

# Oksidacijska stabilnost različitih tkiva sivog puha (Glis glis)

---

**Pincan, Loredana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:498305>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Loredana Pincan

Oksidacijska stabilnost različitih tkiva sivog puha (*Glis glis*)

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju i Zavodu za veterinarsku ekonomiku i epidemiologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnici: prof. dr. sc. Suzana Milinković Tur

prof. dr. sc. Marina Pavlak

Mentori: prof. dr. sc. Jasna Aladrović

izv. prof. dr. sc. Dean Konjević

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Lana Pađen
2. izv. prof. dr. sc. Dean Konjević
3. prof. dr. sc. Jasna Aladrović
4. dr. sc. Blanka Beer Ljubić

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	2
<b>2.1. Biologija sivog puha</b> .....	2
2.1.1. Klasifikacija i rasprostranjenost sivog puha.....	2
2.1.2. Morfologija sivog puha .....	4
2.1.3. Hibernacija sivog puha.....	5
<b>2.2. Antioksidansi i oksidacijski stres</b> .....	5
2.2.2. Slobodni radikali i oksidacijski stres.....	7
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	9
<b>3.1. Životinje</b> .....	9
<b>3.2. Uzimanje i priprema uzoraka za analize</b> .....	9
<b>3.3 Analiza uzoraka</b> .....	10
3.3.1. Aktivnosti enzima glutation peroksidaze (GSH-Px).....	10
3.3.2. Aktivnost paraoksonaze 1 .....	10
3.3.3. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD).....	10
3.3.4. Biološki antioksidacijski potencijal ( <i>engl. biological antioxidant potential, BAP</i> ) .....	11
3.3.5. Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita.....	11
<b>3.4. Statistička analiza rezultata</b> .....	11
<b>REZULTATI</b> .....	12
<b>4.1. Aktivnost glutation peroksidaze</b> .....	12
<b>4.2. Aktivnost paraoksonaze 1</b> .....	14
<b>4.3. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze</b> .....	16
<b>4.4. Biološki antioksidacijski potencijal</b> .....	18
<b>4.6. Korelacija pokazatelja antioksidacijskog sustava i reaktivnih metabolita kisika</b> .....	21
<b>5. RASPRAVA</b> .....	23
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	28
<b>7. LITERATURA</b> .....	29
<b>8. SAŽETAK</b> .....	36
<b>9. SUMMARY</b> .....	38
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	40

## Zahvala

Veliku zahvalnost, u prvom redu dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasni Aladrović na dugoj suradnji od ranih fakultetskih dana bez čijeg znanja, vodstva, razumijevanja, strpljenja i savjeta moji dani provedeni na fakultetu, bili bi puno preplašeniji i nesigurniji, kao i na podršci prilikom izrade svih mojih znanstveno - istraživačkih radova. Hvala Vam na ukazanom povjerenju.

Također se zahvaljujem i mentoru izv. prof. dr. sc. Deanu Konjeviću na omogućenim uzorcima bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć kao i na prenesenom znanju i vodstvu prilikom pisanja samog rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Lani Pađen i dr. sc. Blanki Beer Ljubić na pomoći u samoj obradi rezultata i prilikom pisanja diplomskog rada.

Veliko Hvala gospođi Jasni Sačer na toplim riječima i pomoći kroz sve studentske godine.

Posebnu zahvalu upućujem svim svojim kolegama koji su bili ovdje od prvih dana a posebno Mariji Krkljuš, Anji Simić, Mirni Paravić, i Ozrenu Šiftaru. Bez vas cijeli ovaj proces ne bi bio ispunjen s toliko smijeha i veselja.

I na kraju, najveću zaslugu za sva svoja postignuća pripisujem svojim roditeljima i baki koji su uvijek bili tu kao vjetar u leđa od početka do kraja kroz najbolje i najgore trenutke. Bez vas sve što sam do sada postigla ne bi bilo moguće i zato vam hvala na podršci, strpljenju i ljubavi.

Za kraj jedno veliko hvala svima koji su na bilo koji način ovaj period mog života učinili jednim od najljepših.

## **Kratice**

BAP - biološki antioksidacijski potencijal

CuZnSOD - bakar cink superoksid dismutaza

GSH - reducirani glutation

GSH-Px - glutation peroksidaza

HDL - lipoproteini velike gustoće (eng. high density lipoprotein)

LDL - lipoproteini niske gustoće (eng. low density lipoprotein)

MnSOD - manganska superoksid dismutaza

PON - paraoksonaza

ROM - reaktivni metaboliti kisika

ROS - reaktivni kisikovi spojevi

SOD - superoksid dismutaza

Popis slika

**Slika 1.** Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U Carr/g proteina).

**Slika 2.** Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U Carr/g tkiva).

**Slika 3.** Aktivnost paraoksonaze 1 (PON1) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g proteina).

**Slika 4.** Aktivnost paraoksonaze 1 (PON1) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g tkiva).

**Slika 5.** Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g proteina).

**Slika 6.** Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g tkiva).

**Slika 7.** Koncentracija biološkog antioksidacijskog potencijala (BAP) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu ( $\mu\text{mol/g}$  proteina).

**Slika 8.** Koncentracija biološkog antioksidacijskog potencijala (BAP) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu ( $\mu\text{mol/g}$  tkiva).

**Slika 9.** Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita (d-ROM) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g proteina).

**Slika 10.** Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita (d-ROM) u jetrenom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g tkiva).

**Slika 11.** Omjer aktivnosti glutathion peroksidaze i superoksid dismutaze u jetrenom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu.

**Slika 12.** Omjer aktivnosti glutathion peroksidaze i paraoksonaze 1 u jetrenom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu.



## 1. UVOD

Sivi puh (*Glis glis* L.), je autohtona sitna divljač našeg područja iz reda glodavaca (*Rodentia*), porodice puhova (*Myoxidae*) i roda puh (*Glis*). Nastanjuje sva područja Republike Hrvatske. Puhovi su pravi prezimari čiji je metabolizam tijekom proljeća i ljeta vrlo intenzivan, pare se, donose na svijet mlade te se pojačano hrane kako bi se pripremili za hibernaciju. Pri fiziološkim uvjetima proizvodnja reaktivnih kisikovih spojeva i drugih molekula koje izazivaju oksidacije u organizmu te koncentracija/aktivnost antioksidativnim molekulama su u ravnoteži, međutim uslijed djelovanja različitih čimbenika dolazi do poremećaja i razvoja oksidacijskog stresa. Pojačano hranjenje tijekom ljeta u svrhu skladištenja energije i iskorištavanja nakon buđenja, te nakupljanje potkožnog masnog tkiva i povećanje tjelesne mase intenzivni su procesi koji zahtijevaju adaptaciju antioksidacijskog sustava na navedene promjene. Stoga je cilj rada bio utvrditi:

1. Aktivnost antioksidacijskih enzima glutation peroksidaze, paraoksonaze 1 i superoksid dismutaze u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu ženki i mužjaka sivog puha neposredno pred hibernaciju
2. Koncentraciju neenzimskih antioksidacijskih molekula kao biološki antioksidacijski potencijal (BAP) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu ženki i mužjaka sivog puha neposredno pred hibernaciju
3. Koncentraciju reaktivnih kisikovih metabolita u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu ženki i mužjaka sivog puha neposredno pred hibernaciju.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Biologija sivog puha

#### 2.1.1. Klasifikacija i rasprostranjenost sivog puha

Puhovi su jedni od rijetkih sisavaca koji su porijeklom s europskog kontinenta (BARRETT-HAMILTON, 1898, BARRETT-HAMILTON, 1899, HÜRNER i sur., 2010). Rasprostranjeni su od sjeverne Afrike, preko Europe sve do zapadne i srednje Azije pa čak i Japana (CABRERA 1908, ANDREA 1986, DIMAKI, 1999, GIGIREY i sur., 1999, BURGESS i sur., 2003). Puhovi (*Gliriade*, sin. *Muscardinidae*) se svrstavaju u porodicu koja uključuje 6 rodova i 19 vrsta. Sistematska podjela puha po VIOLANI i ZAVA (1995):

KOLJENO: Svitkovci (*Chordata*)

PODKOLJENO: Kralježnjaci (*Vertebrata*)

RAZRED: Sisavci (*Mammalia*)

PODRAZRED: Pravi sisavci (*Theria, Eutheria*) Plodnaši (*Placentalia*)

KOHORTA: Puhovi (*Glires*)

RED: Glodavci (*Rodentia*)

PORODICA: Puhovi (*Gliridae*, sin. *Muscardinidae, Myoxidae*)

ROD: *Glis* (sin. *Myoxus*)

VRSTA: sivi (veliki) puh (*Glis glis* L.)

U Hrvatskoj su zabilježene četiri vrste puha i to sljedeće: krški puh (*Eliomys quercinus*), puh orašar (*Muscardinus avelanarius*), gorski puh (*Dryomys nitedula*), sivi puh (*Glis glis*) (PERIĆ, 2016). Sivi puh nastanjuje sva područja Republike Hrvatske i najbrojnija je vrsta puha na području Gorskog kotara (MARGALETIĆ i sur., 2006). Razlog ovome su njegove prehrambene i životne navike. Nastanjuje suhe bukove i hrastove šume (FILIPOVIĆ, 2016) kao i pukotine u stijenama te podrume i potkrovlja kuća (FORENBACHER, 2002).

Sivi puh se pretežito hrani sjemenkama i plodovima različitih vrsta drveća (lješnjaci, orasi, kesten i slatko voće), ali jede još i kukce, puževe i manje ptice (FORENBACHER, 2002).

Sivi puh je životinja koja spava zimski san te ga se u prirodi najviše uočava tijekom kasnog proljeća, u travnju i svibnju, u noćnim satima. Kada temperature u prirodi padnu ispod 0 °C pripremaju se za zimski san (FILIPOVIĆ, 2016), što je najčešće u rujnu (FORENBACHER, 2002). Vrijeme povlačenja puha u pušinu daje nam naznaku kakva će populacija puha biti iduće godine (WILZ i HENDMAIER, 2000, JURCZYSZYN, 2006). S toplijim vremenom puhovi će ranije izlaziti iz jazbina, kao i oni koji obitavaju na nižim nadmorskim visinama (MARGALETIĆ i sur., 2006).

Ženke se kote 2 puta na godinu i nose od 2 do 6 mladunca po leglu (FILIPOVIĆ, 2016), kote mlade u samoći kako ostali puhovi ne bi došli u kontakt s mladima sve dok ne progledaju i stanu na vlastite noge ( KRYŠTUFEK i sur., 2003). Mladunčad se koti slijepa i siše 28 dana. Spolnu zrelost postižu s jednom godinom starosti. (FORENBACHER, 2002), a životni vijek varira od 5 do 10 godina (MORRIS, 2004).

Sivi puh nije posebno osjetljiv ni na koju bolest (SCARAVELLI i ALOISE, 1995) te mu najveću ugrozu predstavljaju prirodni neprijatelji kao što su kuna zlatica (*Martes martes*), kuna bjelica (*Martes foina*), velika lasica (*Mustela erminea*), mala lasica (*Mustela nivalis*), tvor (*Mustela putorius*), lisica (*Vulpe vulpes*), divlja mačka (*Felis silvestris* Schr.), ris (*Lynx lynx*), velika ušara (*Bubo bubo*), sova jastrebača (*Strix uralensis* Pall.) i šumska sova (*Strix aluco*) (JONES-WALTERS i CORBET, 1991).

Lov na puhove tradicionalno se odvija u Hrvatskoj na područjima Istre, Gorskog kotara, Brača, Hvara i Krka. Najizraženije u: Tršće, Gerovo i Prezid. Svako područje ima karakterističan način lova kao i obradu i pripremu mesa. U povijesti pravo lova imali su svi, čak i seljaci kojima je bio zabranjen lov na krupnu divljač (PERIĆ, 2016).

U Hrvatskoj su gorski puh (*D. nitedula*), puh lješnikar (orašar) (*M. avellanarius*) i krški puh (*E. quercinus*) zaštićeni Zakonom o zaštiti prirode (N.N. 70/05), odnosno Pravilnikom o proglašenju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (N.N. 99/09). Istim pravilnikom je uređeno kako je svi puh zaštićen sjeverno od rijeke Save (N.N. 99/09).

Zakon o lovstvu (N.N. 140/05), kaže kako je sivi puh sitna divljač. Po Pravilniku o lovostaju (N.N. 67/10) sivog puha dozvoljeno je loviti od 01. listopada do 30. studenog. Na temelju članka 62. stavka 2. Zakonom o lovstvu (N.N. 140/05), nadležno Ministarstvo ima ovlasti dozvoliti lov za vrijeme lovostaja uz posebne uvjete i okolnosti. Dozvole za lovljenje puhova izdaju pojedine šumarije koje su sastavnice poduzeća Hrvatske šume d.o.o. sukladno Zakonu o lovu iz 1994.

godine (N.N. 10/94). Lov na puhove odvijao se 2 puta godišnje, u proljeće i jesen s nekoliko metoda lova, kao što su: lov pomoću kamena, lov pomoću mrtvolovki, lov pomoću tuljaca, lov dupljama i lov puškom (PERIĆ, 2016).

U prošlosti je meso puha bila dopunska hrana ljudi koji su živjeli u planinskim krajevima. Meso su natrljavali solju i konzervirali u bačvicama kako bi ga koristili kao hranu za dugih zima. Pečeno meso puha smatra se poslasticom i danas se priprema u više restorana kao specijalitet i delikatesa (PERIĆ, 2016).

Od velike je vrijednosti i puhova mast koja se pronalazi oko bubrega i ispod kože, a koristi se kao ljekovito sredstvo za zacjeljivanje rana, opekline i kožnih bolesti (PERIĆ, 2016). Također prisutnost PUFA-a u mesu sivog puha važan je nalaz, zato što se njegovo meso koristi u ljudskoj prehrani te je dobar izvor ove skupine masnih kiselina (ŠIFTAR, 2020).

### 2.1.2. Morfologija sivog puha

Sivi puh najveći je pripadnik porodice puhova (PERVAN i sur., 2019). Jedinka odraslog puha dugačka je od 14 do 20 cm bez repa dok sam rep može biti dug od 10 do 16 cm (MARKOV, 2001). Tjelesna masa može biti sve do 260 grama (ANDREA, 1986). Mužjaci imaju nešto veću masu od ženki međutim po svim ostalim parametrima spolni dimorfizam nije izražen (PERVAN i sur., 2019). Istraživanja provedena na populaciji puhova u Hrvatskoj pokazala su kako je prosječna duljina tijela puha s repom 31 cm. Ženke teže do 114 grama, a mužjaci do 126 grama (PERVAN i sur., 2019).

Rep sivog puha prekriven je dugim, gustim dlakama koje su iste smeđe-sive do srebrnasto-sive boje kao i one na leđima. Oko očiju može imati uski tamniji krug krzna. Tijelo sivog puha je zbijeno s bijelim dlakama na trbuhu dok su noge srednje duljine. Na glavi se nalaze velike okrugle crne oči koje su prilagođene manjku svjetla pošto je puh životinja koja je najaktivnija noću. Uške su malene i okretne te se na njima nalazi manja količina sitnih dlačica (VIETINGHOFF-RIESCH i FRHR, 1960, FILIPOVIĆ, 2016). Ispod nosnih otvora nalaze se dugački pokretni brkovi koji zajedno s prilagođenim vidom za noćni lov čine puha, noćnim lovцем (FITZ i sur., 2005). Na prednjim nogama ima četiri prsta, a na stražnjima pet prstiju. Na svima se nalaze oštre kandže kojima se penje po kori drveta (KAHMANN, 1965, MORISS, 1997). Kod pregleda zubala sivog puha pronađene su razlike u odnosu na zubala drugih sitnih glodavaca (KONJEVIĆ i sur., 2003).

Sjekutići sivog puha rastu cijelog života te se zbog toga moraju brusiti i trošiti (DAAMS, 1981). Uz sjekutiće vidljivi su i jedan par predkutnjaka i tri para kutnjaka (HILLSON, 1990).

### 2.1.3. Hibernacija sivog puha

Fiziološke karakteristike hibernacije su sniženje tjelesne temperature što bliže temperaturi okoline, usporeni metabolizam i spontano uzbuđenje prilikom aktivacije termoregulacijskih mehanizama (KAYSER, 1961, LYMAN i O'BRIAN, 1972). Hibernacija je odlična prilagodba malih sisavaca koji imaju maleno tijelo i veliku frekvenciju srca pa brzo gube tjelesnu toplinu, što u zimskim mjesecima može dovesti do uginuća (MORISS, 2004). Puh je glodavac koji spava zimski san te se iz njega budi u kasno proljeće, ovisno o klimatskim prilikama i nadmorskoj visini (CASTEX i sur., 1984, BURGESS i sur., 2003). Toplije vrijeme uvjetuje raniji izlazak puhova iz pušina i obratno, a na nižim nadmorskim visinama puh se ranije budi od onih na većim nadmorskim visinama (MARGALETIĆ i sur., 2006).

Masa puhova, okvirno je jednaka u proljeće i jesen (PILASTRO, 1994, GRUBEŠIĆ i sur., 2004). Razlog zašto se masa tijekom hibernacije ne mijenja je činjenica da puh svoje životne funkcije u hibernaciji svede na minimum (leterično stanje koje slični snu). Za puha možemo reći da je pravi prezimar i da mu tjelesna temperatura ne prelazi 4 °C u hibernaciji, u odnosu na 35 °C kada je budan. Velika razlika vidljiva je i kod srčane frekvencije koja se sa 450 otkucaja u minuti reducira na svega 35 otkucaja (MORISS, 2004). Sivi puh u hibernaciji vrlo malo troši akumuliranu potkožnu mast zbog usporenih vitalnih funkcija (RUF i sur., 2006). Potkožna mast služi kao izolator krvi i srca, kako se ne bi smrznili od hladnoće. Glavna uloga, te akumulirane potkožne masti, bit će u proljeće nakon buđenja iz zimskog sna i nemogućnosti pronalaska dovoljno kalorične hrane (WILZ i sur., 2000). Vrlo brzo nakon buđenja i gradnje gnijezda kreće sezona parenja u kojoj mužjaci potroše rezervne masti (BIEBER, 1998).

## 2.2. Antioksidansi i oksidacijski stres

### 2.2.1. Antioksidacijski sustav organizma

Antioksidativne molekule uklanjaju slobodne radikale i vodikov peroksid te oksidativno promijenjene molekule. Antioksidanse dijelimo na antioksidativne enzime i neenzimske

antioksidanse. Najvažniji enzimi koji sudjeluju u neutralizaciji slobodnih radikala su: superoksid dismutaza (SOD), glutathion peroksidaza (GSH-Px), katalaza i paraoksonaza. Neenzimatski antioksidansi su molekule koje nastaju kao produkti metaboličkih procesa ili se unose hranom. Metabolički antioksidansi su: glutathion, tioredoksin, koenzim Q, lipoična kiselina, mokraćna kiselina, bilirubin, dok su antioksidansi iz hrane vitamin A, vitamin C, vitamin E, minerali selen i cink, te resveratrol (SABOČANEC, 2006, BOŠNJAKOVIĆ, 2017).

U stanicama i u tjelesnim tekućinama nalazimo veliki broj antioksidansa. Tri primarna antioksidativna enzima sadržana u stanicama sisavaca za koja se vjeruje da su neophodna za život u svim stanicama koje metaboliziraju kisik su superoksid dismutaza (SOD), katalaza i glutathion peroksidaza (GSH-Px) (McCORD i sur., 1971).

Enzim SOD katalizira pretvorbu superoksidnog radikala u vodikov peroksid i molekulami kisik ( $O_2$ ), dok enzimi katalaza i GSH-Px kataliziraju pretvorbu vodikovog peroksida u vodu, a u slučaju katalaze u kisik i vodu. Pored uklanjanja vodikovog peroksida, GSH-Px reagira i s drugim hidroperoksidima. Katalizira redukciju ovisnu o glutathionu (GSH) hidroperoksida nastalih peroksidacijom linolenske i linoleinske kiseline, kolesterol 7  $\beta$  hidroperoksida i različite sintetske hidroperoksida kao što su kumena i t-butil hidroperoksid (GAMBLE i sur., 1997). U ovom istraživanju aktivnost GSH-Px utvrđena je metodom u kojoj se koristi kumena hidroperoksid.

Neto rezultat reakcija kataliziranih GSH-Px i katalazom su uklanjanje dvije potencijalno štetne molekule, superoksidnog radikala i vodikovog peroksida i proizvodnja dvije molekule vode. Enzimi u SOD koriste željezo, cink, bakar i mangan kao kofaktore, katalaza koristi mangan ili željezo, dok GSH-Px koristi selen (IGHODARO i AKINLOYE, 2017).

Do danas su utvrđena tri izoenzima paraoksonaze: PON1, PON2 i PON3 (MACKNESS i sur., 2002; COSTA i sur., 2003, LI i sur., 2003; DRAGANOV i sur., 2004). Slični su po građi i aktivnosti uključujući i sposobnost hidrolize oksidiranih lipida u lipoproteinima niske gustoće (eng. low density lipoproteins, LDL) (GETZ i REARDON, 2004). Izoenzimi PON1 i PON3 nalaze se vezani na *lipoproteinima velike gustoće* (eng. high density lipoprotein, HDL) u plazmi, a uglavnom ih sintetizira jetra (GETZ i REARDON, 2004). Izoenzim PON2 može se utvrditi posvuda u organizmu, smatra se da nije povezan s HDL-om. Sva tri proteina hidroliziraju organofosfate i djeluju kao peroksidaza, laktonaza i arilesteraza. Svi izoenzimi PON-a mogu

katalizirati hidrolizu oksidiranih fosfolipida, uklanjajući oksidirani lipidni aldehid. Najbolje je istražena PON1 (GETZ i REARDON, 2004).

Katalitička koncentracija i aktivnost PON1 u plazmi značajno utječu na rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti. To je vjerojatno posredovano njegovim antioksidacijskim svojstvima uklanjanja oksidiranog LDL. Precizan mehanizam kojim je ovaj protein povezan s HDL-om sprječava ili umanjuje oksidaciju LDL-a i oksidacijski stres tek treba razjasniti (VAN LENTEN i sur., 2001).

Brojni su nenenimski antioksidansi koji različitim mehanizmima sprječavaju pojavu oksidacijskog stresa. Kako je navedeno radi se o vitaminima C, E, A i malim peptidima kao i produktima metabolizma. U istraživanju je koncentracija navedenih molekula utvrđena pomoću biološkog antioksidacijskog potencijala koji mjeri koncentraciju mokraćne kiseline, bilirubina, vitamina C i E (KIM i sur., 2014).

### 2.2.2. Slobodni radikali i oksidacijski stres

Slobodni radikali nestabilne su čestice koje u vanjskoj ljusci imaju nesporeni broj elektrona pa kao takve vrlo lako reagiraju s molekulama. Upravo zbog činjenice što nemaju sparene elektrone u vanjskoj ljusci oni su jako reaktivni spojevi (ŠTEFAN i sur., 2007). Slobodni radikali kisika i njihovi metaboliti, obično nazvani ROS najpoznatiji su slobodni radikali u biološkim sustavima. ROS se stvaraju kao normalni nusproizvodi staničnog metabolizma, od važnosti su za neke fiziološke procese: fosforilaciju proteina, staničnu diferencijaciju, apoptozu, sazrijevanje oocita, steroidogenezu i staničnu imunost (CELI, 2011).

Reaktivni kisikovi spojevi rezultat su mnogih metaboličkih procesa u stanici. Uključuju superoksidni radikal i vodikov peroksid koji reagiraju s različitim membranskim i unutarstaničnim molekulama kao npr. lipidima, proteinima i DNA (CERUTTI, 1985). Mjesta stvaranja slobodnih radikala su: transport elektrona u mitohondrijima, metabolizam masnih kiselina u peroksisomima, citokrom P-450 reakcije i u fagocitima (BECKAM i AMES, 1998).

Ukoliko proizvodnja slobodnih radikala nadmaši kapacitete antioksidativne obrane razvija se oksidacijski stres (ATAKISI i sur., 2010; BOUWSTRA i sur., 2010). Slobodni radikali u većim koncentracijama su citotoksični te mogu dovesti do smrti stanice, mutacija, kromosomskih abnormalnosti i karcinogeneze (CERUTTI i sur., 1985; SAYEED i sur., 2003; MORALES i sur.,

2004). Manje koncentracije nužne su u regulaciji fizioloških mehanizama kao što su diferencijacija, proliferacija stanica i apoptoza (SHIBANUMA i sur., 1988, VAQUERO i sur. 2004).

Poznate su mnogobrojne metode za određivanje koncentracije slobodnih radikala i procjenu intenziteta oksidativnih oštećenja. U ovom istraživanju koristio se d-ROM test koji mjeri koncentraciju vodikovog peroksida. Vodikov peroksid nastaje oksidacijom različitih molekula kao što su glukozi, lipidi, aminokiseline, peptidi, proteini i nukleotidi (CELI i sur., 2008). Rezultati se izražavaju u Caratelli jedinicama (U Carr.), gdje je 1 U Carr jednak 0.08 mg/100 mL vodikovog peroksida (TROTTI i sur., 2002, KILK i sur., 2014).



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Životinje

Istraživanje je odobrilo Povjerenstvo za etiku u veterinarstvu Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa: 640-01/19-17/08 i Ur. broj: 251-61-44-19-03).

Istraživanje je napravljeno na 33 jedinke od čega 18 ženki i 15 mužjaka sivog puha. Sivog puha nalazimo na području cijele Hrvatske, a najbrojniji su na području Gorskog kotara, Like, Istre te na otocima Braču i Hvaru. Jedinke sivog puha ulovljene su tijekom sezone lova (rujan-listopad 2017.) na području grada Čabra.

Životinje su prije uzorkovanja vagane te je utvrđena tjelesna masa bez repa i ukupna masa (trup+rep). Prosječna masa ženki s repom iznosila je  $113,4 \pm 22,9$  g, a masa mužjaka s repom bila  $126,2 \pm 30,2$  g. Prosječna masa ženki bez repa iznosila je  $108,8 \pm 22,4$  g, a mužjaka  $120,8 \pm 28,9$  g. Dob puhova nije poznata, ali prema podacima iz literature o masi puhova, smatra se da je riječ o mlađim jedinkama zbog niže tjelesne mase i dulje aktivnosti u jesen prije hibernacije.

#### 3.2. Uzimanje i priprema uzoraka za analize

Ulovljenim životinjama uzorkovani su: jetra, srce, bubrezi i *m.gluteus*. Nakon odmrzavanja, tkivo jetre i bubrega homogenizirano je u 0,14 mol/L KCl 60 sekundi (tri puta po 20 sekundi s intervalima hlađenja od 10 sekundi) na 9500 okretaja po minuti, tkivo mišića i srca 60 sekundi (tri puta po 20 sekundi s intervalima hlađenja od 10 sekundi) na 13500 okretaja po minuti. Omjer mase tkiva i volumena pufera iznosio je 1:3. Svi uzorci homogenizirani su homogenizatorom Ultra-Turrax T25 Basic (IKA, Njemačka).

Homogenati su centrifugirani 30 minuta na 10000 g na temperaturi 4 °C u centrifugi Sigma 3 K 15 (Sigma, Njemačka). U supernatantu određene su: aktivnosti glutation peroksidaze, paraoksonaze 1, superoksid dismutase, koncentracija neenzimskih antioksidacijskih molekula i koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita.

### 3.3 Analiza uzoraka

#### 3.3.1. Aktivnosti enzima glutation peroksidaze (GSH-Px)

Aktivnost enzima glutation peroksidaze određena je gotovim kompletom RANSEL tvrtke Randox (Irska) na biokemijskom analizatoru Architect c4000 (Abbott, USA). Enzim GSH-Px katalizira oksidaciju glutationa (GSH) s kumena hidroperoksidom. Uz prisustvo glutation reduktaze i NADPH oksidirani oblik glutationa (GSSG) se prevodi u reducirani oblik uz oksidaciju NADPH. Smanjenje absorbancije mjeri se pri 340 nm. Aktivnost GSH-Px izražena je po gramu proteina i po gramu tkiva.

#### 3.3.2. Aktivnost paraoksonaze 1

Aktivnost paraoksonaze 1 (PON1) određena je na biokemijskom analizatoru Architect c4000 (Abbott, USA) metodom TVARIJONAVICIUTE i sur. (2012) s p-nitrofenil acetatom (Sigma-Aldrich) kao supstratom. Aktivnost PON1 izražena je po gramu proteina i po gramu tkiva.

#### 3.3.3. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost ukupne superoksid dismutaze u tkivima određena je gotovim kompletom RANSOD tvrtke Randox (Irska) na biokemijskom analizatoru Architect c4000 (Abbott, USA). Metoda se temelji na stvaranju superoksidnih radikala iz ksantina pomoću ksantin oksidaze koji reagiraju s 2-(4-jodofenil)3-(4-nitrofenil)5-feniltetrazol kloridom i tvore formazan crveno obojenje. Aktivnost SOD se mjeri kao stupanj inhibicije ove reakcije. Aktivnost SOD izražena je po gramu proteina i po gramu tkiva.

### 3.3.4. Biološki antioksidacijski potencijal (*engl. biological antioxidant potential, BAP*)

Biološki antioksidacijski potencijal mjeri antioksidacijski kapacitet neenzimskih molekula kao što su bilirubin, mokraćna kiselina te vitamin E i C. Koncentracija antioksidansa u tkivima izmjerena je na biokemijskom analizatoru Architect c4000 (Abbott, USA) korištenjem gotovog kompleta (Diacron International, Italija).

U BAP testu uzorak koji se testira dodaje se u obojenu otopinu koja sadrži feri ion ( $\text{FeCl}_3$ , željezov klorid) s posebnim homogenim supstratom (tiocijanat). Nakon kratke inkubacije (5 min) otopina će se odbojati, a intenzitet tih promjena biti će razmjeran sposobnosti antioksidansa u uzorku da reduciraju feri ione. Koncentracija BAP izražena je po gramu proteina i po gramu tkiva.

### 3.3.5. Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita

Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita u tkivima određena je d-ROM (*engl. reactive oxygen metabolites*) gotovim kompletom (Diacron International, Italija) na biokemijskom analizatoru Architect c4000 (Abbott, USA).

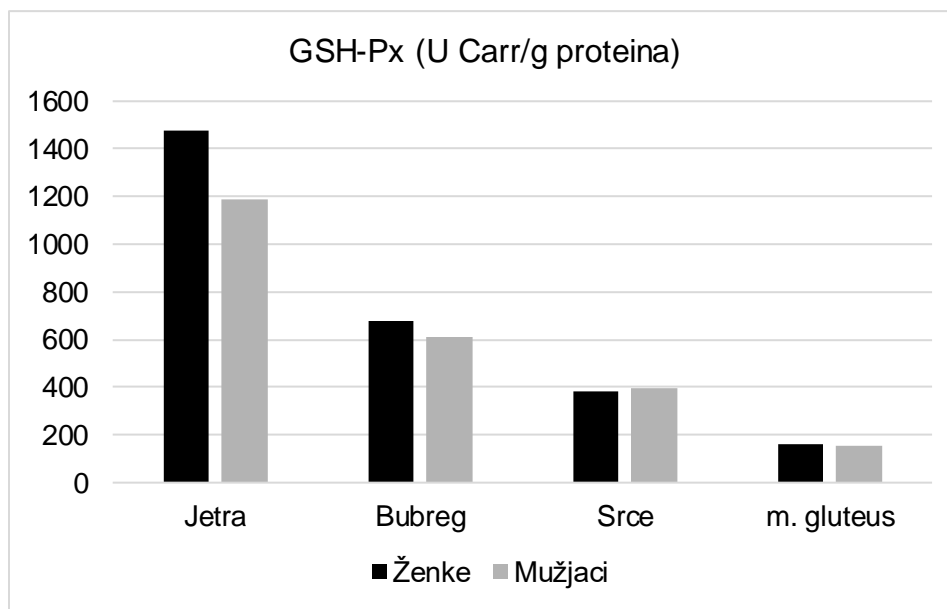
U d-ROM testu, reaktivni kisikovi metaboliti (primarno hidroperoksidi ROOH) u prisustvu željeza, generiraju alkoksilne ( $\text{Ro}^*$ ) i peroksilne ( $\text{R-OO}^*$ ) radikale Fentonovom reakcijom. Radikali reagiraju sa supstituiranim aromatskim aminom ( $\text{A-NH}_2$  u mješavini kromogena), oksidiraju amine te dolazi do promjene boje u ružičastu ( $[\text{A-NH}_2^*]^+$ ). Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita izražena je po gramu proteina i po gramu tkiva.

## 3.4. Statistička analiza rezultata

Životinje su grupirane prema spolu. Rezultati su obrađeni u statističkom programu STATISTICA verzija 12 (StatSoft, Tulsa, SAD) i prikazani kao srednje vrijednost. Provjera normalnosti distribucije rađena je pomoću Kolmogorov-Smirnov te Shapiro-Wilksovog W testa. Značajnost razlika je provjerena Studentovim t-testom ukoliko se radilo o normalnoj razdiobi te Mann-Whitney U testom ako je razdioba bila različita od Gaussove. Međusobna povezanost promatranih pokazatelja istražena je linearnom i Spearmanovom korelacijom uz korištenje već navedenog statističkog programa. Razlike se smatraju statistički značajnima ako je  $p < 0,05$ .

## REZULTATI

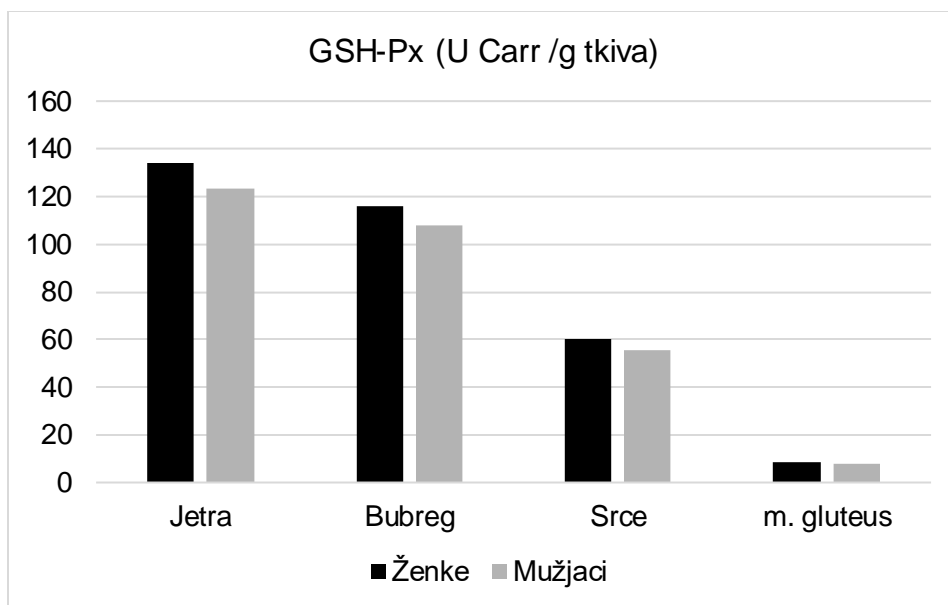
### 4.1. Aktivnost glutation peroksidaze



Slika 1. Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U Carr/g proteina).

Iz slike 1 koja prikazuje aktivnost GSH-Px vidljivo je da je najveća aktivnost u tkivu jetara (1474 U/g proteina za ženke, 1187 U Carr/g proteina za mužjake), a najmanja u tkivu *m. gluteus* (1601 U/g proteina za ženke, 157 U Carr/g proteina za mužjake).

Aktivnosti GSH-Px u jetri i bubrezima su bile veće u ženki nego u mužjaka sivog puha dok su u srcu i *m. gluteus* vrijednosti približno jednake. Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike ( $p > 0,05$ ).

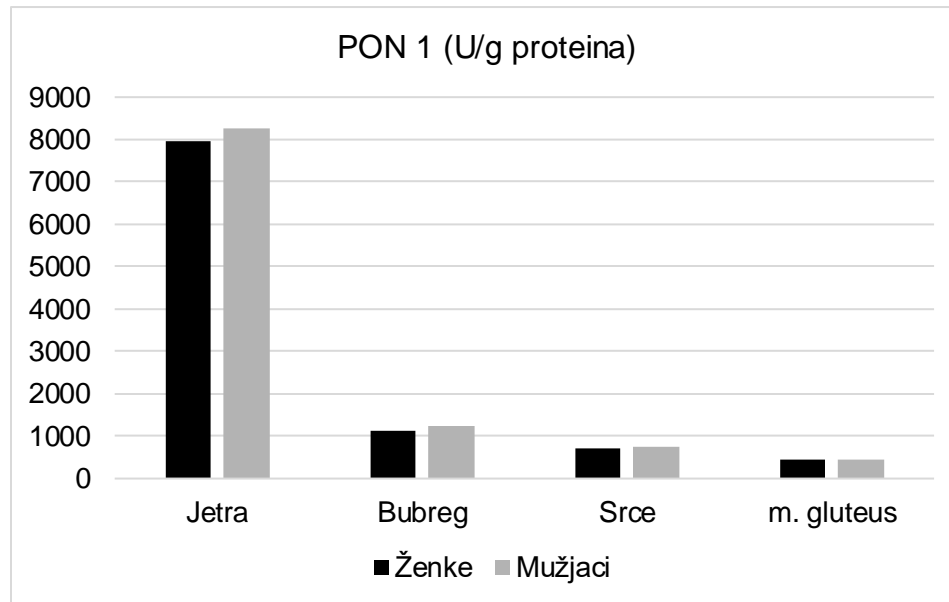


Slika 2. Aktivnost glutation peroksidaze (GSH-Px) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U Carr/g tkiva).

Iz slike 2 koja prikazuje aktivnost GSH-Px izraženu po gramu proteina, vidljivo je da je najveća aktivnost u tkivu jetara (134 U Carr/g tkiva za ženke, 123 U Carr /g tkiva za mužjake), a najmanja u tkivu *m. gluteus* (9 U Carr /g tkiva za ženke , 8 U Carr /g tkiva za mužjake).

Aktivnosti GSH-Px u jetri, bubrezima i srcu su bile veće u ženki nego u mužjaka sivog puha, dok su u *m. gluteus* vrijednosti približno jednake. Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike ( $p > 0,05$ ).

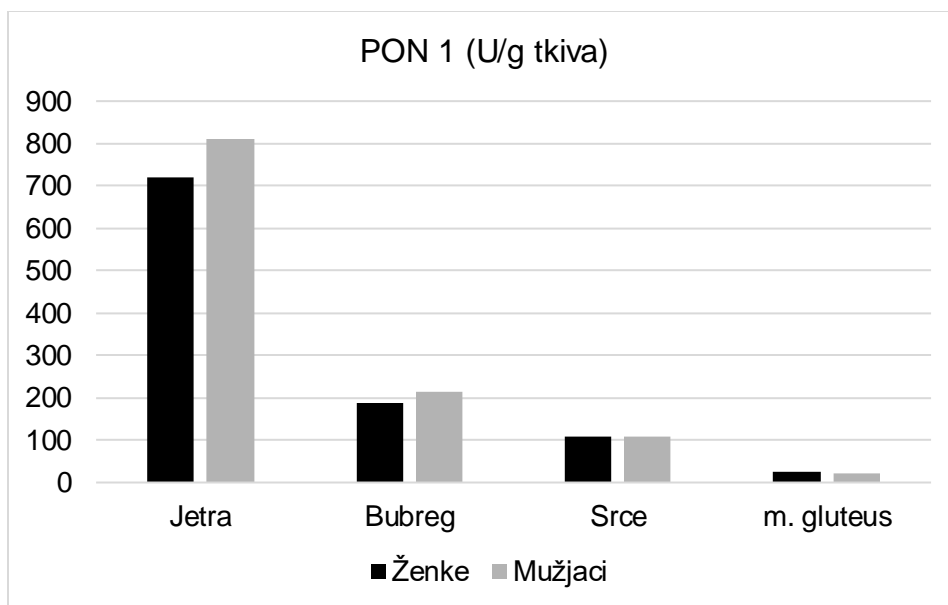
## 4.2. Aktivnost paraoksonaze 1



Slika 3. Aktivnost paraoksonaze 1 (PON1) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g proteina).

Slika 3 koja prikazuje aktivnost PON1 izraženu po gramu proteina. U istraživanju utvrđena je najveća aktivnost PON1 u tkivu jetara (8255 U/g proteina za mužjake, 7959 U/g proteina za ženke), a najmanja u tkivu *m. gluteus* (457 U/g proteina za mužjake, 444 U/g proteina za ženke).

Aktivnosti PON1 u jetrima, bubrežima, srcu i *m. gluteus* bile su nešto veće u mužjaka u odnosu na ženke sivog puha no nisu utvrđene značajne razlike s obzirom na spol ( $p > 0,05$ ).

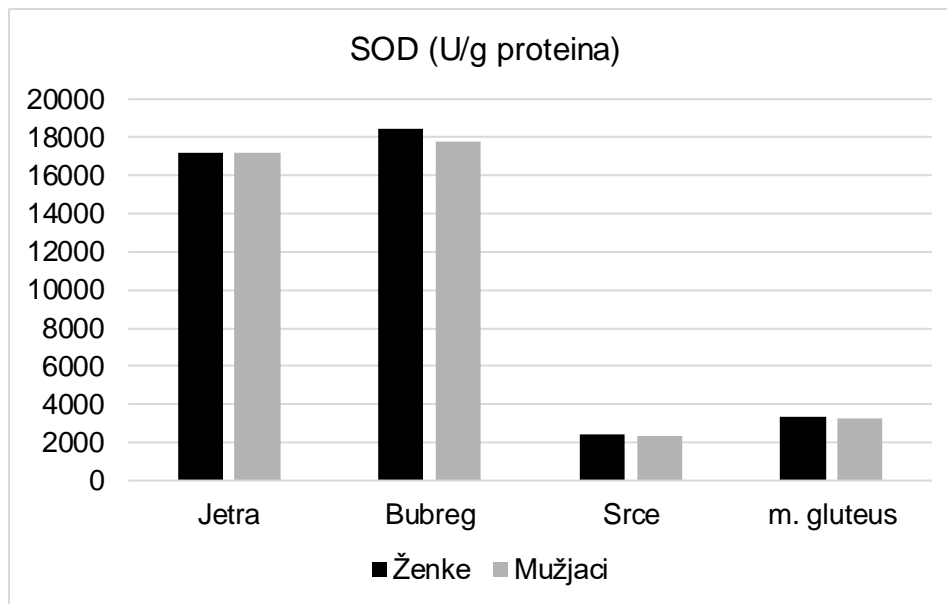


Slika 4. Aktivnost paraoksonaze 1 (PON1) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g tkiva).

Slika 4 pokazuje najveću aktivnost PON1 izraženu po gramu tkiva u tkivu jetara (811 U/g tkiva za mužjake, 721 U/g tkiva za ženke), a najmanja u tkivu *m. gluteus* (23 U/g tkiva za mužjake, 34 U/g proteina za ženke).

Aktivnosti PON1 u jetrima bila je veća u mužjaka nego u ženki sivog puha dok su u bubrezima, srcu i *m. gluteus* vrijednosti približno jednake. Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike ( $p > 0,05$ ).

### 4.3. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze

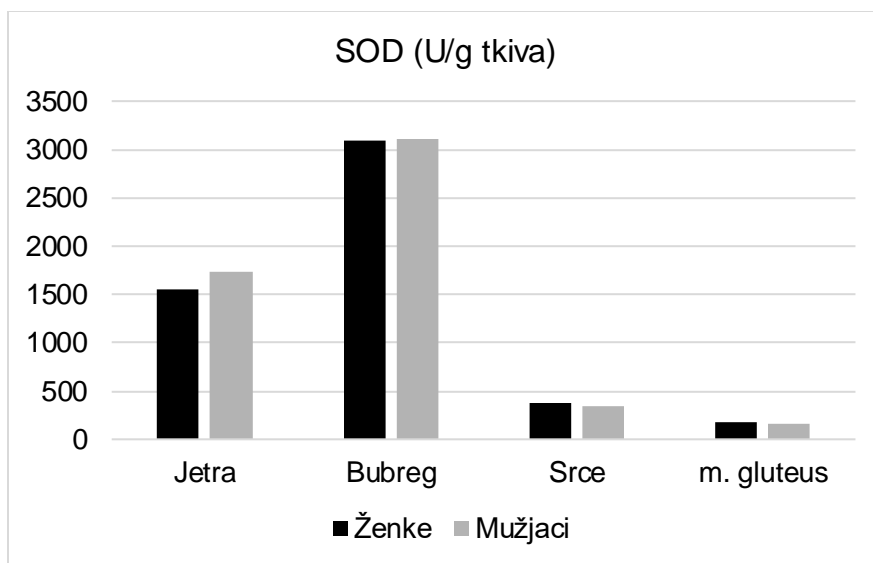


Slika 5. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g proteina).

Iz slike 5 vidljivo je kako je aktivnost SOD najveća u tkivu bubrega (18472 U/g proteina za ženke, 17770 U/g proteina za mužjake), a najmanja u srčanom tkivu (2404 U/g proteina za ženke, 2372 U/g proteina za mužjake).

Aktivnosti SOD u jetrima, bubrezima, srcu i m. *gluteus* su bile na sličnim vrijednostima kod oba spola sivog puha. Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike ( $p > 0,05$ ).



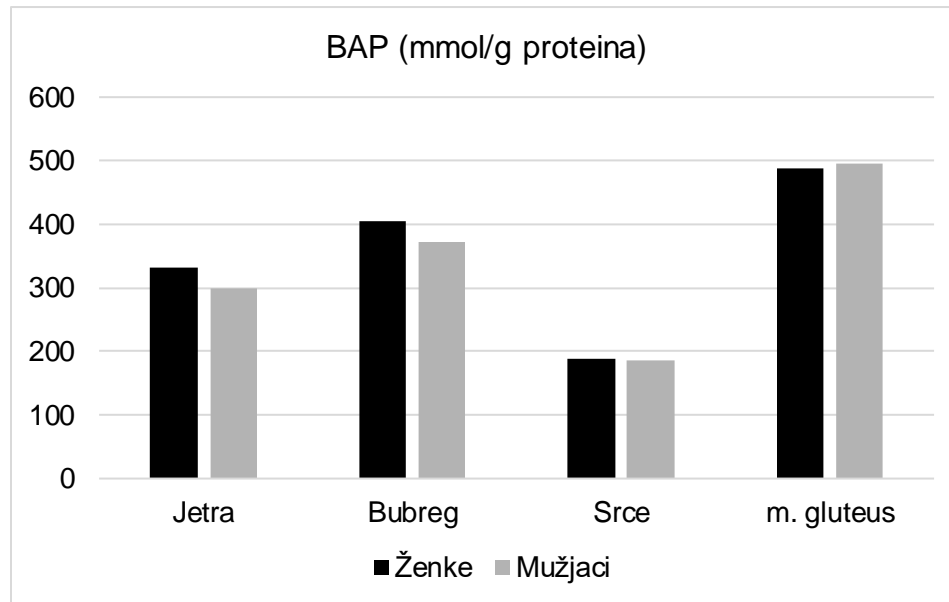


Slika 6. Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g tkiva).

Slika 6 prikazuje aktivnost SOD izraženu po gramu tkiva. Najveća prosječna aktivnost izračunata je u tkivu bubrega (3092 U/g tkiva za ženke, 3102 U/g tkiva za mužjake), a najmanja u tkivu *m. gluteus* (183 U/g tkiva za ženke, 165 U/g tkiva za mužjake).

Aktivnosti SOD u jetrima, bubrezima, srcu i *m. gluteus* bile su približno jednake kod mužjaka i ženki sivog puha. Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike ( $p > 0,05$ ).

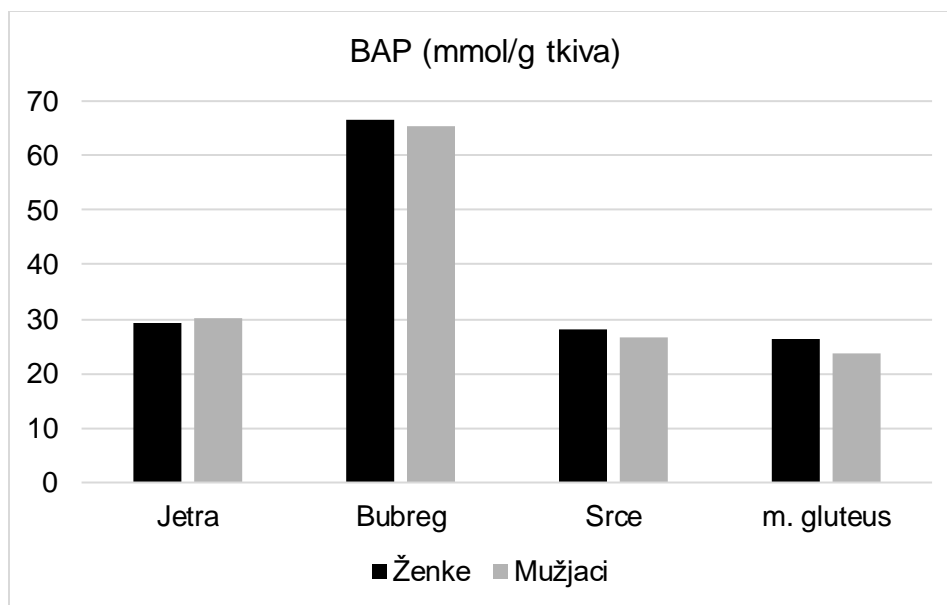
#### 4.4. Biološki antioksidacijski potencijal



Slika 7. Koncentracija biološkog antioksidacijskog potencijala (BAP) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu ( $\mu\text{mol/g}$  proteina).

Iz slike 7 koja prikazuje koncentraciju BAP izraženu po gramu proteina vidljivo je da je najveća prosječna koncentracija u tkivu *m. gluteus* (487,59  $\mu\text{mol/g}$  proteina za ženke, 496,41  $\mu\text{mol/g}$  proteina za mužjake), a najmanja u tkivu srca (189,34  $\mu\text{mol/g}$  proteina za ženke, 185,77  $\mu\text{mol/g}$  proteina za mužjake).

Koncentracije BAP u jetrima, bubrezima, srcu i *m. gluteus* bile su približno jednake među mužjacima i ženkama sivog puha. Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike ( $p > 0,05$ ).

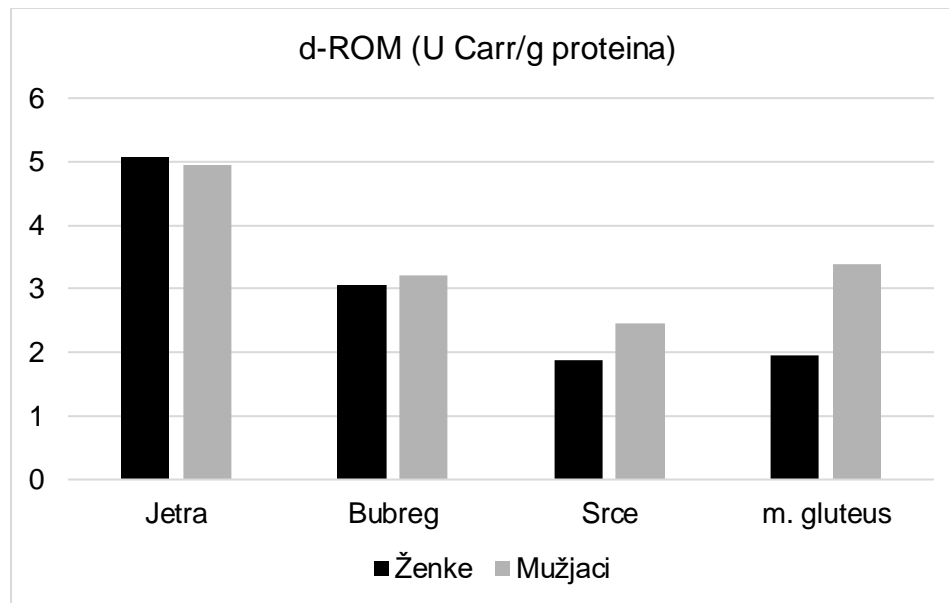


Slika 8. Koncentracija biološkog antioksidacijskog potencijala (BAP) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu ( $\mu\text{mol/g}$  tkiva).

Slika 8 prikazuje koncentraciju BAP izraženu po gramu tkiva. Iz slike je vidljivo da je najveća koncentracija u tkivu bubrega ( $66,49 \mu\text{mol/g}$  tkiva za ženke,  $65,48 \mu\text{mol/g}$  tkiva za mužjake), a najmanja u tkivu *m. gluteus* ( $26,36 \mu\text{mol/g}$  tkiva za ženke,  $23,63 \mu\text{mol/g}$  tkiva za mužjake).

Koncentracija BAP u jetrima, bubrežima, srcu i *m. gluteus* bile su približno jednake kod mužjaka i ženki sivog puha. Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike ( $p > 0,05$ ).

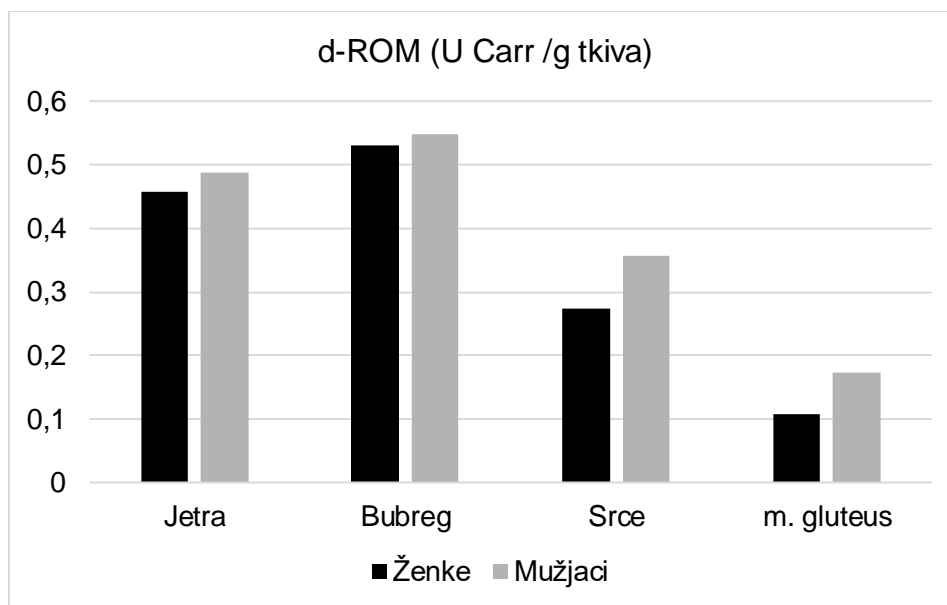
#### 4.5. Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita



Slika 9. Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita (d-ROM) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g proteina).

Iz slike 9 koja prikazuje koncentraciju d-ROM izraženu po gramu proteina, vidljivo je da je najveća koncentracija u tkivu jetara (5,06 U Carr/g proteina za ženke, 4,95 U Carr/g proteina za mužjake), a najmanja u tkivu srca (1,87 U Carr/g proteina za ženke, 2,46 U Carr/g proteina za mužjake).

Koncentracija d-ROM u *m. gluteus* i srcu bila je značajno veća u mužjaka nego u ženki sivog puha ( $p < 0,05$ ) dok su aktivnosti u jetri i bubrezima bile približno jednake među spolovima.



Slika 10. Koncentracija reaktivnih kisikovih metabolita (d-ROM) u jetrenom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu (U/g tkiva).

Iz slike 10 koja prikazuje aktivnost d-ROM vidljivo je da je najveća aktivnost u tkivu bubrega (0,53 U/g tkiva za ženke, 0,49 U/g tkiva za mužjake), a najmanja u tkivu *m. gluteus* (0,11 U/g tkiva za ženke, 0,17 U/g tkiva za mužjake).

Aktivnosti d-ROM u srčanom mišiću i *m. gluteus* značajno su veće u mužjaka nego ženki ( $p < 0,05$ ) dok su aktivnosti d-ROM u jetrima i bubrezima bile približno jednake kod ženki i mužjaka sivog puha.

#### 4.6. Korelacija pokazatelja antioksidacijskog sustava i reaktivnih metabolita kisika

U tkivu jetre utvrđena je značajna pozitivna korelacija PON1 i BAP (0,459;  $p < 0,05$ ), PON1 i SOD (0,391;  $p < 0,05$ ), BAP i SOD (0,863;  $p < 0,05$ ), a negativna je utvrđena kod BAP i ROM (-0,537;  $p < 0,05$ ) te ROM i SOD (-0,441;  $p < 0,05$ ).

U tkivu bubrega utvrđena je značajna pozitivna korelacija PON1 i BAP (0,406;  $p < 0,05$ ), GSH-Px i SOD (0,416;  $p < 0,05$ ), SOD i BAP (0,711;  $p < 0,05$ ), dok je negativna korelacija utvrđena kod SOD i ROM (-0,421;  $p < 0,05$ ) i BAP i ROM (-0,590;  $p < 0,05$ ).

U tkivu srca utvrđena je značajna pozitivna korelacija PON1 i GSH-Px (0,648;  $p < 0,05$ ), PON1 i SOD (0,797;  $p < 0,05$ ), PON1 i BAP (0,769;  $p < 0,05$ ), GSH-Px i SOD (0,725;  $p < 0,05$ ), GSH-Px i BAP (0,635;  $p < 0,05$ ), SOD i BAP (0,857;  $p < 0,05$ ).

U tkivu *m. gluteusa* zabilježena je značajna pozitivna korelacija PON1 i SOD (0,503;  $p < 0,05$ ), PON1 i BAP (0,398;  $p < 0,05$ ) i SOD i BAP (0,771;  $p < 0,05$ ), dok je negativna korelacija utvrđena kod ROM i SOD (0,474;  $p < 0,05$ ).

## 5. RASPRAVA

U radu je istražena oksidacijska stabilnost u tkivima jetre, bubrega, srca i *m. gluteus*. Najveće aktivnosti GSH-Px i PON1 i SOD utvrđene su u jetri i bubrezima dok je najmanja aktivnost zabilježena u tkivu srca i *m. gluteus* sivog puha. Zabilježena je najveća koncentracija BAP u tkivu *m. gluteus* dok je najmanja koncentracija utvrđena u srčanom tkivu sivog puha. Najveća koncentracija d-ROM utvrđena je u tkivu jetara, a najmanja u tkivu srca sivog puha.

Oksidacijska svojstva istraživanih tkiva imaju različit mehanizam nošenja s oksidacijskim stresom i slobodnim radikalima pa samim time i aktivnost GSH-Px varira od tkiva do tkiva. Glutation peroksidaza najveću aktivnost ima u tkivu jetre sivog puha što odgovara rezultatima koje su dobili PAGE i sur. (2009) kod vjeverice *Spermophilus tridecemlineatus* kao i BUZADŽIĆ i sur. (1990) kod vjeverice *Citellus citellus*. Na drugom mjestu po aktivnosti GSH-Px u analiziranim tkivima nalazi se bubreg, na trećem srce dok je najmanja aktivnost GSH-Px utvrđena u *m. gluteus* sivog puha. TAPPEL i sur. (1982) u štakora nalaze GSH-Px distribuciju u organima sljedećim redom jetara-srce-bubreg-mišić.

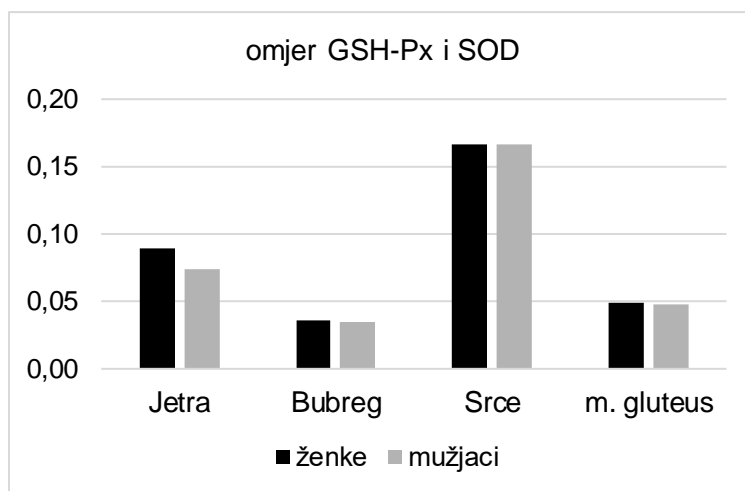
Kako zaključuju TAPPEL i sur. (1982) treba biti oprezan u tumačenju rezultata zbog nedostatka kontrole prehrane kod divljih životinja kao i okolišnih čimbenika koji mogu imati utjecaj na aktivnost GSH-Px.

Superoksid dismutaza u tkivima se može naći kao tri izoenzima: bakar-cink-SOD, manganska-SOD i izvanstanična SOD. Bakar -cinkova SOD je zastupljena u većini tkiva s oko 90% i nalazi se u citoplazmi. Manganska-SOD nalazi se u mitohondrijima i najveću aktivnost ima u srcu (PIRŠLJIN, 2006).

Rezultati u ovom istraživanju su pokazali kako je najveća aktivnost ukupnog SOD-a utvrđena u tkivu bubrega i nešto manja u tkivu jetara. Slične rezultate dobio je MARKLUND (1984) na miševima. U tkivima jetre i bubrega kunića i štakora MARKLUND (1984) i NANDI i CHATTERJEE (1987) na štakorima utvrdili su veće vrijednosti u jetri u odnosu na bubrege.

Najveća aktivnost jetre u ovom istraživanju iznosi 1715 U/gramu tkiva kod mužjaka sivog puha. Slične vrijednosti ( $1700 \pm 100$  U/g tkiva) dobili su NANDI i CHATTERJEE (1987) kod mužjaka štakora istom metodom mjerenja. Vrijednosti koje su utvrđene u bubregu u ovom istraživanju su četiri puta veće od onih koje su dobili NANDI i CHATTERJEE (1987).

BUZADŽIĆ i sur. (1990) utvrdili su kako je u hibernatora *Citellus citellus* u zimi u jetri veća aktivnost SOD nego u proljeće. Životinje u ovom istraživanju su odstrjeljene neposredno pred hibernaciju.



Slika 11. Omjer aktivnosti glutacion peroksidaze i superoksid dismutaze u u jetrenom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu.

Enzim SOD i GSH-Px su funkcionalno povezani. Superoksidni radikal koji nastaje u najvećoj koncentraciji u respiratornom lancu u mitohondrijima uklanja SOD pri čemu nastaje vodikov peroksid. Uklanjanje vodikovog peroksida katalizira GSH-PX. Stoga je u radu izračunat omjer GSH-Px i SOD-a (Slika 11). Najveći omjer utvrđen je u srcu sivog puha. Vodikov peroksid uklanja i enzim katalaza u organizmu pa razlike u navedenom omjeru mogu se tumačiti razlikama u aktivnosti GSH-Px i katalaze. Utvrđena je i korelacija GSH-Px i SOD u tkivu bubrega ( $r=0,416$ ;  $p<0,05$ ) i srca ( $r=0,725$ ;  $p<0,05$ ).

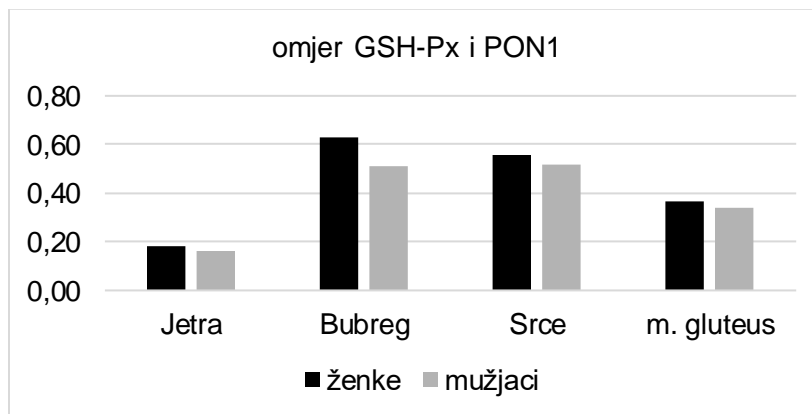
Mjereći aktivnost paroksonaze može se utvrditi tri izoenzima. Izoenzimi PON1 i PON3 nalaze se vezani na HDL u plazmi, a uglavnom ih sintetizira jetra (GETZ i REARDON, 2004). U radu je određena aktivnost PON1 metodom TVARIJONAVICIUTE i sur. (2012) s p-nitrofenil acetatom kao supstratom. Sva tri proteina hidroliziraju organofosfate i djeluju kao peroksidaza, laktonaza i arilesteraza. GABROWNY i sur. (2007) su utvrdili porast aktivnosti PON1 nakon aplikacije organofosfatnog insekticida klorpirifosa u visokoj koncentraciji albino glodavcima.



Najveća aktivnost PON1 zabilježena je u tkivu jetara te je iznosila više od 8000 U/g proteina. Ovako visoka aktivnost u tkivu jetara je razumljiva jer se ovaj enzim primarno sintetizira u jetri (FURLONG i sur., 2016). U istraživanju je ODA i sur. (2001) na miševima samo u jetri utvrdio glasničku RNA za PON1. Visoka aktivnost PON1 vezane na HDL sprječava lipidnu peroksidaciju HDL te je građa i funkcija HDL očuvana (ODA i sur., 2001).

Aktivnost PON1 u plazmi smanjuje rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti (SHIH i sur., 1998, VAN LENTEN i sur., 2001). u ovom istraživanju aktivnost PON1 u srčanom mišiću je iznosila 702 U/g proteina kod ženki i 750 U/g proteina kod mužjaka. Uloga u prevenciji kardiovaskularnih bolesti temelji se antioksidacijskim svojstvima uklanjanja oksidiranog LDL (VAN LENTEN i sur., 2001).

U ovom istraživanju utvrđena je u srčanom tkivu korelacija PON1 i GSH-Px ( $r=0,648$ ;  $p<0,05$ ) što ukazuje na učinkovito uklanjanje lipidnih peroksida u ovom tkivu. Iz omjera GSH-Px i PON1 vidljivo je da je uklanjanje lipidnih peroksida u bubrežnom, srčanom tkivu i mišićnom tkivu pod utjecajem PON1 i GSH-Pxa u jetrenom tkivu prevladava PON1.



Slika 12. Omjer aktivnosti glutacion peroksidaze i paraoksonaze 1 u jetrenom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu.

U istraživanju koncentracija neenzimskih antioksidacijskih molekula utvrđena je pomoću biološkog antioksidacijskog potencijala koji mjeri koncentraciju mokraćne kiseline, bilirubina,

vitamina C i E (KIM i sur., 2014). U ovom istraživanju najveća koncentracija BAP utvrđena je u tkivu bubrega i *m.gluteus* sivog puha. Velike koncentracije u *m. gluteus* možemo objasniti relativno niskom aktivnošću antioksidativnih enzima. Sličnom metodom EVELSON i sur. (2001) utvrdili su veću koncentraciju neenzimskih antioksidansa u jetri i bubrezima negoli u srcu. Ova razlika je vjerojatno uzrokovana koncentracijom glutationa kojeg je mjerio EVELSON i sur. (2001) dok ga metodom upotrijebljenom u ovom istraživanju ne mjerimo. Vitamin E važan je antioksidans, a koncentraciju mjeri metoda BAP-a. Vitamin E ima zaštitni učinak od trovanja natrijevim glutamatom (EID i sur., 2019).

U ovom istraživanju utvrđena je korelacija PON1 i BAP u svim tkivima (jetra  $r=0,459$ , bubreg  $r=0,406$ , srce  $r=0,769$  i *m. gluteus*  $r=0,398$ ;  $p<0,05$ ) kao i SOD i BAP (jetra  $r=0,863$ , bubreg  $r=0,711$ , srce  $r=0,857$  i *m. gluteus*  $r=0,771$ ;  $p<0,05$ ), a BAP i ROM u jetri ( $r=-0,537$ ;  $p<0,05$ ) u bubregu ( $r=0,590$ ,  $p<0,05$ ). Pozitivna korelacija utvrđena između aktivnosti enzima i BAP-a ukazuje na sinergijsko djelovanje neenzimskih i enzimskih molekula u antioksidacijskoj obrani, dok negativna korelacija ROM-a i BAP-a pokazuje učinkovito uklanjanje reaktivnih metabolita kisika pomoću BAP-a.

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazali su kako je najveća aktivnost ROM u tkivu jetre sivog puha. WEI i sur. (2018) na tkivima vjeverice *Spermophilus dauricus* najintenzivniju oksidaciju utvrdili su u srcu.

U tkivu srca i mišića u ovom istraživanju utvrđena je statistički značajno veća koncentracija ROM-a u mužjaka sivog puha što možemo objasniti intenzivnijim oksidacijskim procesima u srcu mužjaka zbog više frekvencije srčanog rada i veće mišićne aktivnosti u *m. gluteus* u odnosu na ženke sivog puha.

Puhovi su prezimari te prije hibernacije povećavaju unos hrane u svrhu nakupljanja potkožnih i abdominalnih rezerva masnog tkiva. Potkožna mast ima mehaničku i izolacijsku ulogu štiteći tijelo od hladnoće te u manjoj mjeri služi kao izvor energije (WILZ i HELDMAIER, 2000).

Masa puhova, vrlo je slična u proljeće i jesen (PILASTRO, 1994, GRUBEŠIĆ i sur., 2004) jer puh svoje životne funkcije u hibernaciji svede na minimum. Sivi puh u hibernaciji vrlo malo troši akumuliranu potkožnu mast zbog usporenih vitalnih funkcija (RUF i sur., 2006). Potkožna mast služi kao izolator krvi i srca, kako se ne bi smrzli od hladnoće. U proljeće nakon buđenja iz zimskog sna potkožna masti služiti će kao izvor energije do pronalaska dovoljno kalorične hrane (WILZ i sur., 2000). U sezoni parenja mužjaci potroše rezervne masti (BIEBER, 1998).

U našem istraživanju prosječna masa ženki s repom iznosila je  $113,4 \pm 22,9$  g, a masa mužjaka s repom bila  $126,2 \pm 30,2$  g. Prema podacima iz literature o masi puhova, smatra se da je riječ o mlađim jedinkama koje su zbog niže tjelesne mase dulje aktivne u jesen prije hibernacije i vjerojatno nisu spolno zrele.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata može se zaključiti:

1. oksidativni i antioksidativni procesi najintenzivniji su u jetri i bubrezima što odgovara intenzitetu metaboličkih procesa ovih tkiva,
2. najveća koncentracija BAP u *m. gluteus* uz istovremeno najmanju aktivnost antioksidativnih enzima ukazuje na kompenzatorni učinak neenzimskih antioksidacijskih molekula u mišićnom tkivu,
3. intenzivniji oksidacijski procesi u srcu mužjaka potvrđuju da mužjaci imaju višu frekvenciju srčanog rada, a u *m. gluteus* ukazuju na veću mišićnu aktivnost u odnosu na ženke sivog puha i
4. izostanak većeg broja značajnih razlika može se objasniti time da su jedinke u ovom istraživanju odstrjeljene u rujnu-listopadu, dakle u vrijeme kada su najveći primjerci ove vrste već u pušinama, tako da se radi o mlađim, lakšim jedinkama koje vjerojatno nisu spolno zrele.

## 7. LITERATURA

1. ANDRĚA M. (1986): Dormice (Gliridae) in Czechoslovakia. Part I.: *Glis glis*, *Eliomys quercinus* (Rodentia: Mammalia). Folia Musei Rerum Naturalium Bohemiae Occidentalis. Plzeň Zoologica. 24:3-47.
2. ATAKISI, O., H. ORAL, E. ATAKISI, O. MERHAN, S. METIN PANCARCI, A. OZCAN, S. MARASLI, B. POLAT, A. COLAK, S. KAYA (2010): Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. Res. Vet. Sci. 89, 10-13.
3. BARRETT-HAMILTON, G. E. H. (1898): Notes on the European dormice of the genera *Muscardinus* and *Glis*. Ann. Mag. nat. Hist. 72:423-426.
4. BARRETT-HAMILTON, G. E. H. (1899): Note on the Sicilian dormice of the genera *Eliomys* and *Glis*. Ann. Mag. nat. Hist. 73:226-228.
5. BECKMAN, K. B., B. N. AMES (1998): The free radical theory of aging matures. Physiol. Rev., 2, 547-581.
6. BIEBER, C. (1998): Population dynamics, sexual activity, and reproduction failure in the fat dormouse (*Myoxus glis*). J. Zool. 244: 223-229.
7. BOŠNJAKOVIĆ A. (2017): Antioxidants and their contribution to the health and beauty of the skin. Preddiplomski rad. Prehrambeno - tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište u Osijeku - Odjel za kemiju.
8. BOUWSTRA, R. J., M. NIELEN, J. R. NEWBOLD, E. H. J. M. JANSEN, H. F. JELINEK, T. VAN WERVEN (2010): Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part II: Oxidative stress following vitamin E supplementation may increase clinical mastitis incidence postpartum. J. Dairy. Sci. 93, 5696-5706.
9. BURGESS, M., P. MORRIS, P. BRIGHT (2003): Population dynamics of the edible dormouse (*Glis glis*) in England. Acta Zoo. Acad. Sci. Hungaricae. 49: 27-31.
10. CABRERA, A. (1908): On Muscardinidae from the Iberian Peninsula. Ann. Mag. nat. Hist, Series 8 1:188-194.

11. CASTEX, C., A. TAHRI, R. HOO-PARIS, B. C. J. SUTTER (1984): Insulin secretion in the hibernating edible dormouse (*Glis glis*): in vivo and vitro studies. *Comp. Biochem. Physiol.* 79:179-183.
12. CELI P., M. SULLIVAN, D. EVANS (2008): The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood. *Vet. J.* 183. 1-2.
13. CELI, P. (2011): Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacol. Toxicol.* 33, 233-240.
14. CERRUTI, P. A. (1985): Prooxidant States and Tumor Promotion, *Science* 227:375– 381
15. COSTA L. G., T. B. COLE, G. P. JARVIK, C. E. FURLONG (2003): Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med* 2003; 54:371-392.
16. DAAMS, R. (1981): The dental pattern of the Dormice *Dryomys*, *Myomimus*, *Microdryomys* and *Peridyromys*. *Utrecht micropaleontological bulletins. Spec. Publ.* 3: 1-113.
17. DIMAKI, M. 1999. First record of the edible dormouse *Glis glis* (Linnaeus, 1766) from the Greek island of Andros. *ANN MUS GOULANDRIS*,10:181-183.
18. DRAGANOV D. I., B. N. LA DU (2004): Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369:78-88.
19. EID R. A., M. AL-SHRAIM , M. S. ZAKI, S. S. KAMAR, N. S. A. LATIF, S. NEGM, B. AL-ANI, M. A. HAIDARA (2019): Vitamin E protects against monosodium glutamate-induced acute liver injury and hepatocyte ultrastructural alterations in rats. Doi: 10.1080/01913123.2019.1673860
20. EVELSON P., M. TRAVACIO, M. REPPETO, J. ESCOBAR, S. LLESUY, E. A. LISSI (2001): Evaluation of Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) of Tissue Homogenates and Their Cytosols. *Arch. Biochem. Biophys*, 388, 261-266.
21. FIETZ, J., M. PFLUG, W. SCHLUND, F. TATARUCH (2005): Influences of the feeding ecology on body mass and possible implications for reproduction in the edible dormouse (*Glis glis*). *J. Comp. Physiol.* 175: 45-55.
22. FILIPOVIĆ D. (2016): Glodavci šumskih ekosustava Republike Hrvatske uz opis zaštite. Završni rad. Sveučilište u Zagrebu. Šumarski fakultet Zagreb.

23. FORENBACHER, S. (2002): Sisavci. U: Kompendij velebitske faune I. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, str. 10-12.
24. FURLONG C. E., J. MARSILLACH, G. P. JARVIK, L. G. COSTA (2016): Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? Chem. Biol. Interact 259: 51e62
25. GABROWNY K.H., E.S.M.E. FARAG, A. A. A. SALLAM (2007): involvement of paraoxonase (pon) in oxidative stress induced by chlorpyrifos in albino rats. J. Egypt. Soc. Toxicol., Vol. 37, 71-86.
26. GAMBLE S. C., A WISEMAN, P. S. GOLDFARB (1997): Selenium-dependent glutathione peroxidase and other selenoproteins: their synthesis and biochemical roles. J. Chem. Tech. Biotechnol. 68, 123-134.
27. GIGIREY, A., AND J. M. REY. (1999): Faecal analysis of the edible dormouse (*Glis glis*) in the northwest Iberian Peninsula. Z. Säugetierkd.64:376-379.
28. GETZ G.S. i C.A. REARDON (2004): Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. Curr Opin Lipidol. 15:261-267.
29. GRUBEŠIĆ, M., K. KRAPINEC, M. GLAVAŠ, J. MARGALETIĆ, (2004): Body measurements and harvesting dynamics of the fat dor mouse (*Glis glis* L.) in the mountainous part of Croatia. Acta Zoo. Acad. Sci. Hungaricae 50 (4):271-282.
30. HILLSON S. (1990): Teeth. Cambridge manuals in archaeology. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
31. HÜRNER, H., B. KRYŠTUFEK, S. MAURIZIO, A. RIBAS, T. RUCH, R. SOMMER, V. IVASHKINA, J. R. MICHAUX (2010): Mitochondrial phylogeography of the edible dormouse (*Glis glis*) in the western Palearctic region. J. Mammal. 91:233-242.
32. IGHOIDARO O. M., O. A. AKINLOYEE (2017): First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
33. JONES-WALTERS, L. M., G. B. CORBET (1991): Genus *Glis*. U: The handbook of British mammals. Ur.: Corbet, G. B., S. Harris. 3rd ed. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, United Kingdom. str. 264-267.
34. JURCZYSZYN, M. (1995): Population density of *Myoxus glis* (L.) in some forest biotopes. Hystrix- the Italian J. Mammal. 6: 265-271.

35. KAHMANN, H. (1965): Le ioir (*Glis glis*, Linnaeus, 1776) dans les Monts Gargano, Italie (Apulie). Mamm, 29 72-94.
36. KAYSER, C. (1961): The physiology of natural hibernation. Pergamon Press, Oxford.
37. KONJEVIĆ, D., T. KEROS, H. BRKIĆ, A. SLAVICA, Z. JANICKI, J. MARGALETIĆ (2003): Some histological characteristics of the Fat Dormice incisors in the Gorski Kotar area (Croatia). Acta Zoo. Acad. Sci. Hungaricae, 49 (S1), 63-68.
38. KILK, K., O. HARMSON, R. MEITERN, U. SOOMETTS (2014): Assessment of oxidative stress in serum by d-ROMs test. DOI: 10.3109/10715762.2014.919390
39. KIM J.H., H. W. BAIK, Y. S. YOON, H. J. JOUNG, J. S. PARK, S. J. PARK, E. J. JANG, S. W. PARK, S. J. KIM, M. J. KIM, D. O. JEON, H. J. CHO, S. J. LEE, S. G. IM, S. K. JANG (2014): Measurement of antioxidant capacity using the biological antioxidant potential test and its role as a predictive marker of metabolic syndrome. Korean J Intern Med. 2014; 29:31-39.
40. KRYŠTUFEK, B., A. HUDOKLIN, D. PAVLIN (2003): Population biology of the edible dormouse *Glis glis* in a mixed montane forest in central Slovenia over three years. Acta Zoo. Acad. Sci. Hungaricae, supplement 1. 49:85-97.
41. LI H. L., D. P. LIU, C. C. LIANG (2003): Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. J Mol Med 2003; 81:766-779.
42. LYMAN, C. P., R. C. O'BRIAN (1972): Sensitivity to low temperature in hibernating rodents, Am. J. Physiol. Vol. 222, No. 4, April I 972. 864-869.
43. MACKNESS B., P. N. DURRINGTON, M. I. MACKNESS (2002): The paraoxonase gene family and coronary heart disease. Curr Opin Lipidol 2002; 13:357-362.
44. MARGALETIĆ, J., M. GRUBEŠIĆ, K. KRAPINEC, K. KAUZLARIĆ, S. KRAJTER (2006): Dinamika i struktura populacije sivoga puha (*Glis glis* L.) u šumama u Hrvatskoj u razdoblju od 2002 do 2004 godine. GŠP vol. P5 str. 377.
45. MARKLUND S. L. (1984): Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. Biochem. J. (1984) 222, 649-655.
46. MARKOV, G. (2001): Microgeographical non-metric cranial diversity of the fat dormouse (*Glis glis* L.). Trak. Univ. J. Nat. Sci., series B, 2, str. 115-119.



47. McCORD, J. M., B. B. KEELE, I. FRIDOROVICH (1971): An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1024-1027.
48. MORALES, A.E., A. PEREZ-JIMENEY, M.C. HIDALGO, E. ABELLAN, G. CARDENETE (2004): Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. Comp. Biochem. Physiol. Part C. 139, 153-161.
49. MORRIS, P. A. (1997): A review of the fat dormouse (*Glis glis*) in Britain. Nat. Croat. 6:163-176.
50. MORRIS, P. A. (2004): Dormice. Whittet Books Ltd. Suffolk, UK.
51. NANDI A., I. B. CHATTERJEE (1988): Assay of superoxide dismutase activity in animal tissues. J. Biosci., 13, 305-315.
52. ODA M. N., J. K. BIELICKI, T. T. HO, T. BERGER, E. M. RUBIN, T. M. FORTE (2002): Paraoxonase 1 Overexpression in Mice and its Effect on High-Density Lipoproteins. 10.1006/bbrc.2001.6295
53. PAGE M. M., C. W. PETERS, J. F. STAPLES, J. A. STUART (2009): Intracellular antioxidant enzymes are not globally upregulated during hibernation in the major oxidative tissues of the 13-lined ground squirrel *Spermophilus tridecemlineatus*. J. Comp. Physiol B, 170, 511-122.
54. PERIĆ, R. (2016): Značaj puhova (Por. Gliridae) u šumama Hrvatske. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.
55. PERVAN, I., T. RADOČAJ, T. TOMLJANOVIĆ, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2019): Determination of sex and morphological characteristics of fat dormouse (*Glis glis*) from the area of dalmatian hinterland. Šumarski list, 11-12, 571-576.
56. PILASTRO, A. (1994): Factors affecting body mass of young dormice (*Glis glis*) at weaning and by hibernation. J. Zool., London, 234: 13-23.
57. PIRŠLJIN, J. (2006): Utjecaj dodavanja organskoga selena u hranu na antioksidativna svojstva pojedinih tkiva i organa kod pilića nakon završetka tova i gladovanja. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
58. PRAVILNIK O LOVOSTAJU NN 67/10, [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010\\_05\\_67\\_2068.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010_05_67_2068.html), pristupljeno 28.9.2020.

59. RUF, T., J. FIETZ, W. SCHLUND, C. BIEBER (2006): High survival in poor years: life history tactics adapted to mast seeding in the edible dormouse. *Ecology*, 87, 372-381.
60. SABOČANEC, S. (2006): Učinak propolisa na oksidacijski/antioksidacijski status u CBA miša. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
61. SAYEED, I., S. PARVEZ, S.PANDEY, B. BIN-HAFEEZ, R. HAQUE, S. RAISUDDIN (2003): Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish. *Ecotoxic. Envir. Safety*, 56, 295-301.
62. SCAVARELLI, D., G. ALOISE (1995): Predation on dormice in Italy. *Hystrix- the Italian J. Mammal.*, 6, 245-255.
63. SHIBANUMA, M., T KUROKI, K. NOSE (1988): Superoxide as a signal for increase in intracellular Ph. doi.org/10.1002/jcp.1041360224
64. SHIH D. M., L. GU, Y. R. XIA, M. NAVAB, W. F. LI, S. HAMA, L. W. CASTELLANI, C. E. FURLONG, L. G. COSTA, A. M. FOGELMAN, A. J. LUSIS (1998): Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. doi: 10.1038/28406.
65. ŠIFTAR, O. (2020): Masnokiselinski sastav različitih tkiva sivog puha (*Glis glis*). Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb
66. ŠTEFAN L., T. TEPŠIĆ, T. ZAVIDIĆ, M. URUKALO, D. TOTA, R. DOMITROVIĆ (2007): Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina*, 43, 84-93.
67. TAPPEL M. E., J. CHAUDIERE, A. TAPPEL (1982): glutathione peroxidase activities of animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 945-949.
68. TRROTI, R., M. CARRATELLI, M. BARBIERI (2002): Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Med.*, 44, 37-40.
69. TVARIJONAVICIUTE, A., F. TECLES, M. CALDIN, S. TASCA, J. CERON (2012): Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 measurement in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 73, 34-41.
70. VAN LENTEN B. J., A. C. WAGNER, M. NAVAB, A. M. FOGELMAN (2001): Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and apoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J Biol Chem* 276:1923-1929.

71. VAQUERO E. C., M. EDDERKAOUI, S. J. PANDOL, I. GUKOVSKY, A. S. GUKOVSKAYA: (2004): Reactive Oxygen Species Produced by NAD(P)H Oxidase Inhibit Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 34643-34654.
72. VIETINGHOFF-RIESCH, A., FRHR V. (1960): Der Siebenschläfers (*Glis glis* L.). Monographien der Wildsäugetiere 14. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany.
73. VIOLANI C., B. ZAVA (1995): Carolus Linnaeus and the edible dormouse. *Hystrix Ital. J. Zool.* 6:109-115.
74. WEI Y., J. ZHANG, S. XU, X. PENG, X. YAN, X. LI, H. WANG, H. CHANG, Y. GAO (2018): Controllable oxidative stress and tissue specificity in major tissues during the torpor–arousal cycle in hibernating Daurian ground squirrels. *Open Biol.* 8: 180068. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.180068>
75. WILZ, M., G. HENDMAIER (2000): Comparison of hibernation, estivation and daily torpor in the edible dormouse, *Glis glis*. *J. Comp. Physiol. B*, 170,511-521.
76. ZAKON O LOVU NN 10/94, [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1994\\_02\\_10\\_172.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1994_02_10_172.html), pristupljeno 28.9.2020
77. ZAKON O LOVSTVU NN 140/05, [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005\\_11\\_140\\_2641.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_11_140_2641.html), pristupljeno 28.9.2020.
78. ZAKON O PROGLAŠAVANJU DIVLJIH SVOJTI ZAŠTIĆENIM I STROGO ZAŠTIĆENIM, NN 99/09, [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009\\_08\\_99\\_2569.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_08_99_2569.html), pristupljeno 28.9.2020
79. ZAKON O ZAŠTITI PRIRODE, NN 70/05, [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005\\_06\\_70\\_1370.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_06_70_1370.html), pristupljeno 28.9.2020

## 8. SAŽETAK

### Oksidacijska stabilnost različitih tkiva sivog puha (*Glis glis*)

Sivi puh (*Glis glis* L.) je autohtona sitna divljač iz reda glodavaca, porodice puhova. Metabolizam puhova je tijekom proljeća i ljeta vrlo intenzivan, pare se, donose na svijet mlade te se pojačano hrane kako bi se pripremili za hibernaciju. Pri fiziološkim uvjetima proizvodnja reaktivnih kisikovih spojeva i drugih molekula koje izazivaju oksidacije u organizmu te koncentracija/aktivnost antioksidativnim molekulama su u ravnoteži i ovise o intenzitetu metaboličkih procesa. Stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi aktivnost enzima glutation peroksidaze (GSH-Px), paraoksonaze 1 (PON1) i superoksid dismutaze (SOD), koncentraciju neenzimskih antioksidacijskih molekula pomoću biološkog antioksidacijskog potencijala (BAP) te koncentraciju reaktivnih kisikovih metabolita (d-ROM) u jetrinom, bubrežnom, srčanom i mišićnom tkivu ženki i mužjaka sivog puha neposredno pred hibernaciju. Istraživanje je provedeno na tkivima 33 jedinke sivoga puha, 18 ženki i 15 mužjaka. Uzorci su prikupljeni tijekom sezone legalnog odstrela (rujan - listopad 2017.). Najveće aktivnosti GSH-Px i PON1 utvrđene su u jetri dok je najmanja aktivnost zabilježena u tkivu *m. gluteus* sivog puha. U istraživanim tkivima nije utvrđena značajna razlika među spolovima ( $p > 0,05$ ). Najveća aktivnost SOD utvrđena je u tkivu bubrega, a najmanja aktivnost zabilježena je u tkivu srca sivog puha. Aktivnost SOD nije se značajno razlikovala u istraženim tkivima kod ženki i mužjaka sivog puha ( $p > 0,05$ ). Zabilježena je najveća koncentracija BAP u tkivu *m. gluteus* dok je najmanja koncentracija utvrđena u srčanom tkivu sivog puha. U istraživanim tkivima nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima kod ženki i mužjaka ( $p > 0,05$ ). Najveća koncentracija d-ROM utvrđena je u tkivu jetara, a najmanja u tkivu srca sivog puha. Koncentracija d-ROM u *m. gluteus* i srcu bila je značajno veća u mužjaka u odnosu na ženke ( $p < 0,05$ ) dok su koncentracije u jetri i bubrezima bile približno jednake. Na osnovi rezultata možemo zaključiti da su oksidativni i antioksidativni procesi najintenzivniji u jetri i bubrezima što odgovara intenzitetu metaboličkih procesa ovih tkiva. Najveća koncentracija BAP u *m. gluteus* uz istovremeno najmanju aktivnost antioksidativnih enzima ukazuje na kompenzatorni učinak neenzimskih antioksidacijskih molekula. Intenzivniji oksidacijski procesi u srcu mužjaka potvrđuju da mužjaci imaju višu frekvenciju srčanog rada a u *m. gluteus* ukazuju na

veću mišićnu aktivnost u odnosu na ženke sivog puha. Izostanak većeg broja značajnih razlika može se objasniti time da su jedinke u ovom istraživanju odstrjeljene u rujnu-listopadu, dakle u vrijeme kada su najveći primjerci ove vrste već u pušinama, radi se o mlađim, lakšim jedinkama koje vjerojatno nisu spolno zrele.

**Ključne riječi:** sivi puh, tkiva, antioksidacijske molekule, reaktivni kisikovi metaboliti

## 9. SUMMARY

### Oxidative stability of liver, kidneys, heart and muscle of the gray dormouse (*Glis glis*)

Gray dormouse (*Glis glis* L.) is an autochthonous small game from the order of rodents, family of dormice. Metabolism of the dormouse is very intense during spring and summer, they mate, give birth to their young and feed intensively to prepare for hibernation. Under physiological conditions, production of reactive oxygen species and other molecules that cause oxidation in the body and the concentration / activity of antioxidant molecules are in equilibrium and depend on the intensity of metabolic processes. Therefore, the aim of this study was to determine activity of the enzymes glutathione peroxidase (GSH-Px), paraoxonase 1 (PON1) and superoxide dismutase (SOD), concentration of non-enzymatic antioxidant molecules using biological antioxidant potential (BAP) and the concentration of reactive oxygen metabolites (d-ROM) in liver, kidney, heart, and muscle tissue of female and male gray dormice just before hibernation. The study was conducted on the tissues of 33 individuals of gray dormice, of which 18 were females and 15 males. Samples were collected during the legal hunting season (September - October 2017). The highest activities of GSH-Px and PON1 were found in the liver tissue while the lowest activity was recorded in the gluteus tissue of the gray dormouse. No significant difference was found among genders in the studied tissues ( $p > 0.05$ ). The highest SOD activity was found in kidney tissue, and the lowest activity was recorded in gray dormouse heart tissue. SOD activity did not differ significantly in the studied tissues in females and males of gray dormouse ( $p > 0.05$ ). The highest concentration of BAP was recorded in gluteus tissue, while the lowest concentration was found in gray dormouse heart tissue. No statistically significant difference was found in values in females and males in the researched tissues ( $p > 0.05$ ). The highest concentration of d-ROM was found in liver tissue, and the lowest in gray dormouse heart tissue. Concentration of d-ROM in gluteus and heart was significantly higher in males compared to females ( $p < 0.05$ ) while the concentrations in liver and kidneys were approximately equal. Based on the results, it can be concluded that oxidative and antioxidant processes are most intense in liver and kidneys, which corresponds to the intensity of metabolic processes in these tissues. The highest concentration of BAP in the gluteus muscle with the lowest activity of antioxidant enzymes indicates a

compensatory effect of non-enzymatic antioxidant molecules. More intense oxidative processes in the heart of males confirm that males have a higher heart rate and in the *m. gluteus* indicate greater muscle activity compared to females of gray dormouse. Absence of a higher number of significant differences can be explained by the fact that the individuals in this study were hunted in September-October, ie at a time when the largest specimens of this species are already in the den, they are younger, lighter in mass individuals that are probably not yet reproductively mature.

**Key words:** gray dormouse, tissues, antioxidant molecules, reactive oxygen metabolites

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 8. siječnja 1995. godine u Rijeci. Osnovnu školu Zvonka Cara završila sam u Crikvenici dok sam klasičnu gimnaziju Pazinski kolegij s pravom javnosti završila u Pazinu.

Integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2013. godine Tijekom studija sudjelovala sam u izradi 8 znanstveno-istraživačkih radova koje sam prezentirala na kongresima u razdoblju od 2015.-2019.: 8. međunarodnom kongresu „Veterinarska znanost i struka“, Zagreb, 2019.; 21. međunarodnom znanstveno-istraživačkom kongresu studenata veterinarske medicine, Istanbul, 2019.; 6. međunarodnom kongresu nutricionista, Zagreb, 2018.; 5. međunarodnom kongresu nutricionista, Zagreb, 2017.; 6. Veterinarskim danima, Opatija, 2016.; 5. Veterinarskim danima, Opatija, 2015. te rad objavljen u studentskom časopisu "Veterinar", 2017.

Dobitnica sam stipendije Grada Crikvenice za izvrsnost od 2011. do 2018. godine.

Stručnu praksu odradila sam u Veterinarskoj stanici Velika Gorica.

U akademskoj godini 2017./2018. i 2018./2019. bila sam demonstrator na zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti.

### **Popis radova:**

Šiftar, O., Loredana Pincan, Marina Prišlin, Lana Vranković, Ivančica Delaš, M. Bujanić, D. Konjević, Z. Stojević, Jasna Aladrović (2019): Composition of fatty acids in liver, kidney and subcutaneous adipose tissue in edible dormouse (*Glis glis*)., znanstveno - istraživački rad prezentiran na 8. Međunarodnom kongresu „Veterinarska znanost i struka“. Zagreb, 2019.

Pincan, Loredana, O. Šiftar, Blanka Beer Ljubić, Marina Prišlin, Ana-Marija Posavec, Lana Vranković, M. Bujanić, I. Pervan, D. Konjević, Jasna Aladrović (2019): Oxidative stability of the liver, kidneys, heart and muscle of the fat dormouse (*Glis glis*)., znanstveno - istraživački rad prezentiran na 21. međunarodnom znanstveno-istraživačkom kongresu studenata veterinarske medicine u Istanbulu 2019. godine.

Prišlin, Marina, Ana-Marija Posavec, Blanka Beer Ljubić, Loredana Pincan, O. Šiftar, Lana Vranković, Jasna Aladrović, Ivana Kiš (2019): Comparison of erythrocyte and leukocyte findings obtained by urine dipstick and standard microscopic sediment urinalysis with



different diagnoses in dogs., znanstveno - istraživački rad prezentiran na 21. međunarodnom znanstveno-istraživačkom kongresu studenata veterinarske medicine u Istanbulu 2019. godine.

Šiftar, O., Loredana Pincan, Marta Šubrek, Ana Zupčić, Marina Prišlin, Lana Vranković, Ivančica Delaš, M. Bujanić, D. Konjević, Z. Stojević, Jasna Aladrović (2018): Masnokiselinski sastav potkožnog i abdominalnog masnog tkiva sivog puha (*Glis glis*)., znanstveno - istraživački rad prezentiran na 6. međunarodnom kongresu nutricionista. Zagreb 2018. godine.

Prišlin, Marina, Loredana Pincan, O. Šiftar, Ana Shek Vugrovečki, Lada Radin, Lana Vranković, Jasna Aladrović (2017): Životne, prehrambene navike i stavovi studenata druge godine studija veterinarske medicine, znanstveno - istraživački rad objavljen u časopisu "Veterinar" u Zagrebu 2017. godine.

Pincan, Loredana, Marina Prišlin, O. Šiftar, Lana Vranković, Jasna Aladrović (2017): Eating habits and attitudes of veterinary medicine students who live at home or away from home., znanstveno - istraživački rad prezentiran na 5. Međunarodnom kongresu nutricionista u Zagrebu 2017. godine.

Zidar, Biserka, Jasna Aladrović, Loredana Pincan, O. Šiftar, Marina Prišlin, Ljiljana Bedrica (2016): Utjecaj anestetika na temperaturu, krvni tlak i frekvenciju srca mačaka podvrgnutih kastraciji, znanstveno - istraživački rad prezentirana na 6. Hrvatskom veterinarskom kongresu u Opatiji 2016. godine.

Pincan, Loredana, Marina Prišlin, O. Šiftar, Kristina Perez, Ana Shek Vugrovečki, Lada Radin, Jasna Aladrović (2015): Životne i prehrambene navike studenata druge godine studija veterinarske medicine., znanstveno - istraživački rad prezentirana na Veterinarskim danima 2015. u Opatija.