja omogućuje razdvajanje te kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenata smjese (Slika 3). Temelji se na razdiobi sastojaka između pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne) faze.

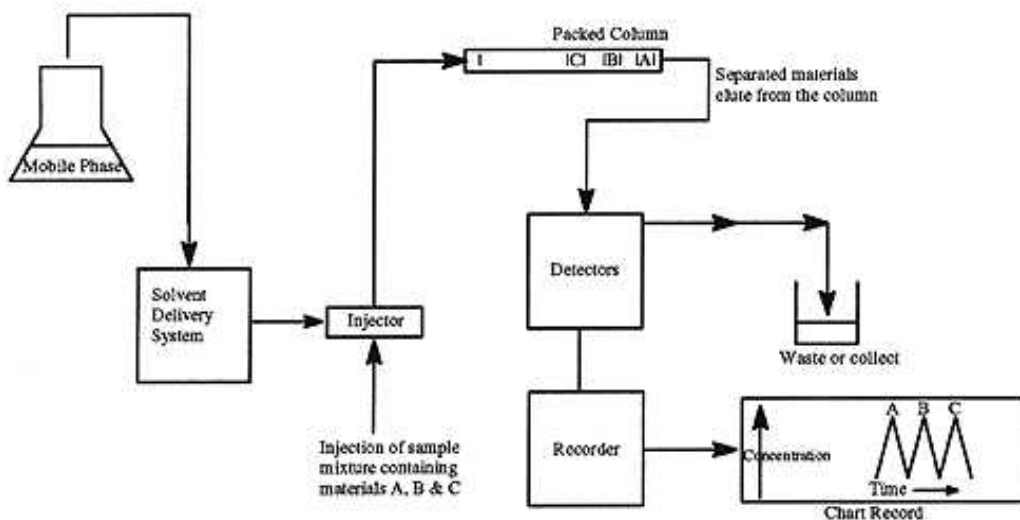


HPLC se sastoji od spremnika mobilne faze, pumpe, ure aja za unošenje uzoraka (injektora), analiti ke kolone i detektora (www.elchem.kaist.ac.kr).

Visoki tlak omogu uje primjenu stacionarnih faza vrlo sitnih estica. Time se postiže velika preciznost, to nost i brzina analize, odli na separacija komponenata i reproducibilnost rezultata te mogu nost dugotrajne upotrebe kolone. Metoda je posebno pogodna za odvajanje makromolekula, ionskih spojeva, farmaceutskih preparata i slabo stabilnih prirodnih produkata kao što su proteini, nukleinske kiseline, aminokiseline, polisaharidi, steroidi i vitamini.

Mobilna faza nakon podešavanja protoka kontinuirano protje e sustavom uz pomo visokotla ne pumpe na sobnoj temperaturi. Ne smije sadržavati otopljeni zrak, koji u protivnom utje e na samu kolonu kao i postupak razdvajanja.

Uzorak se unosi u struju mobilne faze na po etku kolone pomo u injektora koji omogu uje da se uzorak unese bez pada tlaka. Mobilna faza nosi uzorak na kolonu gdje se pojedine komponente uzorka razdvajaju. Na koloni se komponente razdvajaju pod visokim tlakom i prolaze kroz nju razli itim brzinama što ovisi o njihovim kemijskim ili fizikalnim interakcijama sa stacionarnom fazom. Vrijeme zadržavanja na koloni smatra se specifi nim svojstvo te komponente. Izlazak s kolone registrira se nekom fizikalnom metodom (npr. mjerenjem apsorbancije), a signali se prenose na ra unalo i dalje obra uju softverom (Skoog 1992).



Slika 3 Shematski prikaz rada HPLC-a

### 3.1.3 PRIKUPLJANJE UZORAKA

Venska krv prikupljena je i pohranjena u heparinizirane vacutainere (BD Vacutainer Tubes) te odmah potom zamrznuta na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uzorci pune krvi sakupljeni su od 28 zaposlenika koji su bili izloženi mikrovalnom zračenju radara frekvencije 1,5 GHz do 10,9 GHz, gustoće snage električnog polja od  $10\text{ }\mu\text{W}/\text{cm}^2$  do  $10\text{ mW}/\text{cm}^2$ . Kao kontrolne skupine poslužili su nam uzorci krvi 8 zaposlenika Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Cijeli postupak odobrilo je Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 POUZDANOST METODE

Svaka metoda koja se primjenjuje za neku pretragu mora biti pouzdana. Pouzdanost neke metode uključuje selektivnost, osjetljivost, točnost i preciznost. Selektivnost metode govori koliko je mogućnost metode da u smjesi sličnih tvari izdvoji onu koju dokazujemo. Metoda je selektivnija što je manje tvari koje će njenom primjenom dati signal. Najviši stupanj selektivnosti je specifičnost. Selektivnost odnosno specifičnost metode obično ispita i opiše njezin autor pa se često više ne provjerava u laboratoriju. Pod osjetljivošću neke metode podrazumijeva se najmanja koncentracija (ili aktivnost, ako se radi o enzimu) koja se tom metodom može sigurno odrediti. Osjetljivost metode također obično navodi njezin autor. Točnost metode pokazuje za koliko se dobiveni rezultat razlikuje od prave vrijednosti. Taj podatak također obično navodi autor, ali se on stalno mora ispitivati i kontrolirati u laboratoriju jer podliježe raznim mogućnostima grešaka u radu, ovisi o radu analitičara i mjernih instrumenata, o ispravnosti i čistoći pribora te drugim čimbenicima. Kažemo da je metoda precizna ako se njenom primjenom na različitim aparatima, u različito vrijeme, uz različite analitičare dobiju ponovljivi rezultati (Štraus 1988).

### 3.2.2 ODREĐIVANJE UKUPNIH PROTEINA

Određivanje ukupnih proteina (još se naziva i Bradfordova reakcija) temelji se na vezanju boje Coomassie Brilliant Blue (u našem slučaju Serva-Blue G) na proteine što dovodi do povećanja maksimuma apsorpcije. Reakcija se odvija pri kiselom pH pri čemu se boja u otopini protonira te ima crvenu boju, a vezanjem na proteine postaje anion i mijenja boju u plavu te dolazi do metakromatskog odgovora. Povećanje apsorpcije se mjeri na 595 nm (Bradford 1979). Metoda je brza, osjetljiva, jednostavna i ponovljiva te se njome u kratkom vremenskom razdoblju može analizirati veliki broj uzoraka (Sapan i sur. 1999).

#### 3.2.2.1 PRIPREMA OTOPINA

Standard za izradu baždarnog dijagrama pripremljen je otapanjem 10 mg albumina goveg seruma (BSA) u 10 mL vode. Iz matične otopine pripreme su standardi koncentracija 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, mg/mL.

Boja je pripremljena tako da je 22 mg Serva-Blue G otopljeno u 20 mL 100% etanola, 40 mL 85 % ortofosforne kiseline i 340 mL redestilirane vode.

#### 3.2.2.2 PRIPREMA STANDARDA

Standarde BSA različitih koncentracija priredili smo na sljedeći način:

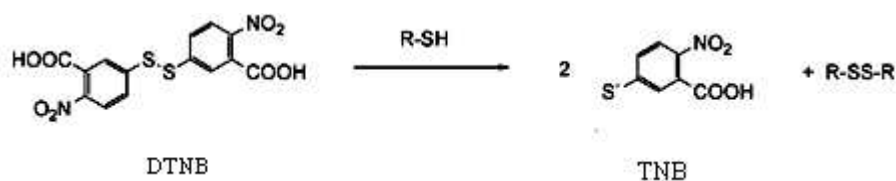
koncentracija standarda (mg/mL)	BSA (μL)	re voda (μL)
0,2	8	32
0,4	16	24
0,6	24	16
0,8	32	8
1	40	0

### 3.2.2.3 POSTUPAK

20  $\mu\text{L}$  hidrolizata pune krvi razrijeeno je s 2 mL fiziološke otopine. U daljnji postupak uzeto je 40  $\mu\text{L}$  tako razrijeenog uzorka u koji je potom dodano 40  $\mu\text{L}$  mravlje kiseline i 2 mL boje. Svaki uzorak napravljen je u triplicatu. Epruvete s uzorcima su promiješane i ostavljene 10 minuta kako bi došlo do reakcije vezanja boje na proteine. Odziv detektora (apsorbancija) izmjerena je na 595 nm pri 22 °C prema slijepoj probi. Uz svaku seriju uzoraka napravljena je i serija standarda iz kojih smo dobili baždarni dijagram. Koncentracija proteina u nepoznatom uzorku izražavata je pomoću baždarnog dijagrama standarda poznatih koncentracija. U račun su uzeta u obzir razrijeenja uzorka pri hidrolizi pune krvi te sa fiziološkom otopinom.

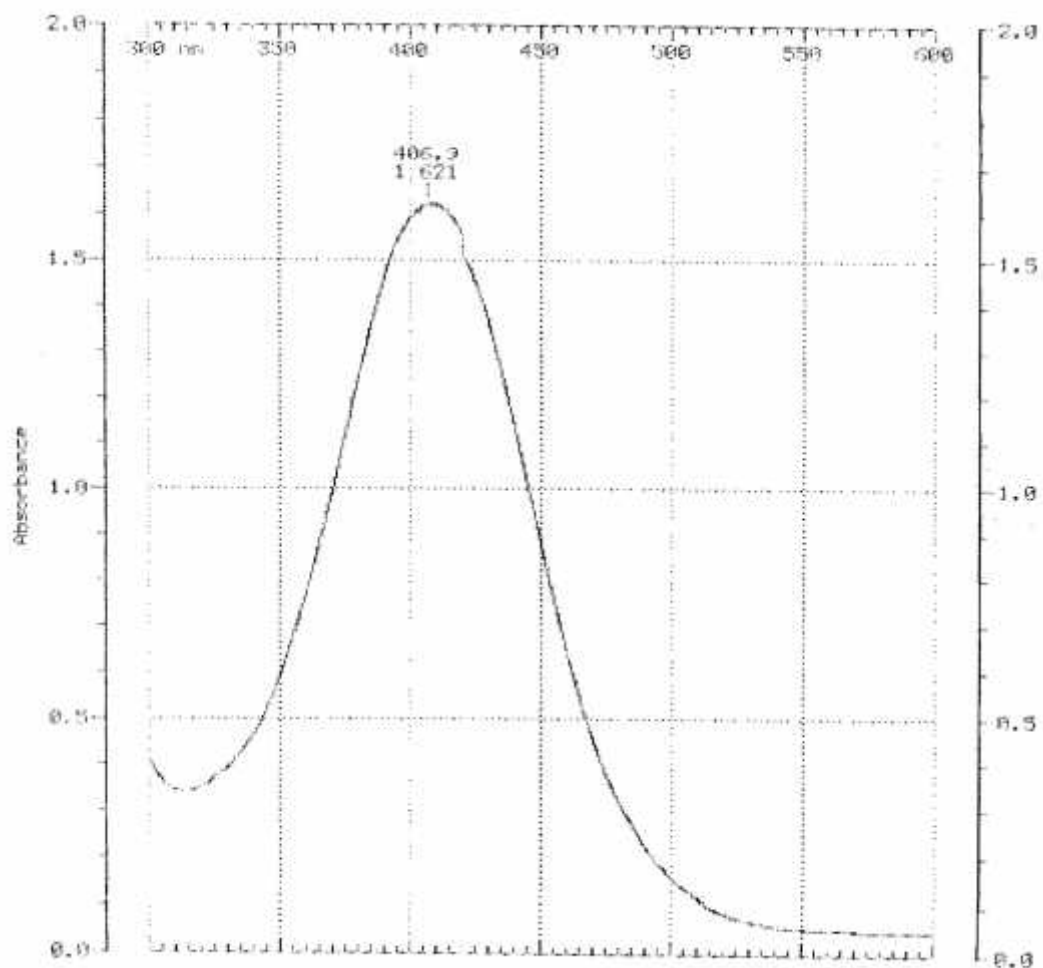
### 3.2.3 *ODREĐIVANJE REDUCIRANOG GLUTATIONA*

Postupak određivanja koncentracije GSH temelji se na reakciji GSH i DTNB-a (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoat). DTNB poznat je i kao Elmanov reagens, a koristi se pri kolorimetrijskom određivanju tiolnih skupina u biološkim uzorcima (Slika 4). DTNB uzrokuje oksidaciju GSH pri čemu dolazi do stvaranja molekule 2-nitro-5-tiobenzoatne kiseline (TNB) i molekule glutation disulfida (GSSG). TNB je žuto obojani produkt koji se mjeri spektrofotometrijski, a na temelju toga indirektno dobivamo podatak o koncentraciji GSH (Eyer i sur. 2003).



**Slika 4** Reakcija DTNBa s tiolnom skupinom spoja

Snimanjem spektra standarda GSH u reakciji s DTNB-om ukazao je da je maksimum apsorpcije reakcijske smjese na 412 nm te smo tu valnu duljinu koristili za daljnja mjerenja (Slika 5). Za samu reakciju bitno je da se odvija pri neutralnom pH jer promjena pH negativno utječe na detekciju GSH.



Slika 5 Apсорpcijski spektar standarda GSH

### 3.2.3.1 PRIPREMA OTOPINA

Na-fosfatni puffer (0,3 M, pH 7,4) pripremljen je tako da su najprije pripremljene otopine 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  i 0,3 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  te su pomiješane kako bi pH otopine bio 7,4.

Otopina 1 mM DTNB-a pripremljena je otapanjem 0,0792 g DTNB-a u 20 mL fosfatnog puffera.

Otopina 1 % metafosforne kiseline (MPA) pripremljena je otapanjem 0,1 g MPA u 10 mL destilirane vode.

### 3.2.3.2 PRIPREMA STANDARDA

Standardi GSH različitih koncentracija dobiveni su iz prethodno pripremljene matične otopine GSH koncentracije 1000 µg/mL dobivenog otapanjem 25 mg GSH u 25 mL fosfatnog pufera. Pufer je prethodno stavljen 15 minuta u ultrazvučnu kupelj kako bi se uklonio otopljeni zrak koji negativno utječe na stabilnost GSH. Iz matične otopine daljnjim razrjeđivanjem napravljena je otopina koncentracije 200 µg/mL tako da je u odmjerenu tikvicu od 10 mL uzeto 2 mL matične otopine i nadopunjeno s fosfatnim puferom. Iz te otopine napravljeni su standardi na sljedeći način:

koncentracija standarda (µg/mL)	priprema otopina
100	1 mL matične otopine + 1 mL fosfatni pufer
50	1 mL standarda (100 µg/mL) + 1 mL fosfatni pufer
20	1 mL matične otopine + 9 mL fosfatni pufer
15	750 µL matične otopine + 9,250 mL fosfatni pufer
10	2 mL standarda (20 µg/mL) + 2 mL fosfatni pufer
5	1 mL standarda (10 µg/mL) + 1 mL fosfatni pufer

### 3.2.3.3 POSTUPAK

Uzorak pune krvi hidroliziran je tako da je u 800 µL pune krvi dodano 3,2 mL destilirane vode nakon čega su uzorci kratko promiješani. U daljnji postupak uzeto je 3,5 mL hidrolizata kojemu je dodan jednak volumen (3,5 mL) 1 % MPA. U preostalom dijelu hidrolizata izmjereni su ukupni proteini. Dodatkom MPA došlo je do taloženja proteina čime su uklonjeni svi proteini i oni koji imaju tiolnu skupinu, a koji bi reagirali sa DTNB-om i tako ometali reakciju dajući i lažno pozitivne rezultate. Epruvete sa uzorcima su kratko promiješane i centrifugirane 10 minuta kako bi se talog bolje odvojio. Nakon centrifugiranja odvojili smo dio supernatanta za analizu GSH, a dio je pohranjen za analizu MDA. U 500 µL supernatanta uzorka dodano je 300 µL fosfatnog pufera i 50 µL DTNB-a. Uzorci i standardi rađeni su u triplikatu. Epruvete su kratko promiješane, a odaziv detektora (apsorbancija) izmjerena je pri 412 nm na 25 °C prema slijepoj probi. Koncentracija GSH u nepoznatom uzorku izračunata je pomoću

baždarnog dijagrama standarda poznate koncentracije. U radu su uzeta u obzir razriješenja uzorka pri hidrolizi pune krvi i u reakciji s kiselinom.

### *3.2.4 ODREĐIVANJE MALONDIALDEHIDA*

Metoda koja se koristi za određivanje MDA zasniva se na reakciji tiobarbituratne kiseline (TBA) i MDA. MDA u kiselim uvjetima reagira sa TBA u omjeru 1:2 pri čemu nastaje crveni pigment čija apsorbancija se mjeri pri 532 nm. Specifičnost TBA reakcije postignuta je upotrebom antioksidansa butiliranog hidroksitoluena (BHT) u reakcijskoj smjesi te HPLC-om. HPLC omogućava odvajanje kompleksa MDA-TBA od ostalih komponenti u smjesi koje također apsorbiraju svjetlost pri 532 nm (Esterbauer 1996).

#### *3.2.4.1 PRIPREMA OTOPINA*

Matična otopina BHT pripravljena je otapanjem 1 g BHT u 100 mL etanola. Otopina 0,2 % BHT dobivena je razriješenjem matične otopine tako da je 2 mL matične otopine nadopunjeno etanolom do 10 mL.

Otopina 1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pripravljena je dodavanjem 1,18 mL 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  u odmjerenu tikvicu od 100 mL koju smo nadopunili destiliranom vodom.

Otopina 0,6 % TBA dobivena je otapanjem 0,3 g TBA u 50 mL destilirane vode. S obzirom da se TBA teško otapa, otapanje smo ubrzali zagrijavanjem u vodenoj kupelji.

Za mobilnu fazu za HPLC pripremljena je 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  otapanjem 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u 1 L vode HPLC klase. 50 mM otopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pomiješana je s metanolom HPLC klase u omjeru 60:40. Tako pripravljenoj mobilnoj fazi podešen je pH na 6,8 pomoću 5 M otopine kalijevog hidroksida (KOH). Otopina je profiltrirana i stavljena u ultrazvučnu kupelj kako bi se uklonio višak otopljenog zraka koji bi oštetio kolonu.

### 3.2.4.2 PRIPREMA STANDARDA MDA

Mati na otopina standarda priprema je razrijevanjem 25  $\mu\text{L}$  otopine MDA koncentracije  $6,07 \times 10^{-3}$  mol/mL u 50 mL destilirane vode. Koncentracija tako pripremljene otopine bila je 3,035 mM. Iz matične otopine različite koncentracije standarda pripremljene su na sljedeći način:

koncentracije standarda MDA ( $\mu\text{M}$ )	priprema otopina
30,35	100 $\mu\text{L}$ matične otopine nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL
15,175	50 $\mu\text{L}$ matične otopine nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL
6,07	20 $\mu\text{L}$ matične otopine nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL
3,035	25 $\mu\text{L}$ matične otopine nadopuniti destiliranom vodom do 25 mL
1,5175	5 mL standarda (3,035 $\mu\text{M}$ ) nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL
0,607	2 mL standarda (3,035 $\mu\text{M}$ ) nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL
0,3035	1 mL standarda (3,035 $\mu\text{M}$ ) nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL

### 3.2.4.3 POSTUPAK

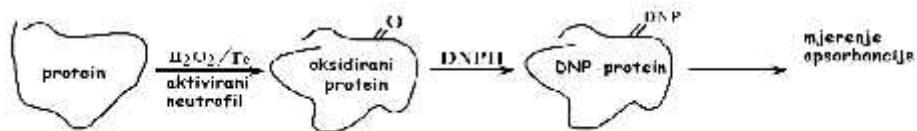
U 200  $\mu\text{L}$  supernatanta pune krvi dobivenog nakon hidrolize pune krvi i taloženja proteina s MPA dodano je 20  $\mu\text{L}$  BHT i 750  $\mu\text{L}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Sadržaj epruveta je kratko promiješan nakon čega je dodano 400  $\mu\text{L}$  TBA te ponovno promiješano. Uzorci su rađeni u duplikatu. Uz svaku seriju uzoraka napravljena je i serija standarda. Epruvete s uzorcima stavljene su 20 minuta u vodenu kupelj prethodno zagrijanu na 100  $^{\circ}\text{C}$ . Nakon zagrijavanja epruvete su stavljene u hladnu vodu kako bi se reakcija prekinula. Uzorci su potom prebađeni u autosampler koji je termostatiran na 15  $^{\circ}\text{C}$ . Protok mobilne faze podešen je na 1 mL/min. Valna duljina detektora bila je 532 nm. Uređaj je podešen tako da injektor uzima 20  $\mu\text{L}$  uzorka. Ukupna analiza trajala je 10 min za svaki uzorak, uzorci su prolazili kroz analitičku kolonu koja je termostatirana na 32  $^{\circ}\text{C}$ . Vrijeme zadržavanja MDA na analitičkoj koloni bilo je 2,5 min. Koncentracija MDA u nepoznatom uzorku izražavana je pomoću baždarnog dijagrama standarda



poznate koncentracije. U radu su uzeta u obzir razrijeđena uzoraka pri hidrolizi pune krvi te u reakciji s MPA.

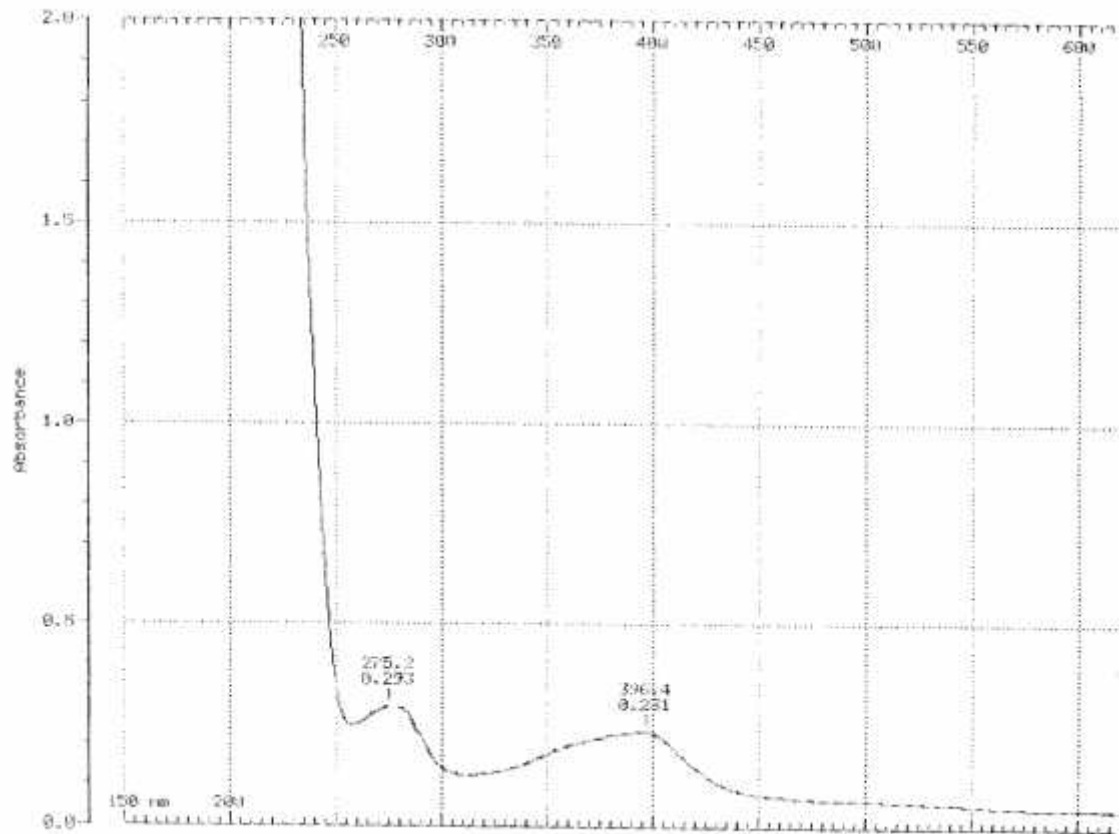
### 3.2.5 MJERENJE OKSIDIRANIH PROTEINA

Protein-karbonili koriste se kao marker oksidacijskog oštećenja proteina (Slika 6). U reakciji protein-karbonila s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) dolazi do supstitucije karbonilne skupine s DNPH, koji s proteinom čini stabilan spoj (Adams i sur. 2001).



Slika 6 Vežanje DNPH za oksidirani protein

Protein-karbonili mjereni su spektrofotometrijski. Iako se prema literaturi apsorbancija mjeri pri 370 nm, naš snimljeni spektar reakcijske smjese pokazao je da je max. apsorbancije pri 400 nm (Slika 7).



**Slika 7** Apsorpcijski spektar protein-karbonila sa max. apsorpcije pri 400 nm

Koncentracija oksidiranih proteina (protein-karbonila) izra unata je preko molarnog ekstinkcijskog koeficijenta koji iznosi  $\epsilon = 22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Adams i sur. 2001).

### 3.2.5.1 PRIPREMA OTOPINA

Otopina 10 % trikloroctene kiseline (TCA) dobivena je otapanjem 10 g TCA u 100 mL vode.

Otopina 2 M kloridne kiseline (HCl) prire ena je razrje ivanjem titrivala HCl-a sa 250 mL vode.

Otopina 0,2 % 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) dobivena je otapanjem 0,2 g DNPH u 100 mL 2M HCl-a.

Otopina 1:1 etanola i etilacetata dobivena je mješanjem etanola i etilacetata.

Otopina 6 M guanidin hidroklorida priprema se otapanjem 57,31 g guanidina u 100 mL vode. Otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj kako bi se guanidin brže otopio.

### *3.2.5.2 POSTUPAK*

Prije samog postupka vacutainer s punom krvi se promiješa, uzme se 10  $\mu$ L pune krvi i razrijedi s 1 mL destilirane vode. U daljnji postupak uzeto je 500  $\mu$ L hidrolizata razrijeđene pune krvi kojoj je dodano 500  $\mu$ L 10 % TCA. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 2000 g, nakon čega je supernatant dekantiran. Na talog je dodano 1 mL 0,2 % DNPH, te je ostavljeno u mraku 1 sat na sobnoj temperaturi uz povremeno mješanje kako bi došlo do reakcije. Uzorcima je dodano 1 mL 10 % TCA, nakon čega su ponovno 10 minuta centrifugirani pri 2000 g. Dobiveni talog koji sadrži DNPH ispran je dva puta s 1 mL otopine etanol:etilacetata. Talog je otopljen s 2 mL 6 M guanidina i stavljen u ultrazvučnu kupelj kako bi se ubrzalo otapanje. Svi uzorci su rađeni u triplikatu. Apsorbancija je mjerena u kvarcnim kivetama pri 400 nm u odnosu na guanidin koji je korišten kao slijepa proba. Koncentracija je izražavana pomoću molarnog ekstinkcijskog koeficijenta, a u računu je uzeto u obzir razrijeđene pune krvi.

### *3.2.6 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA*

Kako bi prikazali razlike u koncentracijama GSH, MDA i oksidiranih proteina između skupine uzoraka izloženih mikrovalnom zračenju i kontrolne skupine korišten je Student t-test za nezavisne uzorke.

Kao značajna razlika korištena je razina značajnosti od  $p < 0,05$ . Za analizu je korišten kompjuterski program Statistica 5.5.

## **4 REZULTATI**

## 4.1 UKUPNI PROTEINI

U uzorcima pune krvi nakon postupka hidrolize i razrjeivanja fiziološkom otopinom, izmjereni su ukupni proteini pomoću Bradford-ove metode na 595 nm.

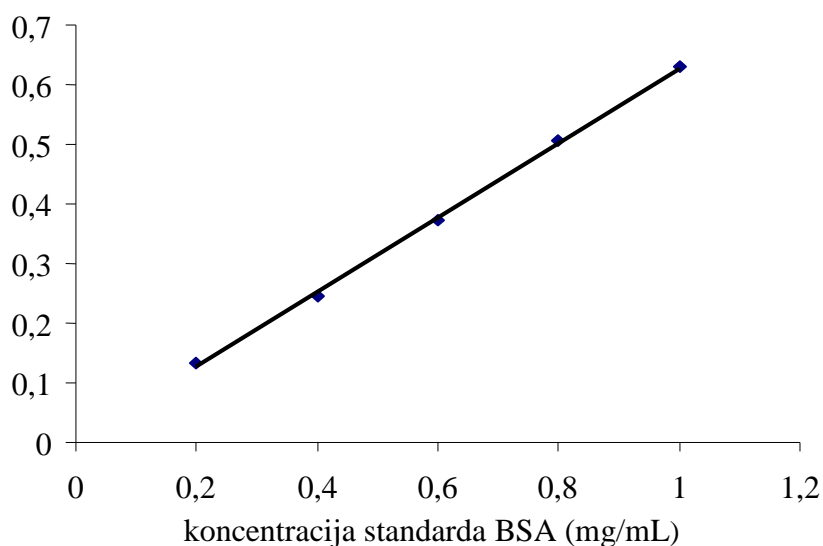
Koncentracije ukupnih proteina uzoraka izloženih mikrovalnom zračenju i kontrolne skupine izražene su u mg/mL, a izrađene pomoću baždarnog dijagrama dobivenog iz standarda BSA.

Baždarni dijagram dobiven je iz srednjih vrijednosti apsorbancija (odaziv detektora) pri različitim koncentracijama standarda (Tablica 1).

**Tablica 1 Srednje vrijednosti izmjerene apsorbancije pri različitim koncentracijama standarda BSA**

koncentracija standarda BSA (mg/mL)	A
0,2	0,133
0,4	0,244
0,6	0,372
0,8	0,506
1	0,629

odaziv detektora (A)



**Slika 8 Baždarni dijagram za BSA**

Baždarni dijagram prikazan na Slici 8 bio je linearan, koeficijent linearnosti ( $r^2$ ) iznosio je  $r^2 = 0,9991$ , a jednačba pravca bila je  $y = 0,627x + 0,0006$ .

## 4.2 REDUCIRANI GLUTATION

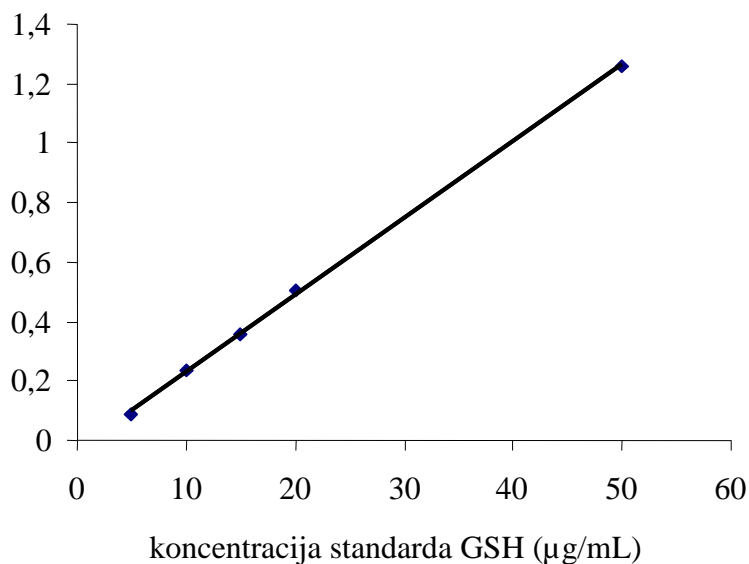
Iz uzoraka prethodno hemolizirane pune krvi u kojoj su istaloženi proteini odvojen je supernatant u kojem je detektiran GSH. Metoda koja je korištena temelji se na specifičnoj reakciji DTNB-a i tiolnih skupina spoja koja daje produkt žutog obojenja. Apsorbancija je mjerena na 25 °C pri 412 nm.

Koncentracije GSH u uzorcima izloženim mikrovalnom zračenju i kontrolnim skupinama izražene su u  $\mu\text{g/mL}$ , a izražene su korištenjem baždarnog dijagrama dobivenog iz srednjih vrijednosti apsorbancija poznatih koncentracija standarda GSH (Tablica 2).

**Tablica 2 Srednje vrijednosti izmjerene apsorbancije pri različitim koncentracijama standarda GSH**

koncentracija standarda GSH ( $\mu\text{g/mL}$ )	A
50	1,259
20	0,508
15	0,358
10	0,235
5	0,087

odaziv detektora (A)



**Slika 9 Baždarni dijagram standarda GSH**

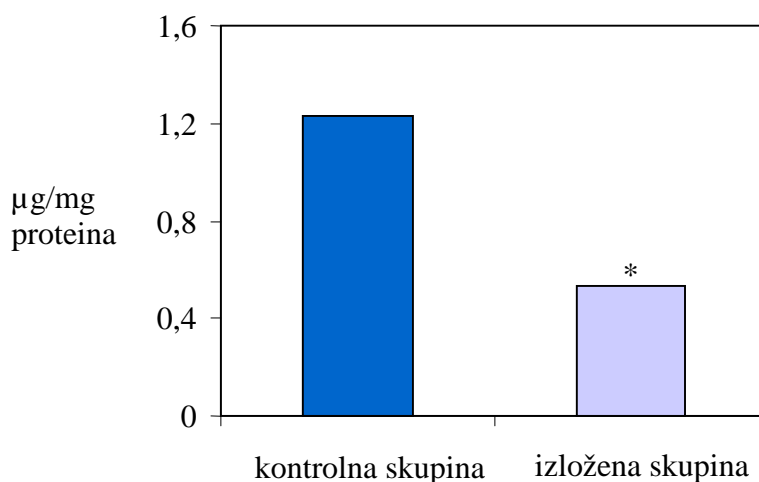
Baždarni je dijagram (Slika 9) bio linearan, koeficijent linearnosti iznosio je 0,9993, dok je jednadžba pravca bila  $y = 0,0259x - 0,0278$ .

Dobivene koncentracije GSH ( $\mu\text{g/mL}$ ) izražene su u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina iz istog uzorka ( $\text{mg/mL}$ ), tako da je koncentracija GSH izražena kao  $\mu\text{g/mg}$  proteina. U Tablici 3 rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija koncentracije. Statisti ka analiza (t-test za nezavisne uzorke) pokazala je da postoji zna ajna razlika ( $p < 0,05$ ) između koncentracija GSH u izloženoj i kontrolnoj skupini (Slika 10).

**Tablica 3 Srednja vrijednost i standardna devijacija koncentracije GSH izražene preko ukupnih proteina**

	koncentracija GSH ( $\mu\text{g/mg}$ proteina)
kontrolna skupina	$1,23 \pm 0,28$
izložena skupina	$0,53 \pm 0,18^*$

\* statisti ki zna ajna razlika ( $p < 0,05$ )



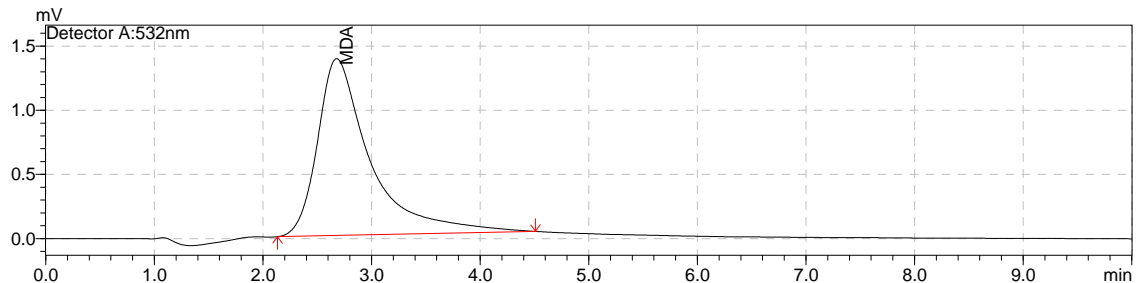
**Slika 10 Koncentracija GSH ( $\mu\text{g/mg}$  proteina) u kontrolnoj i izloženoj skupini**

### 4.3 MALONDIALDEHID

Princip metode određivanja MDA temelji se na reakciji MDA s TBA, a nastali produkt izmjeren je na 532 nm.

Koncentracija MDA izmjerena je pomoću HPLC-a. Rezultat svakog uzorka koji prođe kroz HPLC je kromatogram. Kromatogram na Slici 11 prikazuje signal MDA ije

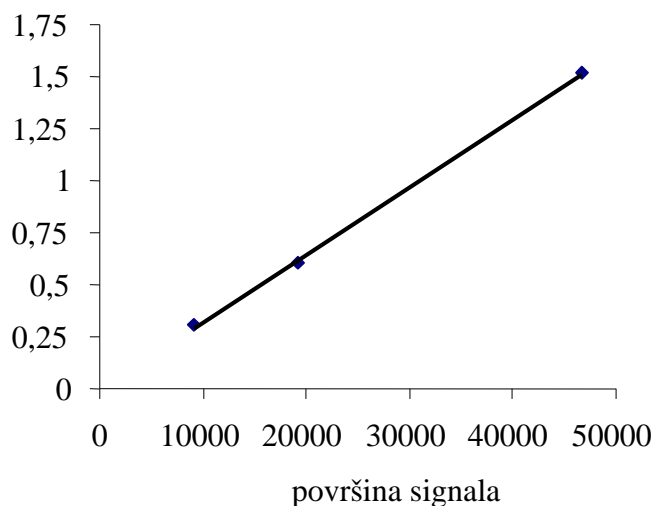
je vrijeme zadržavanja na analiti koj koloni 2,5 minute. Površina signala odgovara koncentraciji MDA. Koncentracija MDA određena je mjerenjem površine signala korištenjem kompjuterskog softvera.



**Slika 11 Kromatogram standarda MDA koncentracije 1,518  $\mu\text{M}$**

Nepoznate koncentracije MDA iz uzoraka izraunate su korištenjem baždarnog dijagrama koji je pripremljen iz standarda MDA poznatih koncentracija. Baždarni dijagram prikazuje ovisnost koncentracije standarda MDA o površini koju prekriva signal. Baždarni dijagram (Slika 12) bio je linearan, koeficijent linearosti iznosio je  $r^2 = 0,9995$ , a jednačba pravca iznosila je  $y = 3 \times 10^{-5} x - 0,0035$ .

koncentracija ( $\mu\text{M}$ )



**Slika 12. Baždarni dijagram standarda MDA**

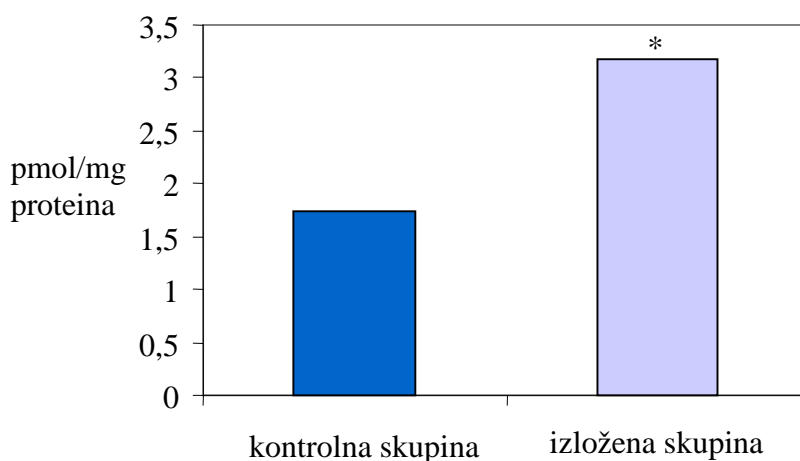


Dobivene koncentracije MDA ( $\mu\text{M}$ ) prikazane su u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina iz istog uzorka ( $\text{mg/mL}$ ), tako da je koncentracija MDA izražena kao  $\text{pmol/mg}$  proteina. Rezultati u Tablici 4 prikazani su kao srednja vrijednost i standardna devijacija koncentracije. Statisti ka analiza (Slika 13) pokazala je da postoji zna ajna razlika ( $p < 0,05$ ) izme u koncentracija MDA u uzorcima izložene i kontrolne skupine.

**Tablica 4 Srednja vrijednost i standardna devijacija koncentracije MDA izražene u  $\text{pmol/mg}$  proteina**

	koncentracija MDA ( $\text{pmol/mg}$ proteina)
kontrolna skupina	$1,74 \pm 0,27$
izložena skupina	$3,17 \pm 1,92^*$

\* statisti ki zna ajna razlika ( $p < 0,05$ )



**Slika 13 Koncentracija MDA ( $\text{pmol/mg}$  proteina) u kontrolnoj i izloženoj skupini**

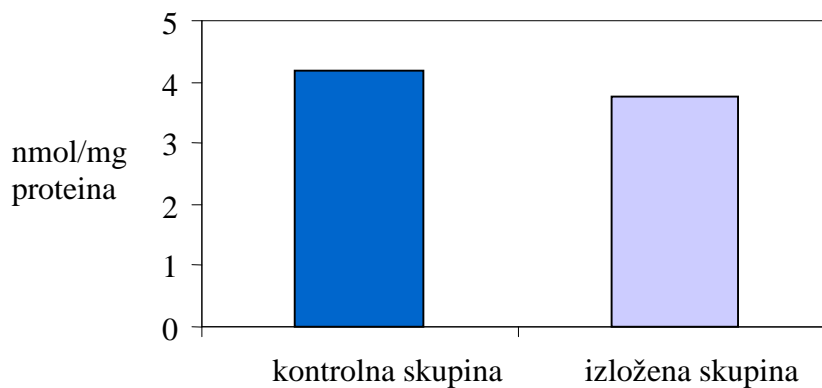
#### 4.4 OKSIDIRANI PROTEINI

Oksidirani proteini izmjereni su u uzorcima pune krvi razrije eni destiliranom vodom. Nakon supstitucije DNPH sa karbonilnom skupinom vezanom za protein izmjerena je apsorbancija pri 400 nm. Koncentracije protein-karbonila izra unate su preko formule za apsorbanciju ( $A = \epsilon l c$ ),  $\epsilon$  je iznosio  $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a  $l$  je iznosio 1 cm. U Tablici 5 koncentracije oksidiranih proteina ( $\text{mM}$ ) prikazane su u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina u istom uzorku ( $\text{mg/mL}$ ) tako da je koncentracija oksidiranih proteina izražena kao  $\text{nmol/mg}$  proteina.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija koncentracije. Statisti ka analiza pokazala je da nema zna ajne razlike ( $p < 0,085$ ) izme u koncentracija oksidiranih proteina u uzorcima kontrolne i izložene skupine (Slika 14).

**Tablica 5 Srednja vrijednost i standardna devijacija koncentracije oksidiranih proteina izražene u nmol/mg proteina**

	koncentracija oksidiranih proteina (nmol/mg proteina)
kontrolna skupina	$4,19 \pm 0,67$
izložena skupina	$3,76 \pm 0,60$



**Slika 14 Koncentracija oksidiranih proteina (nmol/mg ukupnih proteina) u kontrolnoj i izloženoj skupini**

## **5 RASPRAVA**

Mikrovalno zračenje ubrajamo u neionizirajuće zračenje, a obuhvaća spektralno područje od 300 MHz do 300 GHz. Mobilni telefoni, mikrovalne pećnice, sateliti, antene i radari samo su neki od izvora mikrovalnog zračenja (www.who.int). Do danas su provedena mnogobrojna istraživanja kojima je cilj utvrditi ili opovrgnuti štetno djelovanje ovog zračenja. Većina dobivenih rezultata međusobno su kontradiktorna, a još uvijek nije predložen odgovarajući mehanizam koji bi objasnio biološki utjecaj zračenja. Neka od istraživanja povezuju štetnost u inak mikrovalnog zračenja s pojavom ROS-ova koji uzrokuju oksidacijski stres (Llhan i sur. 2004, Møller i sur. 1996, Meral i sur. 2007). Oksidacijski stres nastaje kao nemogućnost organizma da ukloni ili spriječi nastajanje ROS-ova. Većina dosadašnjih istraživanja provedena je na životinjama. Irmak i sur. (2002) izložili su žene zračenju od 900 MHz nakon čega su proučavali promjene u koncentracijama nekih od pokazatelja oksidacijskog stresa u serumu i mozgu. Za neke od parametara dobili su pozitivan rezultat, a za neke kao što je MDA uočeno ili su da nije došlo do promjene u koncentraciji. Zaključili su da bi povećanje oksidacijskog stresa moglo biti pokazatelj negativnog utjecaja inka elektromagnetskog zračenja. Istraživanja provedena na štakorima i zamorcima koji su bili izloženi zračenju od 900 MHz pokazala su da je u mozgu došlo do povećanja koncentracije MDA te smanjenja GSH (Llhan i sur. 2004, Meral i sur. 2007). Autori predlažu daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo da li te promjene utječu i na samu funkciju neurona. Ferreira i sur. (2006) nisu uočili promjene na proteinima i lipidima u mozgu štakora izloženih zračenju od 800-1800 MHz, ali smatraju da bi se istraživanja trebala nastaviti mijenjajući i pri tome vrijeme ekspozicije zračenja te ispitivanjem utjecaja na druga tkiva.

Do sada je provedeno vrlo malo istraživanja na ljudima koja bi dovela u vezu utjecaj mikrovalnog zračenja sa oksidacijskim stresom. Moustafa i sur. (2001) ispitali su utjecaj zračenja od 900 MHz koje emitiraju mobilni telefoni sa pojavom indikatora oksidacijskog stresa. Uočeno ili su da je kod ljudi izloženih zračenju došlo do povećanja lipidnih peroksida te smanjenja aktivnosti SOD i GPx, dok je aktivnost katalaze pri tome ostala nepromijenjena. U svrhu ispitivanja povezanosti mikrovalnog zračenja s oksidacijskim stresom u ljudskom organizmu proveli smo daljnja istraživanja. U uzorcima pune krvi osoba izloženih zračenju mjerili smo koncentracije GSH, MDA te oksidirane proteine.

GSH je glavni antioksidans u organizmu. U stanicama ga nalazimo u reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG) obliku ili vezanog na proteine. Koncentracija GSH u stanicama varira od 0,5-10 mM, dok se u plazmi i mokraći nalazi

u  $\mu\text{M}$  koncentracijama ( epalek i Dodig 2003). U po etnoj fazi izloženosti organizma stresu prekida se dotok glutamina, cisteina i metionina, a koncentracija GSH u jetri više ne ovisi samo o GSSG, koji se može prevesti u GSH, ve i o zaliham a cisteina i glutamina iz miši a i unutarnjih organa. Kao rezultat postojanja tih zaliha, pove ava se transport GSH iz jetre kako bi se zaštitio odre eni organ od oksidacijskog stresa. Što je izloženost stresu ve a to je ve i pad koncentracije GSH (Valencia i sur. 2001). Prethodni rezultati upu uju na to da bi koncentracije GSH u krvi mogle poslužiti kao to an indikator statusa GSH kod ljudi.

Uloga GSH mogla bi biti klju an faktor u održanju zdravlja, a koncentracije GSH mogle bi se koristiti kao pokazatelj rizika nastanka bolesti (Richie i sur. 1996). Mjerenje koncentracije GSH temelji se na reakciji GSH i DTNB-a, a produkt reakcije mjeri se spektrofotometrijski pri 412 nm. Koncentracija GSH izražena je u odnosu na prethodno izmjerene ukupne proteine. Koncentracija GSH izložene skupine bila je  $0,53 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{mg}$  proteina i bila je statisti ki zna ajno niža od kontrolne skupine ija je koncentracija iznosila  $1,23 \pm 0,28 \mu\text{g}/\text{mg}$  proteina (Tablica 3). Ti rezultati pokazuju da mikrovalno zra enje utje e na smanjenje koncentracije GSH u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 3). Dobiveni rezultati slažu se s rezultatima istraživanja Merala i sur. (2007) na zamorcima.

MDA nastaje kao produkt LPO, procesa u kojem djelovanjem ROS-ova dolazi do razgradnje višestruko nezasi enih masnih kiselina, a MDA ima mutageno i karcinogeno svojstvo (Marnett 1999). Budu i da je i sam reaktivan, može nastaviti lan anu reakciju oksidacijskog ošte enja (Esterbauer i sur. 1991). MDA je odre en spektrofotometrijski nakon reakcije s TBA kao i pomo u HPLC-a. Korištenjem HPLC-a postignuta je ve a specifi nost detekcije budu i da TBA ne reagira samo sa MDA ve i sa nekim drugim spojevima koji nisu povezani sa LPO te se korištenjem HPLC-a postiglo razdvajanja tih drugih spojeva (Esterbauer 1996). Koncentracija MDA u uzorcima osoba izloženih mikrovalnom zra enju bila je povišena i iznosila je  $3,17 \pm 1,92 \text{ pmol}/\text{mg}$  proteina te je bila statisti ki zna ajno razli ita ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu ( $1,74 \pm 0,27 \text{ pmol}/\text{mg}$  proteina) (Tablica 4).

Oksidirani proteini mogu se detektirati preko sadržaja protein-karbonila i ta se metoda naj eš e koristi za njihovo odre ivanje. Nastanak protein-karbonila uzrokuju ROS-ovi. Oksidacijom proteina dolazi do promjene u njihovoj strukturi, što se nadalje povezuje sa pojavom bolesti i procesom starenja (Chevion i sur. 2000). Koncentraciju protein-karbonila odredili smo u reakciji sa DNPH, a izmjerili spektrofotometrijski na

temelju predložene metode Adams i sur. (2001) koju smo malo modificirali. Koncentraciju protein-karbonila odredili smo u uzorcima pune krvi. Dobiveni rezultati nisu pokazivali statistički značajnu razliku između skupine izložene mikrovalnom zračenju i kontrolne skupine. Već prije provedena istraživanja pokazala su da hemoglobin, mioglobin i citokrom C imaju maksimum apsorpcije na valnoj duljini od 360 nm, što je u rasponu apsorpcije pri kojoj se detektiraju protein-karbonili te tako utječu na dobivene rezultate (Adams i sur. 2001). Kako su naši uzorci sadržavali hemoglobin, nje je koncentracija u ljudi vrlo različita za pretpostaviti je da su upravo ti faktori utjecali na dobiveni rezultat. Zbog toga bi se pri mjerenju oksidiranih proteina trebalo voditi računa o prisutnosti tih molekula kao i o eventualnoj primjeni specifičnije metode od spektrofotometrije (npr. HPLC).

Ovim istraživanjem pokazalo se da mikrovalno zračenje radara od 1,5 GHz-10,9 GHz uzrokuje promjenu u koncentracijama MDA i GSH, što ukazuje na mogućnost nastanka ROS-ova, odnosno pojavu oksidacijskog stresa.

## **6 ZAKLJUČKI**

1. U uzorcima pune krvi moguće je spektrofotometrijski izmjeriti koncentraciju GSH nakon taloženja proteina koji bi mogli ometati reakciju.
2. Koncentracija MDA u uzorcima pune krvi izmjerena je pomoću HPLC-a. Korištenje HPLC-a omogućilo je razdvajanje interferencija i time se metoda smatra specifičnom i pouzdanom.
3. Oksidirane proteine nije moguće izmjeriti spektrofotometrijski u uzorcima pune krvi zbog interferencije sa hemoglobinom koji ima maksimum apsorpcije u istom rasponu mjerenja. Zbog toga bi za mjerenje oksidiranih proteina trebalo ukloniti interferencije korištenjem neke specifične metode poput HPLC-a ili Western blota.
4. U uzorcima pune krvi osoba izloženih mikrovalnom zračenju (1,5 GHz-10,9 GHz) došlo je do promjene u koncentraciji GSH.
5. Izmeću izložene i kontrolne skupine uočena je statistički značajna razlika u koncentracijama MDA.
6. Dobiveni rezultati ukazuju na to da bi mogla postojati veza između mikrovalnog zračenja i nastanka ROS-ova te pojave oksidacijskog stresa.



## **7 POPIS CITIRANE LITERATURE**

Adams S., Green P., Claxton R., Simcox S., Williams M.V., Walsh K., Leeuwenburgh C. (2001): Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Frontiers in Bioscience* **6**: 17-24.

Bergqvist B., Arvidsson L., Pettersson E., Gakt S., Saalman E., Hamnerius Y., Nordén B. (1994): Effect of microwave radiation on permeability of liposomes. Evidence against non-thermal leakage. *Biochim. Biophys. Acta* **1201**: 51–54.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

Chevion M., Berenshtein E., Stadtman E.R. (2000): Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Research* **33**: 99-108.

epalek I., Dodig S. (2003): Glutation i oksidacijski stres. *Biochemia Medica* **3-4**: 93-100.

Da da S., Balci K., Kaya H., Celik M.S. (1999): Hormone levels of people occupationally exposed to radiofrequencies. *Biochem. Arch.* **15**: 255-260.

Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. (1997): Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* **324**: 1-18.

Del Signore A., Boscolo P., Kouri S., Di Martino G., Giuliano G. (2000): Combined effects of traffic and electromagnetic fields on the immune system of fertile atopic women. *Industrial Health* **38**: 294–300.

Esterbauer H. (1996): Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Path. Biol.* **44**: 25-28.

Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**: 81-128.

Eyer P., Worek F., Kiderlen D., Sinko G., Stuglin A., Simeon-Rudolf V., Reiner E. (2003): Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical Biochemistry* **312**: 224-227.

Ferreira A.R., Bonatto F., de Bittencourt Pasquali M.A., Polydoro M., Dal-Pizzol F., Fernández C., de Salles A.A., Moreira J.C. (2006): Oxidative stress effects on the central nervous system of rats after acute exposure to ultra high frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* **27**: 487-493.

Fesenko E.E., Geletyuk V.I., Kazachenko V.N. Chemeris N.K. (1995): Preliminary microwave irradiation of water solutions changes their channel-modifying activity. *FEBS Lett.* **366**: 49–52.

- Fleury C., Mignotte B., Vayssiere J.L. (2002): Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochemie* **84**: 131-141.
- Fraga C.G., Tappel A.L. (1988): Damage to DNA concurrently with lipid peroxidation in rat liver slices. *Biochem. J.* **252**: 893-896.
- Fridovich I. (1983): Superoxide radical as an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**: 239-257.
- Friedman M., Kazazi S., Kezele N., Klasni L., McGlynn S.P., Peur S., Pryor, W.A. (2000): Role of nitrogen oxides in ozone toxicity. *Croat. Chem. Acta.* **73**: 1141-1151.
- Garaj-Vrhovac V., Gajski G., Troši I., Pavić I. (2009): Evaluation of basal DNA damage and oxidative stress in Wistar rat leukocytes after exposure to microwave radiation. *Toxicology* (in press).
- Garaj-Vrhovac V., Orešanić V. (2009): Assessment of DNA sensitivity in peripheral blood leukocytes after occupational exposure to microwave radiation: the alkaline comet assay and chromatid breakage assay. *Cell Biol Toxicol.* **25(1)**: 33-43.
- Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J. (2001): Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochem Soc. Trans.* **29**: 345-350.
- Hjollund N.H.I., Bonde J.P., Skotte J. (1997): Semen analysis of personnel operating military radar equipment. *Reprod. Toxicol.* **11**: 897.
- Ilhan A., Gurel A., Armutcu F., Kamisli S., Iraz M., Akyo O., Ozen S. (2004): Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta* **340**: 153-162.
- Irmak M.K., Fadıllođlu E., Güleç M., Erdođan H., Yađmurca M., Akyol O. (2002): Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits. *Cell Biochemistry and Function* **20**: 279-283.
- Jauchem J.R. (2008): Effects of low-level radio-frequency (3 kHz to 300 GHz) energy on human cardiovascular, reproductive, immune and other systems: A review of the recent literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **211**: 1-29.
- Lacković Z. (2002): Farmakološki antioksidansi. U: Bradamante V., Lacković Z. (ur.) *Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa*. Zagreb, Biblioteka stalnog medicinskog usavršavanja, str. 10-24.
- Lalić H., Lekić A., Radošević B. (2001): Comparison of chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from people occupationally exposed to ionizing and radiofrequency radiation. *Acta Med. Okayama* **55**: 117-127.
- Marani E., Feirabend H.K.P. (1993): A nonthermal microwave effect does not exist. *Eur. J. Morphol.* **31**: 141-144.

- Marnett L.J. (1999): Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research* **424**: 83-95.
- Martinez-Blasco A., Hermenegildo C., Bosch-morell F., Romero F.J. (1996) Role of oxidative stress in experimentally-induced diabetic nephropathy: mechanisms involved. *J. Physiol.* **493**: 104.
- Mc Conkey D.J., Hartzell P., Jondal M., Orrenius, S. (1989): Inhibition of DNA fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents that stimulate protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **264**: 13399-13402.
- Meral I., Mert H., Mert N., Deger Y., Yoruk I., Yetkin A., Keskin S. (2007): Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs. *Brain Res* **1169**: 120-124.
- Moustafa Y. M., Moustafa R. M., Belacy A., Abou-El-Ela S.H., Ali F.M. (2001): Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **26**: 605-608.
- Møller P., Wallin H., Knudsen L.E. (1996): Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-Biological Interactions* **102**: 17-36.
- Orlando A.R., Mossa G. D'Inzeo G. (1994): Effect of microwave radiation on the permeability of carbonic anhydrase loaded unilamellar liposomes. *Bioelectromagnetics* **15**: 303-313.
- Packer J.E. (1995): Oxidative stress, antioxidants, aging and disease. U: Gultner R.G., Packer L.B., Eratum J., Mori A. (ur.) *Oxidative Stress and Aging*. Basle, Switzerland, Birkhauser Verlag, str. 152-163.
- Pavi i I. (2004): U inci radiofrekventnoga mikrovalnog zra enja na stanicu i strukture citoskeleta. *Arh Hig Rada Toksikol* **55**: 321-328.
- Phelan A.M., Neubauer C.F., Timm R., Neirenberg J., Lange D.G. (1994): Athermal alterations in the structure of the canalicular membrane and ATPase activity induced by thermal levels of microwave radiation. *Radiat. Res.* **137**: 52-58.
- Porcelli M., Cacciapuoti G., Fusco S., Massa R., d'Ambrosio G., Bertoldo C., De Rosa M., Zappia V. (1997): Non-thermal effects of microwaves on proteins: thermophilic enzymes as model system. *FEBS Letters* **402**: 102-106.
- Reznick A.Z., Cross C. E., Hu M-L., Suzuki Y.J., Khwaja S., Safadi A., Motchnik P.A., Packer L., Halliwell B. (1992): Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem. J.* **286**: 607-611.
- Richie J.P., Skowronski L., Abraham P., Leutzinger Y. (1996): Blood glutathione concentrations in large-scale human study. *Clinical Chemistry* **42**: 64-70

Sapan C.V., Lundblad R.L., Price N.C. (1999): Colorimetric protein assay techniques. *biotechnol.Appl.Biochem.* **29**: 99-108.

Saran M., Michel C., Bors W. (1990): Reactions of NO with  $O_2^{\bullet-}$ . Implications for the action of endothelium-relaxing factor. *Free Radic Res Commun.* **10**: 221-226.

Skoog D.A., Leary J.J. (1992): *Principles of Instrumental Analysis*. Saunders College Publishing, Philadelphia.

Stadtman E.R. (1992): Protein oxidation and aging. *Science* **257**: 1220-1224.

Stadtman E.R., Oliver C.N. (1991): Metal-catalyzed oxidation of proteins. *The Journal of biological chemistry* **266**: 2005-2008.

Stanner S.A., Hughes J., Kelly C.N., Buttriss J. (2004): A review of the epidemiological evidence for the "antioxidant hypothesis". *Public Health Nutr.* **7**: 407-422.

wiergosz-Kowalewska R., Bednarska A., Kafel A. (2006): Glutathione levels and enzyme activity in the tissues of bank vole *Clethrionomys glareolus* chronically exposed to a mixture of metal contaminants. *Chemosphere* **65**: 963-974.

Štraus B. (1988): *Medicinska biokemija*. Zagreb, Jugoslavenska medicinska naklada, str. 7-9.

Valencia E., Marin A., Hardy G. (2001): Glutathione- Nutritional and pharmacological viewpoints: Part II. *Nutrition* **17**: 485-486.

Valencia E., Marin A., Hardy G. (2001): Glutathione-Nutritional and pharmacological viewpoints: part III. *Nutrition* **17**: 696-697.

Vangelova K., Deyanov C., Israel M. (2006): Cardiovascular risk in operators under radiofrequency electromagnetic radiation. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **209**: 133-138.

Vidavalur R., Otani H., Singal P.K., Maulik N. (2006): Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Exp Clin Cardiol.* **11(3)**: 217-225.

Waris G., Ahsan H. (2006): Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* **5**: 14.

A website with HPLC information, 1996. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) [online]. Preuzeto sa <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/lc/hplc.htm> [citirano 15 travnja 2008].

A website with information about Beer-Lambert law []. The Beer-Lambert law [online]. Preuzeto sa <http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/beerlambert.html> [citirano 15 travnja 2008].

A website with information about spectrometer []. Spectrometer [online]. Preuzeto sa <http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/spectrometer.html> [citirano 15 travnja 2008].

Kwan-Hoong, N. []. Non-Ionizing Radiations – Sources, Biological Effects, Emissions and Exposures [online]. Proceedings of the International Conference on Non-Ionizing Radiation at UNITEN (ICNIR2003) Electromagnetic Fields and Our Health 20<sup>th</sup> – 22<sup>nd</sup> October 2003 Preuzeto sa <http://www.radiology.um.edu.my/umris/molecular-imaging-malaysia-2005-abstract-template.doc> [citirano 23 ožujka 2009].

WHO. What are electromagnetic fields? Geneva, World Health Organization. Preuzeto sa <http://www.who.int/peh-emf/about/WhatisEMF/en/index.html> [citirano 23 ožujka 2009].