

Received: 2015.10.20
Accepted: 2016.11.18
Published: 2016.12.31

Pierwiastki śladowe jako aktywatory enzymów antyoksydacyjnych*

Trace elements as an activator of antioxidant enzymes

Marta Wołonciej, Elżbieta Milewska, Wiesława Roszkowska-Jakimiec

Zakład Analizy Instrumentalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Streszczenie

Stres oksydacyjny jest stanem zaburzonej równowagi między tworzeniem wolnych rodników, a zdolnościami przeciwutleniającymi organizmu. Powoduje liczne uszkodzenia w organizmie, m.in. peroksydację lipidów, uszkodzenia DNA oraz białek. W celu przeciwdziałania skutkom stresu oksydacyjnego, organizm wykształcił mechanizmy obronne oparte na wychwytywaniu wolnych rodników, hamowaniu ich tworzenia oraz chelatowaniu jonów metali przejściowych, katalizujących reakcje wolnorodnikowe. Pierwiastki śladowe wchodzi w skład enzymów antyoksydacyjnych należących do enzymatycznego systemu walki ze stresem. Selen w postaci selenocysteiny występuje w centrum aktywnym peroksydazy glutationowej (GPx). Główną funkcją GPx jest neutralizacja nadtlenu wodoru (H_2O_2) oraz nadtlenu organicznego (LOOH). Ponadto selen jest elementem strukturalnym licznej grupy selenobiałek występujących w organizmie, niezbędnych do jego prawidłowego funkcjonowania. Mangan, miedź oraz cynk są składnikami enzymów z grupy dysmutaz ponadtlenkowych (MnSOD, Cu/ZnSOD), które katalizują reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i tlenu. Utworzony nadtlenek wodoru jest rozkładany do wody i tlenu przez peroksydazę glutationową lub katalazę. Integralną częścią katalazy (CAT) są jony żelaza. Stężenia wybranych pierwiastków śladowych (selen, miedź, cynk, mangan i żelazo) mają znaczący wpływ na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, a tym samym na walkę ze stresem oksydacyjnym. Nawet niewielka zmiana poziomu pierwiastków śladowych w tkankach powoduje zaburzenie ich metabolizmu, czego skutkiem jest występowanie wielu chorób.

Słowa kluczowe:

reaktywne formy tlenu • stres oksydacyjny • peroksydaza glutationowa • dysmutaza ponadtlenkowa • katalaza • antyoksydanty nieenzymatyczne • pierwiastki śladowe

Summary

Oxidative stress is a state of impaired balance between the formation of free radicals and antioxidant capacity of the body. It causes many defects of the body, e.g. lipid peroxidation, DNA and protein damage. In order to prevent the effects of oxidative stress, the organism has developed defence mechanisms. These mechanisms capture and inhibit the formation of free radicals and also chelate ion metals that catalyse free radical reactions. Trace elements are components of antioxidant enzymes involved in antioxidant mechanisms. Selenium, as a selenocysteine, is a component of the active site of glutathione peroxidase (GPx). The main function of GPx is neutralization of hydrogen peroxide (H_2O_2) and organic peroxide (LOOH). Furthermore, selenium is a structural part of a large group of selenoproteins that are necessary for proper functioning of the body. Manganese, copper and zinc are a part of the group of superoxide dismutase enzymes (MnSOD, Cu/ZnSOD), which catalyse the superoxide anion

*Źródło finansowania: praca statutowa nr N/ST/MN/16/001/2210.

Keywords:	dismutation into hydrogen peroxide and oxygen. Formed hydrogen peroxide is decomposed into water and oxygen by catalase or glutathione peroxidase. An integral component of catalase (CAT) is iron ions. The concentration of these trace elements has a significant influence on the activity of antioxidant enzymes, and thus on defence against oxidative stress. Even a small change in the level of trace elements in the tissue causes a disturbance in their metabolism, leading to the occurrence of many diseases. Reactive oxygen species • oxidative stress • glutathione peroxidase • superoxide dismutase • catalase • non-enzymatic antioxidants • trace elements
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1229074
Word count:	5503
Tables:	4
Figures:	10
References:	93

Adres autorki: mgr Marta Wołoncej, Zakład Analizy Instrumentalnej, Euroregionalne Centrum Farmacji, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2D, 15-222 Białystok; tel. 85-748-56-37; e-mail: marta.swieczkowska@umb.edu.pl

Wykaz skrótów: **CAT** – katalaza; **GPx** – peroksydaza glutationowa; **GRd** – reduktaza glutationowa; **GSH** – glutation zredukowany; **GSSG** – glutation utleniony; **GST** – S-transferaza glutationu; **MnSOD (SOD2)** – mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa; **RNS** – reaktywne formy azotu (reactive nitrogen species); **ROS** – reaktywne formy tlenu; **SeIP** – selenobiałko P; **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa; **SOD3 (EC-SOD)** – zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa; **Zn/CuSOD (SOD1)** – cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa.

WSTĘP – STRES OKSYDACYJNY

Stres oksydacyjny to zaburzenie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w wyniku kumulowania nadmiernej ilości wolnych rodników [42].

Wolne rodniki atomu tlenu lub azotu z niesparowanymi elektronami są zdolne do uczestnictwa w reakcjach chemicznych [67]. Obecność niesparowanego elektronu sprawia, że cząsteczki te charakteryzują się dużą reaktywnością, gdyż dążą do sparowania elektronów przez ich przyjęcie lub oddanie [39,46]. Wolny rodnik obejmuje głównie związki tlenu ROS (reactive oxygen species) i azotu RNS (reactive species). Spośród wolnych rodników można wyróżnić: nitrogen, anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), rodnik hydroksylowy (OH^\cdot), nadtlenki ROO oraz nadtlenki lipidów LOO [39,87]. Niektóre molekuly, tj.: nadtlenek wodoru (H_2O_2), ozon (O_3), tlen singletowy (1O_2), kwas chlorowy(I) ($HOCl$), peroksyazotan(V) ($ONOO^-$) nie są wolnymi rodnikami, ale zalicza się je do oksydantów, ponieważ bardzo łatwo powodują powstawanie wolnorodnikowych reakcji w żywych organizmach [29,31,46,87].

Wolne rodniki tlenowe mogą powstawać na skutek działania czynników endogennych oraz egzogennych. Do czynników endogennych zalicza się: mitochondrialny łańcuch oddechowy, peroksyzomy, mikrosomalny łańcuch transportu elektronów, syntezę prostaglandyn, utlenia-

nie białek oddechowych lub zredukowanych form drobnocząsteczkowych składników komórkowych, reakcje z udziałem enzymów, utlenianie substancji egzogennych oraz wytwarzanie ROS z udziałem układu immunologicznego. Natomiast do czynników egzogennych należą: nieodpowiednia dieta, leki, toksyny, niskie temperatury, intensywne wysiłki fizyczne, urazy, stres czy promieniowanie elektromagnetyczne (nadfioletowe, jonizujące). Niektóre związki chemiczne: pestycydy, barwniki azowe, tetrachlorek węgla, benzopiren, a także stany zapalne organizmu (infekcje wirusowe, bakteryjne, oparzenia, obrzęki płuc i mózgu) czy też przewlekłe stany chorobowe (nowotwory, alkoholizm, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroba Alzheimera) również przyczyniają się do powstawania nadmiernych ilości ROS [31,67].

W warunkach homeostazy, reaktywne rodniki tlenowe uwalniane w ilościach bezpiecznych dla komórki odgrywają rolę mediatorów oraz regulatorów wielu procesów komórkowych [81]. ROS indukując różnicowanie się i apoptozę komórek, wpływają na syntezę, uwalnianie lub inaktywację tlenu azotu oraz pobudzają transport glukozy do komórek. Zwiększając przepuszczalność ścian naczyń włosowatych warunkują prawidłowy przebieg reakcji zapalnej. Jednym z bardziej istotnych zadań wykonywanych przez reaktywne formy tlenu jest regulacja procesów przekazywania sygnału z komórki do komórki oraz w jej obrębie [17].

Przed zbyt wysokim stężeniem wolnych rodników przed toksycznym działaniem ROS, chroni system antyoksydacyjny. Głównym zadaniem mechanizmów obronnych organizmu jest neutralizacja wolnych rodników, hamowanie wolnorodnikowych reakcji łańcuchowych oraz ochrona komórki przed ich toksycznym działaniem [87].

Nasilony lub długo utrzymujący się stres oksydacyjny jest bardzo szkodliwy dla komórek, gdyż może trwale zmienić strukturę lipidów, DNA, białek, cukrów i innych. Zmiany zaburzają funkcje biologiczne, przyczyniają do wstawienia a to jest przyczyną nieprawidłowości w metabolizmie komórkowym [49,76].

Peroksydacja lipidów

Pierwszym celem wolnych rodników staje się błona komórkowa, gdzie odbywa się proces peroksydacji lipidów błonowych, utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych lub innych lipidów, w którym powstają ich nadtlenki [66]. Mechanizm oksydacyjnego uszkodzenia błony komórkowej polega na wytworzeniu utlenionych oraz cyklicznych postaci kwasów tłuszczowych, co zwiększa płynność i przepuszczalność błony oraz uszkodzenie protein błonowych (receptorów, kanałów jonowych, enzymów) [30].

Uszkodzenie białek i DNA

Utleniające działanie ROS w stosunku do białek powoduje powstanie rodników hydroksylowych, alkilnadtlenkowych, alkilowodoronadtlenków czy rodników alkoksylowych [5,31,86]. Zmiany powodują rozerwanie łańcucha polipeptydowego i utratę aktywności funkcjonalnej enzymów, białek regulatorowych czy transporterów błonowych.

Oksydacyjnej modyfikacji ulegają także zasady azotowe, deoksyryboza, ponadto dochodzi do rozerwania wiązań fosfodiesterowych, które łączą nukleotydy [50].

Dopóki jest zachowana równowaga między szybkością wytwarzania ROS a szybkością zaniku – metabolizm komórki odbywa się prawidłowo. Jeżeli jednak zawartość przeciwutleniaczy jest niewystarczająca w organizmie zaczynają przeważać reakcje utleniania. Obrona antyoksydacyjna polega głównie na niedopuszczeniu do powstawania i oddziaływania reaktywnych rodników ze składnikami komórki, jak też na terminacji łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych [21,39].

W przeciwdziałaniu tworzenia się wolnorodnikowych uszkodzeń komórek służą mechanizmy obronne. Zapobiegają reakcjom wolnych rodników z makrocząsteczkami, spowalniają wolnorodnikowe i nierodnikowe reakcje redoks oraz naprawiają lub eliminują uszkodzone cząsteczki. Związki odpowiedzialne za wymienione mechanizmy tworzą tzw. system antyoksydacyjny. Mogą być pochodzenia zarówno endo- jak i egzogenego, a pod względem mechanizmu działania dzieli się je na enzymatyczne i nieenzymatyczne [30]. Intensyw-

ność działania systemu antyoksydacyjnego zwiększa się w sytuacji nagromadzenia się w organizmie nadmiernej ilości wolnych rodników.

Do nieenzymatycznego systemu należą m.in.: witaminy, melatonina, związki fenolowe, pierwiastki śladowe, glutation oraz ceruloplazmina [24]

Witaminy A, E i C są grupą drobnocząsteczkowych antyoksydantów. Antyoksydacyjne właściwości witaminy E (tokoferolu) polegają na eliminacji wtórnych rodników – produktów rodnikowych peroksydacji lipidów. Witamina A (retinol) pełni funkcję antyoksydanta hydrofobowego. Jej działanie przeciwutleniające polega na reagowaniu z rodnikiem nadtlenkowym i hamowaniu łańcucha reakcji wolnorodnikowych. Witamina C redukuje reaktywne formy tlenu, tj.: anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy i tlen singletowy. Jej antyoksydacyjna funkcja polega na zdolności jonu askorbinianowego do reakcji z rodnikami, której produktem jest rodnik askorbylowy (Asc^{•-}) – mało reaktywny i stabilny [28].

Antyoksydacyjne właściwości metalotioneiny polegają na zwiększaniu wydajności łańcucha oddechowego, dzięki czemu zmniejsza się wpływ elektronów i ogranicza powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego. Ponadto, oddziałuje na receptory zawarte w błonach komórkowych lub we wnętrzu komórki, dzięki czemu stymuluje enzymy antyoksydacyjne SOD, CAT oraz GPx [69].

Związki polifenolowe są substancjami naturalnymi, zawartymi m.in.: w roślinach, owocach, warzywach, czerwonym winie, herbacie. Ich zdolności antyoksydacyjne zależą od licznych grup hydroksylowych. Hamują reakcje peroksydacji lipidów przez chelatowanie aktywnych metali uczestniczących w tym procesie. Polifenole reagują bezpośrednio z wolnymi rodnikami, dzięki czemu przyczyniają się do zakończenia reakcji wolnorodnikowych [26].

Pierwiastki śladowe uczestniczą w usuwaniu wolnych rodników i skutków ich działania.

Jony cynku tworzą chelaty z grupami sulfhydryłowymi białek, przez co ochraniają je przed procesami proksydacyjnymi, wywołując zmiany przestrzenne w podjednostkach enzymatycznych. Uczestniczą w indukcji białek, mających zdolność do usuwania wolnych rodników – metalotionein. Cynk chroni błony komórkowe przed peroksydacją przez usuwanie miedzi i żelaza z błonowych miejsc ich wiązania. Ponadto może synergistycznie działać z witaminą E oraz związkami polifenolowymi [57].

Niedobór jonów miedzi w osoczu, wątrobie, erytrocytach i sercu, zwiększa stężenia dialdehydu malonowego (MDA) – produktu peroksydacji lipidów. Dochodzi wówczas do zmniejszenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

Pierwiastki śladowe tworzą linię obrony nieenzymatycznej, ale również uczestniczą w walce ze stresem oksydacyjnym przez mechanizm enzymatyczny – są składowymi enzymów antyoksydacyjnych [24].

Glutation jest tripeptydem, zbudowanym z cysteiny, glutaminy i glicyny. Jego charakterystyczną cechą jest obecność grup tiolowych, które determinują jego właściwości antyoksydacyjne – uczestniczą w usuwaniu elektrofilowych ksenobiotyków. Uczestniczy bezpośrednio w eliminacji groźnego rodnika hydroksylowego oraz tlenu singletowego. Jest zdolny do regeneracji witaminy E przez redukcję rodnika tokoferylowego. Glutation jest kofaktorem enzymów antyoksydacyjnych – peroksydazy glutationowej oraz transferazy glutationowej [60].

Ceruloplazmina jest białkiem sekwencjonującym jony miedzi oraz usuwa anionorodnik ponadtlenkowy. Ma właściwości ferrokazydazowe, dzięki czemu zmniejsza stężenie jonów żelaza (II), blokując reakcję Fentona [24].

Wolne rodniki tlenowe są bardzo nietrwałe i mogą być unieczynnione w komórce również przez enzymy antyoksydacyjne. Katalaza (CAT) rozkłada nadtlenuk wodoru do wody, blokując powstawanie groźnego rodnika hydroksylowego. Podobnie peroksydaza glutationowa (GPx) neutralizuje nadtlenuk wodoru z udziałem zredukowanej postaci glutationu. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) zajmuje się przekształcaniem anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenuku wodoru (rozkładanego później przez katalazę lub peroksydazę) (ryc.1).

SELEN

Selen nazywany jest pierwiastkiem życia, został odkryty w 1817 r. przez szwedzkiego chemika Jönsa Jacoba Berzeliusa [10]. Przełomem w zrozumieniu biochemicznej roli tego pierwiastka było odkrycie w 1973 r.

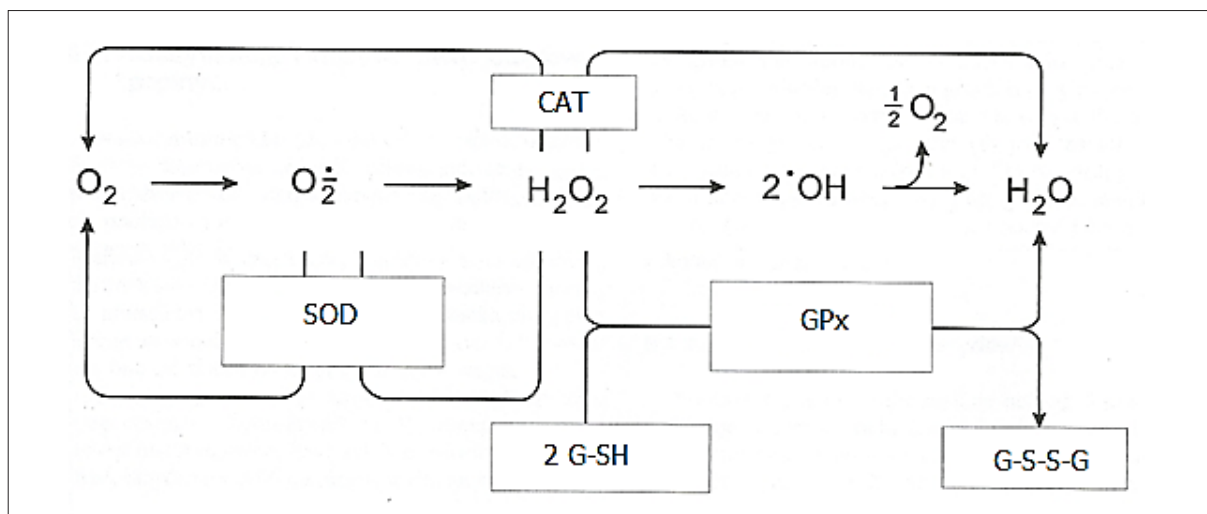
Rotrucka i Flohe [38], iż pierwiastek ten jest integralnym składnikiem centrum aktywnego peroksydazy glutationowej, enzymu katalizującego rozkład nadtlenuku wodoru oraz nadtlenuków organicznych.

W układzie okresowym Mendelejewa selen oznaczony jest symbolem Se i znajduje się w grupie 16, okresie 4 w bloku p, obok tlenu, siarki, telluru oraz polonu. Tworzy trwałe połączenia na -II, +IV i +VI stopniu utlenienia [6].

W przyrodzie selen występuje w postaci nieorganicznej i organicznej. Najlepiej przyswajalne są związki zawierające selen w +VI stopniu utlenienia, mniej przyswajane są związki selenu w stopniu +IV. Selen jest akumulowany w roślinach w postaci aminokwasów: selenometioniny, selenocysteiny, Se-metyloselenocysteiny, selenohomocysteiny oraz selenocystationiny. W wyniku biologicznej degradacji organicznych związków selenu powstają: selen, selenki i metyloselenki, natomiast do atmosfery najczęściej jest wydzielany lotny dimetyloseleń [85,93].

Selen należy do mikroelementów. Jego obecność w organizmie człowieka jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania. Jednak zgodnie z etymologią, podobnie jak księżyc ma „dwa oblicza”. Mimo iż jest pierwiastkiem niezbędnym dla organizmów żywych, nadmierne jego spożywanie może spowodować zaburzenia w homeostazie organizmów, a nawet śmierć [32].

Najwięcej selenu znajduje się w mięsie wołowym, wieprzowym, drobiowym, tuńczyka oraz orzechach brazylijskich. Zawartość selenu w roślinach i nasionach zbóż jest bardzo zróżnicowana i ściśle uzależniona od jego zawartości w glebie, na której są uprawiane. Niektóre regiony na świecie, tj.: wyschnięte rejony Australii, centralna i północno-wschodnia część Chin, północna część Korei Północnej, Nepal, Tybet, Demokratyczna Republika Konga, są szczególnie ubogie w ten pierwiastek [85].



Ryc. 1. Powstawanie i unieczynnienie reaktywnych form tlenu

10	20	30	40	50	60
MCAARLAAA	AAQSVYAFS	ARPLAGGEPV	SLGSLRGKVL	LIENVASLUG	TTVRDYTQMN
70	80	90	100	110	120
ELQRRLGPRG	LVVLGFPCNQ	FGHQENAKNE	EILNSLKYVR	PGGGFEPNFM	LFEKCEVNGA
130	140	150	160	170	180
GAHPLFAFLR	EALPAPSDDA	TALMTDPKLI	TWSPVCRNDV	AWNFEKFLVG	PDGVPLRRYS
190	200				
RRFQTIDIEP	DIEALLSQGP	SCA			

Ryc. 2. Sekwencja aminokwasowa peroksydazy glutationowej (GPx1) [wg 80]

Zalecana dobową dawkę selenu – RDA (Recommended Dietary Allowances) dla kobiet to 60 µg (65 µg dla kobiet w ciąży, 75 µg dla kobiet karmiących), natomiast dla mężczyzn to 70 µg (od 14 r.ż.). Wyznaczono również najniższe dawki selenu, które chronią przed chorobą spowodowaną niedoborem selenu (choroba Keshan) – 13 µg/dzień dla kobiet, 19 µg/dzień dla mężczyzn oraz najwyższe dawki, które są niebezpieczne dla zdrowia człowieka – 1540±653 mg/dzień [53,92].

Wszystkie związki selenu dobrze wchłaniają się z przewodu pokarmowego (50-90%) oraz układu oddechowego [14].

Selen dostarczany z pożywieniem jest wiązany głównie z aminokwasami w postaci selenocysteiny i selenometioniny. Postaci te są bardziej przyswajalne od połączeń nieorganicznych.

Selen w postaci nieorganicznej, wchłonięty do organizmu jest początkowo wiązany przez erytrocyty, albuminy oraz globuliny osocze, po czym jest transportowany do tkanek. W krwi, osoczu, wątrobie i śledzionie seleniany (VI) są redukowane do selenianów (IV) lub selenku diwodoru H₂Se. Seleniany (IV) wykazują większe powinowactwo do tkanek i mogą tworzyć kompleksy z białkami. Są również szybciej przyłączane do enzymu peroksydazy glutationowej. Przenikają przez barierę krew-łożysko, dzięki czemu przedostają się do płodu.

Natomiast w osoczu, mięśniach i hemoglobinie, nieorganiczne połączenia selenu przekształcają się w organiczne selenokompleksy. Zawartość tego pierwiastka w płynach ustrojowych i tkankach jest niewielka, a stosunek selenu w erytrocytach do zawartości w osoczu wynosi 3:1 [64]. Najwięcej przyswojonego selenu jest magazynowane w tarczycy, trzustce, wątrobie, nerkach, przysadce mózgowej oraz we włosach i paznokciach. Najważniejsze biologiczne znaczenie selenu w organizmie polega na jego występowaniu w centrach aktywnych wielu białek i enzymów. Selen zawarty w selenocysteinie jest składnikiem centrum aktywnego peroksydazy glutationowej [64]. Okres półtrwania selenu w organizmie człowieka wynosi 65-115 dni. 60% selenu jest usuwane z organizmu z moczem, 30% z kałem, natomiast pozostała część jest usuwana z wydychanym powietrzem, potem i śliną [54].

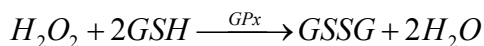
Do najczęstszych chorób, spowodowanych zbyt małą ilością pobieranego selenu, zalicza się: choroba Keshan i Kashin-Beck, nieendemiczna kardiomiopatia, choroba nowotworowa, zespół samoistnych zaburzeń oddechowych. Ponadto bardzo często obserwuje się niskie stężenie selenu we krwi człowieka, które towarzyszą zespołowi Downa, ciąży, laktacji, mukowiscydozie, żywieniu pozajelitowym, zaćmie, przewlekłej niewydolności nerek, chorobom wirusowym (HIV, AIDS i inne) oraz chorobom wątroby [85].

Nadmiar selenu w organizmie hamuje proliferację komórek, replikację DNA, syntezę białek oraz wzmożoną peroksydację lipidów. Przypuszcza się, że ten sam mechanizm jest odpowiedzialny za toksyczne i przeciwnowotworowe działanie związków selenu [33].

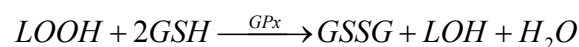
PEROKSYDAZA GLUTATIONOWA

Peroksydaza glutationowa (GPx) należy do rodziny enzymów antyoksydacyjnych. Jest kodowana przez gen *GPX1* (OMIM 138320) zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 3 (3p21.31), który obejmuje zaledwie 1181 par zasad genomowego DNA, z których 902 pary stanowią sekwencje kodujące (2 eksony), wyznaczają enzym.

Peroksydaza glutationowa jest to tetramer o masie cząsteczkowej około 86 kDa. Każda podjednostka jest zbudowana z 203 reszt aminokwasowych (ryc. 2). W pozycji 49 znajduje się selenocysteina (cysteina, w której atom siarki R-SH, zastąpiony jest atomem selenu R-SeH). Główną funkcją tego enzymu jest neutralizacja nadtlenu wodoru H₂O₂.



oraz nadtlenuk organicznych (LOOH) w reakcjach wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkowych ze zredukowaną postacią glutationu GSH.



Aktywność enzymatyczna peroksydazy glutationowej wzrasta wraz ze wzrostem stężenia selenu [18,53,83].

Tabela 1. Formy peroksydazy glutationowej (GPx)

Enzym	Występowanie	Funkcja	Lokalizacja genu (liczba eksonów)	Miejsce występowania selenocysteiny (liczba aminokwasów)	Piśmiennictwo
GPx-1	Erytrocyty, wątroba, nerki, płuca	antyoksydacyjna	3p21.31 (2)	49 (203)	[46]
GPx-2	Przewód żołądkowo-jelitowy, wątroba	antyoksydacyjna	14q23.3 (2)	40 (190)	[53]
GPx-3	Wątroba, nerki, serce, płuca, tarczycza, piersć, przewód pokarmowy, łożysko i męski układ rozrodczy	antyoksydacyjna - zmniejsza ilość wodoronadtlenków lipidowych	5q33.1 (5)	73 (226)	[53,59]
GPx-4	cytosol, mitochondrium, jądro komórkowe	ochrona DNA reguluje aktywność 15-lipooksygenazy oraz 5-lipooksygenazy pełni funkcję w okresie dojrzewania oraz płodności mężczyzn wpływa na funkcje i ruchliwość plemników	19p13.3 (7)	73 (197)	[53,59]
GPx-5	Zarodki, nabłonek węchowy	niepoznana	6	73 (221)	[46]
GPx-6	Homolog GPx-3	niepoznana	6p22.1 (5)	73 (221)	[53]
GPx-7	Siateczka śródplazmatyczna	antyoksydacyjna reguluje proces łańdowania białek	1	57 (187)	[53]
GPx-8	Siateczka śródplazmatyczna	antyoksydacyjna reguluje proces łańdowania białek	5	79 (209)	[53]

Opisano osiem postaci peroksydaz glutationowych (tab.1). Chronią komórki w synergii z witaminą E przed akumulacją nadtlenu wodoru i nadtlenu organicznych oraz zapewniają integralność błon komórkowych.

Selen jest składnikiem również licznej grupy białek pełniących niezbędne funkcje życiowe. W tabeli 2 zestawiono niektóre selenobiałka występujące w organizmie.

MIEDŹ, CYNK, MANGAN

W organizmach miedź pełni przede wszystkim rolę kofaktora enzymów i elementu strukturalnego białek uczestniczących w procesach przeniesienia ładunku. Niedobór miedzi obniża aktywność niektórych enzymów np.: cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej Cu/ZnSOD, ceruloplazminy oraz enzymów niezależnych od miedzi np.: katalazy czy peroksydazy glutationowej, a także wpływa na prawidłowe funkcjonowanie zmiataczy wolnych rodników, tj. metalotioneiny czy glutationu.

Miedź występuje w 11 grupie oraz 4 okresie w układzie okresowym pierwiastków. Występuje na pięciu stopniach utlenienia: 0, +I, +II, +III oraz bardzo rzadko na +IV stopniu utlenienia [13,41].

Miedź jest mikroelementem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Jest przyswajana z pożywienia w małych ilościach (0,6-1,6 mg/dzień). Proces wchłaniania miedzi odbywa się głównie w jelicie cienkim, po strawieniu pokarmu – w żołądku i dwunastnicy [1,38]. Zawartość miedzi w organizmie dorosłego człowieka o przeciętnej masie 70 kg waha się 7-150 mg. Gromadzenie

oraz metabolizm miedzi odbywa się w wątrobie. Wysokie stężenie tego pierwiastka jest również w jądrach, śledzionie, nerkach oraz mózgu [36]. Najmniej jest jej w mięśniach, kościach i płynach ustrojowych. W tkankach stężenie miedzi pozostaje niezmiennym niemal przez całe życie człowieka. W surowicy krwi miedź jest utrzymywana na stałym poziomie około 1mg/L i jest związana w 95% z ceruloplazminą, 3-5% z albuminą i transkupreina oraz w 1% z aminokwasami i peptydami o niewielkiej masie cząsteczkowej [1]. Miedź może występować zarówno w postaci utlenionej Cu(II), jak i zredukowanej Cu(I), przez co pełni rolę kofaktora w wielu enzymach. Z tego też powodu pierwiastek jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania wielu szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za wytwarzanie energii w komórce (oksydaza cytochromu c), usuwanie wolnych rodników (dysmutaza ponadtlenkowa), tworzenie kolagenu i elastyny (oksydaza lizylova), wytwarzanie katecholamin (β -monoooksygenaza dopaminy) czy melaniny (tyrozy-naza) [44].

Pobieranie, transport i usuwanie nadmiaru miedzi w komórce podlega ścisłej kontroli genetycznej z udziałem specjalnych białek. U ludzi transport i metabolizm miedzi jest kontrolowany przez trzy główne grupy białek. Pierwszą z nich są białka błonowe CTR1 i DMT1, dzięki którym jony miedzi mogą być pobrane przez komórkę. Druga grupa to metalochaperony (ATOX1, CCS, białka z grupy COX oraz SCO), białka wiążące jony miedzi w obrębie cytoplazmy i transportujące je do różnych organelli. W skład trzeciej grupy wchodzi białka o budowie ATPaz (ATP7A i ATP7B), które regulują stężenie jonów miedzi w komórce, jak również pośredniczą we włączaniu kationów tego pierwiastka do cząsteczek

Tabela 2. Niektóre selenobiałka i ich funkcje

Enzym	Gen kodujący	M. cz. [Da]	Miejsce występowania	Główne funkcje
Selenobiałko-P (SeIP)	5p12	41,174	Mózg, wątroba,	antyoksydant
Selenobiałko-W (SeIW)	19q13.32	9,448	Stercz, mózg, jelito grube, serce, mięśnie szkieletowe	antyoksydant ochrona przed rozwojem mioblastów wiążących wapń
Selenobiałko-N (SeIN)	1p36.11	65,813	Siateczka śródplazmatyczna	wpływa na właściwy rozwój mięśni bierze udział w proliferacji komórek bierze udział w homeostazie wapnia
Selenobiałko-S (SeIS)	15q26.3	21,163	Siateczka śródplazmatyczna	regulacja stanów zapalnych eliminacja źle sfałdowanych białek
Selenobiałko-K (SeIK)	3p21.31	10,645	Śledziona, siateczka śródplazmatyczna	antyoksydant
Selenobiałko-H (SeIH)	11q12.1	13,453	Śledziona, mózg, jądro komórkowe	kontrola genów odpowiadających za syntezę glutationu zwiększenie żywotności komórek
Selenobiałko-R (SeIR, MsrB)	16p13.3	12,760	Wątroba, nerki	antyoksydant regulacja metabolizmu metioniny regeneracja białek
Selenobiałko-M (SeIM)	22q12.2	16,232	Siateczka śródplazmatyczna	bierze udział w procesie fałdowania białek antyoksydant
15Selenobiałko (SeI15)	1p22.3	17,790	Siateczka śródplazmatyczna	bierze udział w procesie fałdowania białek ochrona przed rozwojem nowotworu
Reduktaza 1 tioredoksyny (TRx1)	12q23.3	54,670	cytoplazma mitochondria	metabolizowanie leków regulacja ekspresji wielu genów regulacja embriogenezy
Reduktaza 2 tioredoksyny (TRx2)	22q11.21	56,507	cytoplazma	różnorodna
Reduktaza 3 tioredoksyny (TRx3)	3q21.2	70,683	mitochondria	różnorodna

Według: [33,53,59].

białek enzymatycznych [44].

Dzienne zapotrzebowanie na miedź dla dojrzałych kobiet i mężczyzn wynosi 9 mg/dzień. Okres niemowlęcy jest najbardziej krytycznym okresem w życiu człowieka pod względem zapotrzebowania na miedź. Szybki wzrost organizmu zwiększa zapotrzebowanie na ten mikroelement, a dieta oparta wyłącznie na mleku nie dostarcza jego wystarczających ilości. Jednocześnie występuje wysokie ryzyko zatrucia, związane z nietolerancją dużych dawek miedzi przez niedojrzałą funkcjonalnie wątrobę niemowląt. Produkty spożywcze bogate w miedź to np.: owoce morza, orzechy, czekolada, produkty zbożowe, grzyby, wątroba [2].

Główną drogą wydalania miedzi z organizmu jest żółć (2500 µg/dzień). W niewielkim stopniu jest również usuwana z moczem (do 50 µg/dzień). Niezaburzone wydalanie oraz szybkość tego procesu decydują o prawidłowej homeostazie miedzi w organizmie [2].

Wzrost stężenia miedzi w surowicy krwi w organizmie może doprowadzić do nadczynności tarczycy, reakcji alergicznych, marskości wątroby, powstania infekcji, zakażeń. Zwiększone stężenie miedzi jest związane również z ciążą oraz laktacją, może również występować u kobiet stosujących terapię antykoncepcyjną [55].

Niedobór miedzi w organizmie może spowodować: przepuklinę, tętniaki, pęknięcie naczyń krwionośnych, krwotoki z nosa, osteoporozę, zaburzenia mózgowo, zaburzenia w metabolizmie glukozy i cholesterolu, w czynności tarczycy, ogólne osłabienie i zmęczenie [58].

Cynk został odkryty w Chinach lub Indiach około 1500 roku p.n.e., a do Europy dotarł w XVII w. [92]. Jest pierwiastkiem z grupy 12 i 4 okresu układu okresowego.

W organizmie człowieka znajduje się 2-4 g cynku. Dzienne zapotrzebowanie wynosi w zależności od wieku: u niemowląt 3-5 mg/dzień; u dzieci 10 mg/dzień,

dorośli potrzebują 10-15 mg/dzień cynku, a kobiety ciężarne lub karmiące 19 mg/dzień. Dostarczany jest do organizmu głównie z diety. Bogate w cynk jest pożywienie pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, tj.: mięso, jaja, wątroba, ryby, ostrygi, ale również nasiona dyni, słonecznika, kielki pszenicy, otręby pszenne, cebula czy czosnek [25]. Światowa Organizacja Zdrowia WHO (World Health Organization) rekomenduje dzienne zapotrzebowanie na cynk dla kobiet 9,4-10 mg, a dla mężczyźni 6,5-7,1 mg [52].

Dużą zawartość cynku odkryto w wielu tkankach i narządach: mięśnie i kości, skóra, mózg, wątroba, nerki, śledziona i trzustka.

Wchłanianie cynku odbywa się w dwunastnicy i jelicie cienkim, przyswajany jest w 20-40%, łatwiej wchłania się z pokarmów pochodzenia zwierzęcego. Za transport w głąb enterocyta jest odpowiedzialny transporter metali dwuwartościowych 1 (DCT1). DCT1 obecny w rąbku szczoteczki, jest zdolny do wiązania nie tylko dwuwartościowych jonów cynku, ale także innych pierwiastków, takich jak żelazo, miedź, kadm, mangan, kobalt, nikiel czy ołów. Po przedostaniu się ze światła jelita do komórki, jony cynku wiążą się z metalotioneinami lub są magazynowane w pęcherzykach wydzielniczych. Zdolność tworzenia stabilnych kompleksów z białkami, kationy cynku zawdzięczają reakcjom z atomami azotu, grupami SH i karboksylowymi bocznymi łańcuchów aminokwasów, głównie cysteiny i histydyny. Osoczowa pula cynku to jony związane z albuminą i α 2-makroglobuliną [70].

Cynk jest pierwiastkiem śladowym niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania grupy metaloenzymów, m.in.: enzymów z rodziny oksydoreduktaz, hydrolaz czy ligaz. Jony cynku są głównym elementem strukturalnym (np. dehydrogenaza alkoholowa) lub pełnią funkcję katalityczną (np. karboksypeptydaza, fosfataza zasadowa) wpływając bezpośrednio na wzrost lub spadek aktywności katalitycznej enzymu [19]. Cynk ma właściwości przeciwutleniające. Przeciwdziała powstawaniu groźnego rodnika hydroksylowego OH[•] oraz anionorodnika tlenkowego O₂^{-•}, konkurując z metalami prooksydacyjnymi Fe²⁺ oraz Cu²⁺ [58]. Jest składnikiem enzymu antyoksydacyjnego – cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej (Zn/Cu SOD), odpowiadającej za neutralizację rodnika ponadtlenkowego. Pełni rolę w utrzymaniu równowagi redox w komórkach [65].

Niedobór cynku wiąże się z niedostatecznym dostarczaniem tego pierwiastka z pożywieniem. Może być też związany ze stanami zwiększonego zapotrzebowania na ten mikroelement, np. ciąża, laktacja, wzmoczony wysiłek fizyczny, stres, otyłość, okres intensywnego wzrostu [15]. Upośledzenie wchłaniania cynku z jelit na skutek długotrwałych biegunk, zaburzeń wchłaniania lub stanów po resekcji jelit, również może doprowadzić do niedoboru cynku [65]. Niedobór tego pierwiastka, może występować u osób nadużywających alkoholu, cierpiących na zespół

złego wchłaniania, posiadających genetycznie uwarunkowane zaburzenia metaboliczne (np. mutacje transportera Zip4), z przewlekłą niewydolnością nerek [25,63]. Może być przyczyną licznych objawów chorobowych, tj.: zahamowaniem wzrostu, hipogonadyzmem, opóźnieniem dojrzewania płciowego [63,78], zaburzeniem węchu i smaku, upośledzeniem funkcji poznawczych, a nawet może doprowadzić do autyzmu [25]. Mogą się pojawiać zmiany skórne – egzemy, rozstępki, trudności w gojeniu się ran, podatność na infekcję, związana z zaburzeniem układu immunologicznego [60]. Niedobór cynku wpływa ponadto na zaburzenie płodności u mężczyzny, zmniejsza liczbę nasienia i obniża jego żywotność [15,89].

Nadmiar cynku jest szkodliwy i może doprowadzić do osłabienia, niedokrwistości oraz wywoływać wymioty. Przypadki zatrucia cynkiem zdarzają się rzadko i są wynikiem spożywania pokarmów lub picia napojów z naczyń wykonanych z cynku [89]. Upośledza to funkcję limfocytów T, wywołuje leukopenię oraz choroby neurodegeneracyjne, bezsenność, upośledza pamięć, zaburza słuch i nadmierną potliwość [25,65].

Mangan jest pierwiastkiem chemicznym znajdującym się w 7 grupie i 4 okresie układu okresowego. Śladowe ilości są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania wielu enzymów zaangażowanych w podstawowe procesy metaboliczne, tj.: dekarboksylację, syntezę kwasów tłuszczowych, metabolizm glukozy, metabolizm białek, formowanie układu kostnego, syntezę cholesterolu. Mangan jest głównym składnikiem i aktywatorem enzymów uczestniczących w ochronie przeciwutleniającej organizmu, tj.: karboksylazy pirogronianowej, glikozylotransferazy, syntetazy glutaminowej, fosfatazy zasadowej, a zwłaszcza mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej [73].

Mangan jest naturalnym składnikiem tkanek i płynów ustrojowych. Do organizmu jest dostarczany z pożywieniem: owoce, orzechy, mięso, ryż, herbata, rośliny strączkowe. Dzielne zapotrzebowanie zmienia się w zależności od wieku, stanu organizmu oraz płci [91]. Organizm człowieka dorosłego zawiera 10-20 mg manganu, niemowlęta zawierają 10 razy więcej tego pierwiastka. Mangan gromadzi się głównie w mitochondriach wątroby (1,2-1,7 mg/g tkanki), trzustki (0,8-1,2 mg/g tkanki), nerek (0,56-0,93 mg/g tkanki), mózgu (około 0,3 mg/g tkanki), kości (0,06-0,07 mg/g tkanki). Wątroba odgrywa główną rolę w regulowaniu absorpcji i wydalania manganu. We krwi mangan występuje związany z α -makroglobuliną w postaci Mn(II). Po utlenieniu do Mn(III) wiązany jest przez transferynę i w tej postaci jest pobierany przez tkanki. Zdecydowana większość manganu jest związana z erytrocytami (stężenie manganu w erytrocytach jest prawie 5 razy większe niż w surowicy krwi).

Do objawów niedoboru manganu należą: małe stężenie cholesterolu we krwi, zmiana barwy włosów z czarnych na rude, zahamowanie wzrostu, nieprawidłowa minera-

10	20	30	40	50	60
MATKAVCVLK	GDGPVQGIIN	FEQKESNGPV	KVWGSIKGLT	EGLHGFHVHE	FGDNTAGGCTS
70	80	90	100	110	120
AGPHFNPLSR	KHGGPKDEER	HVGDLGNVTA	DKDGVADVSI	EDSVISLSGD	HCIIGRTLTV
130	140	150			
HEKADDLGKG	GNEESTKTGN	AGSRLACGVI	GIAQ		

Ryc. 3. Sekwencja aminokwasowa cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1) [wg 80]

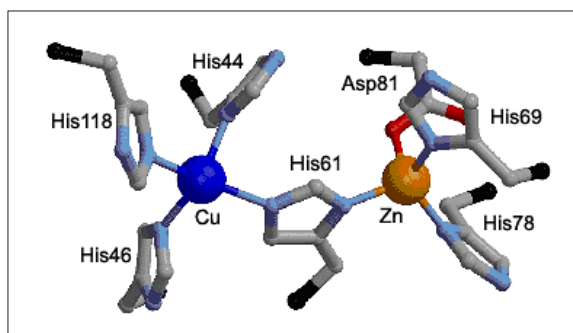
lizacja i deformacja kości, nieskoordynowane ruchy, niedokrwiłość, powiększenie tarczycy, łuskowate zapalenie skóry, hipogonadyzm (dysfunkcja układu rozrodczego). Wady układu kostnego w wyniku niedoboru manganu są spowodowane jego udziałem w aktywacji glikozylotransferazy – enzymu, który uczestniczy w syntezie mukopolisacharydów chrząstek. Niedobór manganu w okresie rozwoju płodu może spowodować wady wrodzone w prawidłowym wytwarzaniu tkanki łącznej oraz zmianami w układzie kostnym [22].

Zatrucie manganem zdarza się u osób pracujących w hutach, kopalniach manganu, podczas prac spawalniczych oraz w zakładach chemicznych podczas otrzymywania i stosowania jego związków. Obowiązujące w kraju, najwyższe dopuszczalne stężenie tego pierwiastka w środowisku pracy nie powinno przekraczać 0,2 mg/m³. Przypadki ostrych zatruc występują bardzo rzadko np. na skutek omyłkowego połknięcia związków manganu w postaci krystalicznej lub u osób żywionych pozajelitowo przez długi okres. Objawami ostrego zatrucia są: pieczenie w gardle, nudności, wymioty, zapalenie błony śluzowej żołądka i jelit oraz trudności w połykaniu. Może również nastąpić zgon z powodu obrzęku nągłośni lub niewydolności krążeniowej. W przeszłości zdarzały się przypadki ostrego zatrucia u osób pijących wodę ze źródła. Opisano również przypadek zgonu spowodowany perforacją i stanem zapalnym otrzewnej po irygacji dróg moczowo-płciowych roztworem nadmanganianu potasu w celu aborcji [75].

Przewlekłe zatrucie manganem uszkadza układ nerwowy, oddechowy i płciowy. Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym (tzw. manganizm) objawiają się: niedowładem kończyn, bólami głowy, zubożeniem mimiki, drżeniem głowy, języka i rąk, nudnościami, wymiotami, zaburzeniami orientacji, apatią, utratą pamięci, stanami lękowymi, a także kompulsywnym śmiechem lub płaczem [79]. Bardzo często obserwuje się również symptomy podobne do choroby Parkinsona. Surong [90] wykazał, iż nadmierna ilość manganu kumuluje się w mitochondrium wątroby, powodując wzrost zawartości rodników ponadtlenkowych, obniżenie aktywności enzymów oraz zaburzenie funkcji mitochondrialnych narządu.

DYSMUTAZA PONADTLENKOWA (SOD)

Dysmutaza ponadtlenkowa jest zbudowana z części białkowej (apoenzym) oraz znajdującej się w centrum aktywnym części niebiałkowej (koenzym, grupa prostetyczna), którą tworzy jon metalu (miedź, cynk lub man-



Ryc. 4. Schemat budowy miejsca katalicznego cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej (Cu/Zn SOD) [wg 71]

gan). W zależności od miejsca występowania wyróżnia się trzy izoformy SOD: cytoplazmatyczną (SOD1, Cu/ZnSOD), mitochondrialną (SOD2, MnSOD) oraz zewnątrzkomórkową (SOD3, EC-SOD).

CYTOPLAZMATYCZNA DYSMUTAZA PONADTLENKOWA

Cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa (Cu/Zn SOD; SOD1) jest metaloenzymem występującym głównie w cytosolu, jądrze komórkowym, mitochondrium i peroksysomach. Enzym jest kodowany przez gen SOD1 (OMIM 147450) umiejscowiony na długim ramieniu chromosomu 21 (21q22.11). Obejmuje 9308 par zasad genomowego DNA, przy czym 964 pary zasad stanowią sekwencje kodujące – 5 eksonów wyznaczające ZnCuSOD1. W organizmach eukariotycznych dysmutaza ponadtlenkowa występuje w postaci dimerycznej. Enzym jest zbudowany z dwóch jednakowych podjednostek. Każda zawiera 154 reszty aminokwasowe (ryc. 3) o masie około 16 kDa [35].

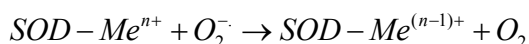
W każdej z podjednostek znajduje się jeden jon miedzi Cu²⁺ oraz jeden jon cynku Zn²⁺. Jony miedzi są związane z resztami histydynowymi w pozycjach 44, 46 oraz 118, natomiast jony cynku są związane przez reszty histydynowe 69, 78 i kwas asparaginowy 81. Oba jony połączone są ze sobą przez resztę histydynową 61 (ryc. 4). Jony miedzi pełnią funkcję katalityczną w skutecznym usuwaniu anionorodnika ponadtlenkowego, natomiast jony cynku odgrywają rolę stabilizującą odporną na czynniki denaturujące fizyczne i chemiczne [9,35].

Cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa jest białkiem charakteryzującym się dużą odpornością na działanie podwyższonej temperatury, trudno ulega proteolizie oraz działaniu środków denaturujących. Białko zach-

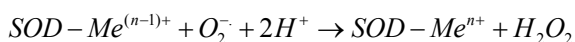
10	20	30	40	50	60
MLSRAVCGTS	RQLAPALGYL	GSRQKHSLPD	LPYDYGALEP	HINAQIMQLH	HSKHHAAYVN
70	80	90	100	110	120
NLNVTEEKYQ	EALAKGDVTA	QIALQPALKF	NGGGHINHSI	FWTNLSPNGG	GEPKGELLEA
130	140	150	160	170	180
IKRDFGSFDK	FKEKLTAASV	GVQGSWGWL	GFNKERGHLO	IAACPNQDPL	QGTTGLIPLL
190	200	210	220		
GIDVWEHAYY	LQYKNVRPDY	LKAIWNVINW	ENVTERYMAC	KK	

Ryc. 5. Sekwencja aminokwasowa mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD2) [wg 80]

wuje stabilność w szerokim zakresie pH [34]. Katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i cząsteczki tlenu, pełni funkcję antyoksydacyjną [58]. Reakcja przebiega w dwóch etapach [30]. W pierwszym następuje redukcja jonu metalu w centrum katalitycznym:



Drugi etap polega na jednoelektronowym utlenieniu jonu metalu i utworzeniu nadtlenu wodoru:



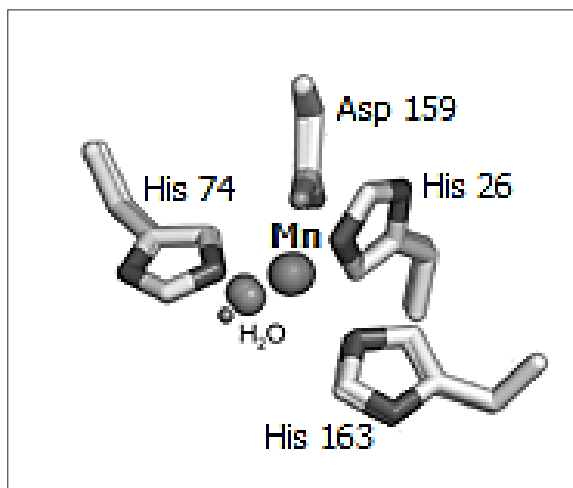
Reakcja eliminuje anionorodnik ponadtlenkowy ze środowiska komórki. Utworzony nadtlenek wodoru jest rozkładany do wody i tlenu przez katalazę lub peroksydazę glutationową [30].

Mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa

Mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa (MnSOD; SOD2) jest homotetramerem o masie około 23 kDa każdem z podjednostek. Kodowana jest przez gen *SOD2* (OMIM 147460) umiejscowiony na długim ramieniu chromosomu 6 w pozycji 6q25.3. Gen składa się z 14203 par zasad. 6 sekwencji kodujących (1022 pary zasad) określa MnSOD. Enzym jest zbudowany z 222 reszt aminokwasowych (ryc. 5) [30,35].

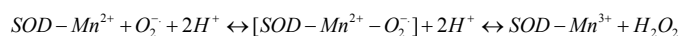
Każda z czterech podjednostek jest zbudowana z dwóch domen. W centrum aktywnym zawierają jon manganu, który pełni funkcję zarówno katalityczną jak i stabilizującą enzym. Usunięcie manganu z centrum aktywnego powoduje utratę właściwości katalitycznych, których nie można przywrócić zastępując go innym pierwiastkiem. Mangan w centrum aktywnym jest związany kowalencyjnie z His26 i His74 z domeny N-końcowej oraz His163 i Asp159 z domeny C-końcowej. Centrum aktywne MnSOD występuje w hybrydyzacji bipiramidy trygonalnej. W piątej pozycji jest cząsteczka wody (ryc. 6) [62].

Mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa występuje w macierzy mitochondrialnej wszystkich komórek ssaków. Manganowe dysmutazy ponadtlenkowe katalizują reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego w sposób podobny do CuZnSOD. W pierwszym etapie



Ryc. 6. Schemat budowy miejsca katalitycznego mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) [77]

następuje utlenienie anionorodnika ponadtlenkowego do tlenu cząsteczkowego. Natomiast w drugim etapie enzym katalizuje redukcję anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru.



Wzrost aktywności enzymu obserwuje się pod wpływem m.in.: stresu oksydacyjnego, TNF- α , IL-1 czy liposacharydów. W przeciwieństwie do CuZnSOD cyjanki nie obniżają aktywności katalitycznej MnSOD. Aktywność obniża wysokie pH [30].

Zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa

Zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (EC-SOD; SOD3) jest miedziowo-cynkową glikoproteiną o masie około 135 kDa. Może występować jako dimer, tetramer lub tworzyć multimery. Tetramer składa się z dwóch dimerów połączonych mostkami disiarczkowymi, utworzonymi między C-terminalnymi resztami cysteiny (Cys219-Cys 219). Każda podjednostka ludzkiej SOD3 jest zbudowana z 240 reszt aminokwasowych (ryc.7), jednego jonu miedzi i cynku, zawiera 6 reszt cysteiny [23].

10	20	30	40	50	60
MLALLCSCLL	LAAGASDAWT	GEDSAEPNSD	SAEWIRDMYA	KVTEIWQEVN	QRRDDDGALH
70	80	90	100	110	120
AACQVQPSAT	LDAAQPRVTG	VVLFRLAPR	AKLDAFFALE	GFPTEPNSSS	RAIHVHQFGD
130	140	150	160	170	180
LSQGCSTGP	HYNPLAVPHP	QHPGDFGNFA	VRDGLWRYYR	AGLAASLAGP	HSIVGRAVVV
190	200	210	220	230	240
HAGEDDLGRG	GNQASVENGN	AGRRLACCVV	GVCGPGLWER	QAREHSERKK	RRRESECKAA

Ryc. 7. Sekwencja aminokwasowa zewnątrzkomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD3) [wg 80]

Tabela 3. Izoformy dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Charakterystyka	SOD1	SOD2	SOD3
Chromosom	21q22.11	6q25.3	4q21
Umiejscowienie komórkowe	cytosol	mitochondria	błona komórkowa, macierz, międzykomórkowa
Liczba aminokwasów	155	222	240
Masa cząsteczkowa, kDa	32	96	135
Metal w centrum aktywnym	Cu, Zn	Mn	Cu, Zn
Liczba monomerów	homodimer	homotetramer	homotetramer
Wiązanie heparyny	nie wiąże	nie wiąże	wiąże

Według [22] uzupełniono

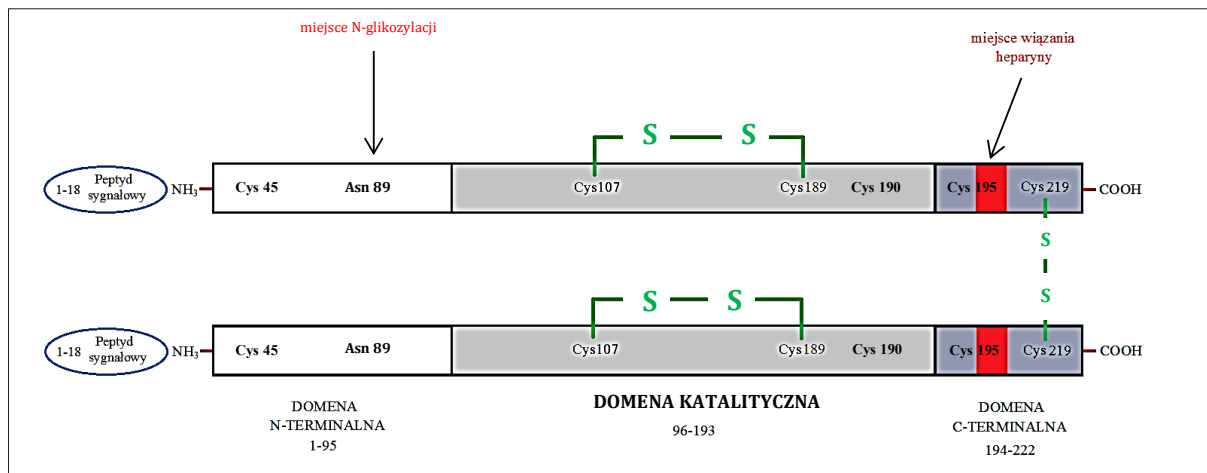
Zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa dzieli się na trzy domeny funkcjonalne poprzedzone peptydem sygnałowym, zbudowanym z 18 reszt aminokwasowych (ryc. 8). Domena N-terminalna, ma charakter hydrofobowy. Zbudowana z 95 reszt aminokwasowych, w pozycji Asn89 znajduje się miejsce N-glikozylacji. W domenie katalitycznej (His96 – Gly193), zawierającej centrum aktywne, 49 reszt spośród 97 jest identyczna z Cu/ZnSOD. Jest odpowiedzialna za funkcję katalityczną enzymu. Znajduje się także wewnętrzny mostek disiarczkowy utworzony między Cys107 i Cys189. Miedź jest związana przez reszty His96, His98, His163, natomiast cynk przez His121, His124 oraz Asp127. Oba jony połączone są ze sobą poprzez resztę His113. Jony miedzi oraz cynku są nośnikami ładunków dodatnich, powodujących elektrostatyczne przyciąganie anionorodnika ponadtlenkowego do miejsca katalitycznego [23]. Domena C-terminalna, silnie hydrofilowa, jest zbudowana z reszt aminokwasowych 194-222. W pozycjach 210-218 znajduje się sekwencja dziewięciu aminokwasów zawierających ładunek dodatni (sześć reszt Arg i trzy Lys). Domena ma zdolność wiązania się z heparyną oraz siarczanem heparanu, które występują na powierzchni komórek i w macierzy zewnątrzkomórkowej, co warunkuje zewnątrzkomórkowe umiejscowienie enzymu. Podczas proteolizy, domena C-końcowa wiążąca heparynę może zostać usunięta z SOD3. Proces decyduje o zewnątrzkomórkowym umiejscowieniu dysmutazy ponadtlenkowej w tkankach organizmu [74].

Porównanie izoform dysmutazy ponadtlenkowej przedstawiono w tabeli 3.

ŻELAZO

Żelazo występuje w 8 grupie oraz 4 okresie w układzie okresowym pierwiastków, jest metalem. Na powietrzu pokrywa się cienką warstwą ochronną, która zabezpiecza przed działaniem tlenu atmosferycznego. W związkach występuje najczęściej na +II i +III stopniu utlenienia, bardzo rzadko na +IV, +V i +VI stopniu [13]. W organizmie dorosłego człowieka zawartość żelaza wynosi przeciętnie 2,3 g u kobiet oraz 3,8 g u mężczyzn. Około 60-70% żelaza znajduje się w erytrocytach w postaci związanej z hemoglobiną (Fe^{2+}), 5-6% wchodzi w skład mioglobiny (Fe^{2+}), prawie 1% pozostaje związane z transferyną osoczną i pozaosoczną (Fe^{3+}), a pozostałe 20-30% to żelazo zmagazynowane w wątrobie w postaci ferrytyny i hemosyderyny (Fe^{3+}). Żelazo nie występuje w postaci wolnych atomów w organizmie [3,27].

Udział żelaza w wielu przemianach metabolicznych wynika z jego właściwości chemicznych. Żelazo występuje w dwóch stopniach utlenienia, w postaci jonów Fe^{2+} oraz Fe^{3+} , dlatego też może być zarówno akceptorem, jak i donorem elektronów [3,7,84]. Zdolność żelaza do przyjmowania różnych stopni utlenienia predysponuje go do wywoływania działań cytotoksycznych. Jony tego pierwiastka mogą brać udział w powstawaniu reaktywnych rodników tlenowych. Jon Fe^{3+} może zostać zredukowany w obecności czynników redukujących (np. anionorodnik ponadtlenkowy O_2^-) do jonu Fe^{2+} , zdolnego do katalizowania powstawania groźnego rodnika hydroksylowego ($OH\cdot$) z nadtlenu wodoru (H_2O_2) w reakcjach Fentona i Habera-Weissa [36,82].



Ryc. 8. Budowa zewnątrzkomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej (EC-SOD)

Zarówno niedobór, jak i nadmiar żelaza jest zjawiskiem niekorzystnym dla organizmu. Niedobór żelaza prowadzi do rozwoju niedokrwistości, natomiast nadmiar żelaza do hemosyderozy lub hemochromatozy. Ze względu na to, iż nadmiar żelaza w warunkach fizjologicznych jest wydalany, częściej stwierdza się różnego stopnia niedobory żelaza (syderopenie) [3].

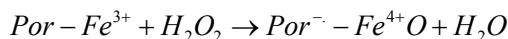
KATALAZA

Katalaza jest enzymem umiejscowionym w peroksysomach, kodowana przez gen CAT (OMIM 115500) znajdujący się na krótkim ramieniu chromosomu 11 w pozycji 11p13. Gen składa się z 33127 par zasad genomowego DNA, z których kodujące sekwencje zajmują 2291 pary zasad, wyznaczając tym samym białko zbudowane z 527 reszt aminokwasowych (ryc. 9) [35].

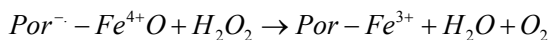
Katalaza składa się z czterech identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej około 60 kDa. Centrum aktywne każdej podjednostki tworzy grupa hemowa (kompleks Fe^{3+} i porfiryny). Katalaza jest białkiem bardzo uwodnionym. Jony żelaza hemowego (pięciokoordynacyjnego) są dostępne dla nadtlenków i małych cząsteczek na dnie długiego kanału wypełnionego siecią cząsteczek wody, zakończonego wiązaniem między cząsteczką wody połączonej z białkami łańcuchów bocznych: Tyr358, His75 oraz Asn148. Reaktywność Fe^{3+} jest regulowana oddawaniem elektronu przez Tyr358 oraz zobojętnieniem ładunku grup karboksylowych przez Arg72, Arg112 oraz Arg365 (ryc. 10). Stabilizację enzymu zapewnia wiązanie każdej podjednostki z jedną cząsteczką NADPH (fosforan dinukleotydu nikotyno-amidoadeninowego), który zabezpiecza przed toksycznym działaniem nadtlenu wodoru [29].

Katalaza wykazuje podwójną aktywność, tj. katalazową oraz peroksydazową. Przy dużym stężeniu nadtlenu wodoru podstawową funkcją enzymu jest udział w reakcji dysproporcjonowania H_2O_2 , która przebiega w dwóch etapach [29]. W pierwszym powstaje kationorodnik por-

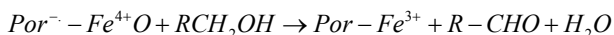
firynowy (w wyniku utlenienia żelaza hemowego przez nadtlenek wodoru:



Przejściowy produkt reakcji zostaje zredukowany do żelaza na trzecim stopniu utlenienia przez kolejną cząsteczkę nadtlenu wodoru, w wyniku czego powstaje tlen cząsteczkowy i woda:



Przy niewielkim stężeniu H_2O_2 dominuje aktywność peroksydazowa katalazy. Labilny kompleks utlenienia substraty o charakterze donorów wodoru, tj.: etanol, metanol, fenol czy mrówczan (RCH_2OH) do odpowiednich aldehydów:



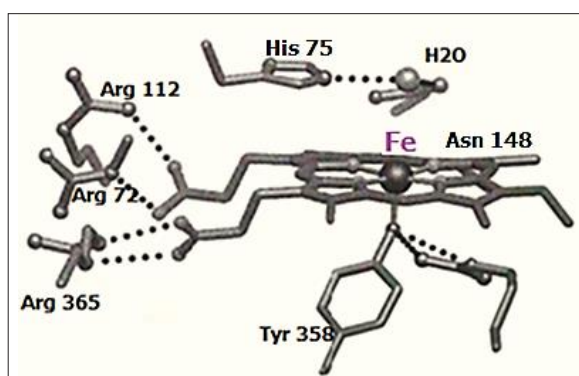
Katalaza bardzo szybko reaguje z nadtlentkiem wodoru. W ciągu 1 minuty CAT rozkłada do wody i tlenu około 6 mln cząsteczek tego związku. Uważa się również, że enzym katalizuje w organizmie reakcję utlenienia metalicznej rtęci do jonów Hg^{2+} [29].

Instrumentalne metody oznaczania pierwiastków śladowych w materiale biologicznym

Analiza pierwiastkowa próbek biologicznych wymaga zastosowania bardzo czułych technik analitycznych, które pozwalają oznaczyć stężenie pierwiastka rzędu ng lub pg. Aby podwyższyć czułość oznaczeń, często konieczne jest oddzielenie pierwiastka od matrycy. Oceniając przydatność danej techniki należy wziąć pod uwagę nie tylko jej czułość, ale również dokładność, czas i koszt analizy. Zastosowanie nawet najczulszej techniki analitycznej nie zapewni uzyskania wiarygodnych wyników, jeżeli próbka nie będzie we właściwy sposób pobrana, przechowywana i przygotowana do analizy. W celu kontroli dokładności oznaczenia sto-

10	20	30	40	50	60
MADSRDPASD	QMQHWKEQRA	AQKADVLTTG	AGNPVGDKLN	VITVGPRGPL	LVQDVFVFTDE
70	80	90	100	110	120
MAHFDREERIP	ERVVHAKGAG	AFGYFEVTHD	ITKYSKAKVF	EHIGKKTPIA	VRFSTVAGES
130	140	150	160	170	180
GSADTVRDPDR	GFAVKFYTED	GNWDLVGNNT	PIFFIRDPIIL	FPSFIHSQKR	NPQTHLKDPD
190	200	210	220	230	240
MVWDFWSLRP	ESLHQVSFLF	SDFGIPDGHR	HMNGYGSHTF	KLVNANGEAV	YCKFHYHTDQ
250	260	270	280	290	300
GIKNLSVEDA	ARLSQEDPDY	GIRDLFNAIA	TGKYPSWTFY	IQVMTFNQAE	TEPFNPEDLT
310	320	330	340	350	360
KVWPHKDYPL	IPVGLVLRN	NPVNYFAEVE	QIAFDPSNMP	PGIEASPKDM	LQGRLEFAYPD
370	380	390	400	410	420
THRHRILGPNY	LHIPVNCPIR	ARVANYQRDG	PMCMQDNQGG	APNYYPNSFG	APEQQPSALE
430	440	450	460	470	480
HSIQYSGEVR	RFNTANDDNV	TQVRAFVNVV	LNEEQRKRLC	ENIAGHLKDA	QIFIQKKAVK
490	500	510	520		
NFTEVHPDYG	SHIQALLDKY	NAEKPKNAIH	TFVQSGSHLA	AREKANL	

Ryc. 9. Schemat sekwencji aminokwasowej katalazy (CAT) [wg 80]



Ryc. 10. Schemat budowy miejsca katalitycznego katalazy (CAT)

suje się materiał porównawczy, odpowiedni do rodzaju analizowanej próbki.

Obecnie do oznaczania zawartości pierwiastków są stosowane instrumentalne metody analityczne, tj. spektrofotometryczne, fluorymetryczne, atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją w płomieniu lub elektrotermiczną, atomowa spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w płomieniu lub plazmie, spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie, metody elektrochemiczne, metody jądrowe (tab. 4).

Metody spektrofotometryczne wykorzystują związki tworzące barwne kompleksy z pierwiastkami np. miedź i 6-(2-naftylo)-2,3-dihydro-1,2,4-triazyno-3-tion (314 nm) [48], żelazo i ferrozyna (562 nm) [11], selen i 3,3'-diaminobenzzydina (350 nm) [12], cynk i 1-(2-pirydyloazo)-2-naftol (554 nm) [43]. Są najczęściej stosowanymi metodami w laboratoriach usługowych ze względu na niski koszt analizy, zadowalającą czułość i możliwość automatyzacji.

Metody fluorymetryczne polegają na pomiarze natężenia promieniowania emitowanego po wzbudzeniu fluoryzującego kompleksu pierwiastka z odpowiednim odczynnikiem np. selen i 2,3-diaminonaftalen (389 i 521 nm) [8], cynk i 2-chinolinohydrazon aldehydu pikolinowego (485 i 535 nm) [37].

Atomowa spektrometria absorpcyjna jest jedną z najczęściej stosowanych technik ze względu na swoistość, niską granicę wykrywalności i precyzję. Warunkiem absorpcji atomowej jest obecność wolnych atomów oznaczanego pierwiastka w stanie podstawowym w wyniku optycznego promieniowania, o charakterystycznej dla tego pierwiastka długości fali. Wydajność tworzenia wolnych atomów zależy od rodzaju atomizera. W laboratoriach stosuje się zarówno atomizer płomieniowy (FAAS), jak również elektrotermiczny (ETAAS) [40].

Atomowa spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie jest metodą opartą na emisji widm atomowych pierwiastków. W porównaniu do techniki absorpcyjnej ma wiele zalet, tj. analiza wielopierwiastkowa, jednoczesne oznaczanie zarówno głównych jak i śladowych pierwiastków, szeroki zakres prostoliniowości krzywych kalibracyjnych, zadowalające granice wykrywalności. Głównym ograniczeniem techniki są liczne interferencje spektralne oraz wysoki koszt analizy [51].

Spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej pozwala na analizę wielopierwiastkową przy jednocześnie bardzo niskich granicach wykrywalności i liniowości wskazań w zakresie kilku rzędów wielkości. Głównym ograniczeniem metody jest jednak duża zawartość soli w próbce. Zaletą techniki jest możliwość oznaczania poszczególnych izotopów, co jest wykorzystywane w badaniach metabolizmu związków pierwiastka, prowadzonych z użyciem jego stabilnych izotopów [72].

Tabela 4. Instrumentalne techniki analizy pierwiastków w materiale biologicznym

Technika detekcji	Zastosowanie	Piśmiennictwo
Spektrofotometria	miedź w surowicy krwi żelazo w surowicy krwi cynk w insulynie	[11,43,48]
Fluorymetria	selen w osoczu cynk w osoczu	[12,37]
Atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją w płomieniu (FAAS)	cynk i miedź w moczu	[47]
Atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją elektrotermiczną (ETAAS)	cynk w osoczu	[40]
Atomowa spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie (ICP-OES)	analiza wielopierwiastkowa w surowicy krwi	[51]
Spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie (ICP-MS)	analiza wielopierwiastkowa w krwi pełnej	[72]
Metody elektrochemiczne - polarografia	cynk i miedź w surowicy krwi	[68]
Neutronowa analiza aktywacyjna (NAA)	selen związany z białkami w surowicy krwi	[5]

Metody elektrochemiczne, tj. woltametria, amperometria czy polarografia, pozwalają na oznaczanie pierwiastka na określonym stopniu utlenienia wykazującym elektroaktywność lub po skompleksowaniu go elektroaktywnym ligandem [16,38,68,86].

Neutronowa analiza aktywacyjna polega na wykrywaniu i oznaczeniu zawartości pierwiastków w danej matrycy przez pomiar promieniowania emitowanego przez promieniotwórcze nuklidy powstałe w wyniku reakcji jądrowych. Nie wymaga stosowania wzorców i ślepej próby. Jest metodą bezwzględna, „definitywną”, wykorzystywaną w procesie certyfikowania materiałów odniesienia. Metoda nie jest przeznaczona do analizy rutynowej, ale do weryfikacji dokładności innych metod analizy śladowej [5].

Oznaczenie całkowitej zawartości pierwiastków w próbkach biologicznych często jest niewystarczające, gdyż nie dostarcza informacji w jakiej postaci występuje dany pierwiastek (w postaci jonu lub związku chemicznego, na którym stopniu utlenienia, z jakim ligandem jest związany np. Fe-mioglobina i Fe-katalaza), a przez to jaką pełni rolę w organizmie. Również toksyczność pierwiastków jest uzależniona od postaci chemicznej, np. chrom w postaci Cr^{3+} jest nietoksyczny, natomiast CrO_4^{2-} – toksyczny, organizmy morskie mogą przekształcić nieorganiczne związki arsenu w mniej szkodliwe postaci organiczne (arsenocholinę lub arsenobetainę). Identyfikacją i oznaczaniem ilościowym poszczególnych form chemicznych danego pierwiastka zajmuje się analiza specjacyjna. Jednym z głów-

nych zadań analizy specjacyjnej w próbkach biologicznych, jest określenie, w jakich formach chemicznych występują pierwiastki o istotnych funkcjach biologicznych, zwłaszcza z jakimi białkami łączy się dany pierwiastek. Pozwala to na określanie metabolizmu pierwiastków w organizmach oraz ich aktywności biologicznej. Badanie specjacji wymaga zastosowania selektywnych technik rozdzielania mieszaniny białek połączonych z najczulszymi technikami detekcji, pozwalającymi nie tylko na identyfikację danego białka, ale także określenie jaki pierwiastek jest jego składnikiem. Do rozdzielania mieszaniny białek stosuje się techniki elektroforetyczne lub chromatograficzne. Do identyfikacji białek wykorzystuje się głównie spektrometrię mas. Poznanie struktur białkowych umożliwiają techniki krystalograficzne oraz spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego, natomiast do identyfikacji i oznaczania związanych z białkami pierwiastków aktywnych biologicznie stosuje się najczęściej spektrometrię mas sprzężoną z chromatografią ciecząową [4].

PODSUMOWANIE

Pierwiastki śladowe – selen, miedź, cynk, mangan oraz żelazo pełnią niezbędne funkcje we właściwym funkcjonowaniu organizmu. Odgrywają ogromną rolę w walce ze stresem oksydacyjnym jako składniki elementów obrony enzymatycznej. Homeostaza tych biopierwiastków warunkuje prawidłową aktywność enzymów antyoksydacyjnych, dlatego bardzo ważne jest ich ściśle określone stężenie w organizmie.

PIŚMIENICTWO

- [1] Adamska-Węgrzyn E., Schaeffer E., Laudańska-Łagodzińska M.: Zaburzenia psychiczne w przebiegu choroby Wilsona: opis dwóch przypadków. *Post. Psychiatr. Neurol.*, 2000; 9: 15-23
- [2] Arredondo M., Núñez M.T.: Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.*, 2005; 26: 313-327
- [3] Artym J.: Udział laktoferyny w gospodarce żelazem w organizmie. Część I. Wpływ laktoferyny na wchłanianie, transport i magazynowanie

żelaza. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 599-612

- [4] Barałkiewicz D., Bulska E.: Specjacja chemiczna – problemy i możliwości, red.: Barałkiewicz D., Bulska E., wyd. Malamut, Warszawa 2009

- [5] Behne D., Weiss-Nowak C., Kalcklösch M., Westphal C., Gessner H., Kyriakopoulos A.: Application of nuclear analytical methods in the investigation and identification of new selenoproteins. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1994; 43-45: 287-297

- [6] Bielański A.: *Chemia nieorganiczna, cz.3*, wyd. PWN, Warszawa 1994
- [7] Boldt D.H.: New perspectives on iron: an introduction. *Am. J. Med. Sci.*, 1999; 318: 207-212
- [8] Borella P., Bargellini A., Caselgrandi E., Menditto A., Patriarca M., Taylor A., Vivoli G.: Selenium determination in biological matrices. *Microchem. J.*, 1998; 58: 325-336
- [9] Branco R.J.F., Fernandes P.A., Ramos M.J.: Cu, Zn Superoxide dismutase: distorted active site binds substrate without significant energetic cost. *Theoretical Chemistry Accounts*, 2006; 115: 27-31
- [10] Bulska E., Wysocka I.: Selen – własności, historia. W: *Selen-pierwiastek ważny dla zdrowia, fascynujący dla badacza*, red.: M. Wierzbicka, E. Bulska, K. Pyrżyńska, I. Wysocka, B. A. Zachara, wyd. Malamut, Warszawa 2007, 19-24
- [11] Carter P.: Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal. Biochem.*, 1971; 40: 450-458
- [12] Cheng K.L.: Determination of traces of selenium 3,3'-diaminobenzidine as selenium(IV) organic reagent. *Anal. Chem.*, 1956; 28: 1738-1742
- [13] Ciba J., Trojanowska J., Zolotajkin M.: *Mała encyklopedia pierwiastków*. Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa 1996
- [14] Daraga A., Szymańska J.A.: Selen i jego wybrane związki stosowane w formach farmaceutycznych i kosmetologicznych. *Pol. J. Cosmetol.*, 2003; 6: 26-34
- [15] Deshpande J.D., Joshi M.M., Giri P.A.: Zinc: The trace element of major importance in human nutrition and health. *Int. J. Med. Sci. Public Health.*, 2013; 2: 1-6
- [16] Downard A.J., Hart J.B., Powell K.J., Xu S.: Amperometric techniques in flow-injection analysis: determination of magnesium in sera and natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 1992; 269: 41-48
- [17] Dröge F.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 2002; 82: 47-95
- [18] Ducros V., Favier A.: Selenium metabolism. *EMC Endocrinol. Nutr.*, 2004; 1: 19-28
- [19] Faa G., Nurchi V.M., Ravarino A., Fanni D., Nemolato S., Gerosa C., Van Eyken P., Geboes K.: Zinc in gastrointestinal and liver disease. *Coord. Chem. Rev.*, 2008; 252: 1257-1269
- [20] Fairweather-Tait S.J., Collings R., Hurst R.: Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010; 91: 1484S-1491S
- [21] Fang Y.Z., Yang S., Wu G.: Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 2002; 18: 872-879
- [22] Floriańczyk B., Karska M.: Wpływ manganu na metabolizm. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 1998; 7: 207-211
- [23] Gacko M., Worowska A., Karwowska A., Łapiński R.: Zewnątrzkomórkowa dysmutaza nadadtlenkowa ściany naczyń krwionośnych. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2006; 15: 925-932
- [24] Gałęcka E., Mrowica M., Malinowska K., Gałęcki P.: Wybrane substancje nieenzymatyczne uczestniczące w procesie obrony przed nadmiernym wytwarzaniem wolnych rodników. *Pol. Merk. Lek.*, 2008; 25: 269-272
- [25] Gapys B., Raszeja-Specht A., Bielarczyk H.: Rola cynku w procesach fizjologicznych i patofizjologicznych organizmu. *Diagn. Lab.*, 2014; 50: 45-52
- [26] Giovannini C., Filesi C., D'Archivio M., Scazzocchio B., Santangelo C., Masella R.: Polyphenols and endogenous antioxidant defenses: effects on glutathione and glutathione related enzymes. *Ann. Ist. Super Sanita*, 2006; 42: 336-347
- [27] Gowin E., Horst-Sikorska W.: Żelazne zapasy – komu w XXI wieku grozi niedobór żelaza? *Farm. Współcz.*, 2010; 3: 139-146
- [28] Guz J., Dziamian T., Szpila A.: Czy witaminy antyoksydacyjne mają wpływ na proces karcynogenezy? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 185-198
- [29] Halliwell B.: Oxidative stress and neurodegradation: where are we now? *J. Neurochem.*, 2006; 97: 1634-1658
- [30] Halliwell B., Gutteridge J.: *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, New York 2007
- [31] Hannah A.C., Narendhirakannan R.T.: Oxidative stress – a hallmark of human disease. *Asian J. Biochem. Pharm. Res.*, 2012; 2: 1-10
- [32] Hartikainen H.: Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2005; 18: 309-318
- [33] Holben D.H., Smith A.M.: The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, 1999; 99: 836-843
- [34] Imlay K.R., Imlay J.A.: Cloning and analysis of sodC, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 2564-2571
- [35] Janicka A., Szymańska-Pasternak J., Bober J.: Polimorfizm genów obrony antyoksydacyjnej a ryzyko rozwoju raka. *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie*, 2013; 59: 18-28
- [36] Jarosz M., Bułhak-Jachymczyk B.: *Normy żywienia człowieka. Podstawy prewencji otyłości i chorób niezakaźnych*. Wyd. PZWL, Warszawa 2008
- [37] Jensen R.E., Rflaum R.T.: Fluorometric determination of zinc. *Anal. Chem.*, 1966; 38: 1268-1269
- [38] Jędrzejewski W., Skrzypek S.: The use of calmagite in the differential pulse polarographic determination of magnesium. *Chem. Anal.*, 1993; 38: 95-102
- [39] Karpińska A., Gromadzka G.: Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne – znaczenie w procesie neurodegradacji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 43-53
- [40] Kocygıt A., Erel O., Gur S.: Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidant enzyme activities. *Clin. Biochem.*, 2001; 34: 629-633
- [41] Kolditz L.: *Chemia nieorganiczna, cz. 2*. Wyd. PWN, Warszawa 1994
- [42] Kryczyk J., Zagrodzki P.: Selen w chorobie Gravesa Basedowa. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 491-498
- [43] Krystek J., Kobyłeczka J., Ptaszyński B.: Spectrophotometric determination of zinc with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and cetyltrimethylammonium bromide in insulin. *Chem. Anal.*, 1993; 38: 607-612
- [44] Krzeptowski W., Pierzchała O., Lenartewicz M.: Metabolizm miedzi oraz charakterystyka dziedzicznych zespołów chorobowych, na tle niedoboru miedzi, spowodowanych zaburzeniami aktywności białka ATP7A. *Kosmos*, 2014; 63: 395-413
- [45] Kulbacka J., Saczko J., Chwiłkowska A.: Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek. *Pol. Merk. Lek.*, 2009; 27: 44-47
- [46] Kupczyk D., Rybka J., Kędziora-Kornatowska K., Kędziora J.: Melatonina a stres oksydacyjny u chorych na cukrzycę typu 2 w wieku podeszłym. *Pol. Merk. Lek.*, 2010; 28: 407-409
- [47] Liska S.K., Kerkay J., Pearson K.H.: Determination of zinc and copper in urine using Zeeman effect flame atomic absorption spectroscopy. *Clin. Chim. Acta*, 1985; 151: 231-236
- [48] Maliheh B.T., Shamsa S., Shams S., Mohsen M.F.: Spectrophotometric determination of copper in serum using 6-(2-naphthyl)-2,3-dihydro-1,2,4-triazine-3-thione. *Asian J. Chem.*, 2010; 22: 21-26
- [49] Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins III J.B.: Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2003; 17: 24-38

- [50] Marnett L.J., Riggins J.N., West J.D.: Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reaction with DNA and protein. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 583-593
- [51] Massadeh A., Gharibeh A., Omari K., Al-Momani I., Alomary A., Tumah H., Hayajneh W.: Simultaneous determination of Cd, Pb, Cu, Zn, and Se in human blood of Jordanian smokers by ICP-OES. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2010; 133: 1-11
- [52] Maywald M., Rink L.: Zinc homeostasis and immunosenescence. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2015; 29: 24-30
- [53] Mehdi Y., Hornick J.L., Istasse L., Dufresne I.: Selenium in the environment. metabolism and involvement in body functions. *Mol. ecules*, 2013; 18: 3292-3311
- [54] Mestek O., Suchánek M., Vodičková Z., Zemanová B., Zima T.: Comparison of the suitability of various atomic spectroscopic techniques for the determination of selenium in human whole blood. *J. Anal. At. Spectr.*, 1997; 12: 85-89
- [55] Miniuk K., Moniuszko-Jakoniuk J., Kulikowska E.: Biodostępność oraz stany chorobowe przy niedoborze miedzi. *Pol. Tyg. Lek.*, 1991; 46: 476-478
- [56] Naskalski J.W., Bartosz G.: Oxidative modifications of protein structures. *Adv. Clin. Chem.*, 2000; 35: 161-253
- [57] Nogowska M., Jelińska A., Muszalska I., Stanisz B.: Funkcje biologiczne makro – i mikroelementów. *Farm. Polska*, 2000; 56: 995-1003
- [58] Osredkar J., Sustar N.: Copper and zinc. Biological role and significance of copper/zinc imbalance. *Clinic. Toxicol.*, 2011; 3: 2-18
- [59] Papp L.V., Holmgren A., Khanna K.K.: Selenium and selenoproteins in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010; 12: 793-795
- [60] Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F.: Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta*, 2003; 333: 19-39
- [61] Plum L.M., Rink L., Haase H.: The essential toxin: Impact of zinc on human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2010; 7: 1342-1365
- [62] Porta J., Vahedi-Faridi A., Borgstahl G.E.: Structural analysis of peroxide-soaked MnSOD crystals reveals side-on binding of peroxide to active-site manganese. *J. Mol. Biol.*, 2010; 399: 377-384
- [63] Prasad A.S.: Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2014; 28: 357-363
- [64] Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M.: Funkcje biologiczne pierwiastków i ich związków. II Selen, seleniany, związki selenoorganiczne. *Pol. Merk. Lek.*, 2009; 27: 249-252
- [65] Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M.: Funkcje biologiczne wybranych pierwiastków. III. Cynk – składnik i aktywny enzymów. *Pol. Merk. Lek.*, 2009; 27: 419-422
- [66] Puzanowska-Tarasiewicz H., Starczewska B., Kuźmicka L.: Reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008; 41: 1007-1015
- [67] Radwańska-Wala B., Buszman E., Druźba D.: Udział reaktywnych form tlenu w patogenezie chorób ośrodkowego układu nerwowego. *Wiad. Lek.*, 2008; 61: 67-73
- [68] Rakesh K., Tejinder P.: Stripping voltammetric determination of zinc, cadmium, lead and copper in blood samples of children aged between 3 months and 6 years. *J. Health Allied Scs.*, 2005; 4: 1-8
- [69] Reiter R.J., Tan D.X., Mayo J.C., Sainz R.M., Leon J., Czarnocki Z.: Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanism and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim. Pol.*, 2003; 50: 1129-1146
- [70] Reyes J.G.: Zinc transport in mammalian cells. *Am. J. Physiol.* 1996; 270: C401-C410
- [71] Riverbend Down Syndrome Association. <http://www.riverbendds.org/index.htm> (11.12.2016)
- [72] Rodushkin I., Ödman F., Olofsson R., Axelsson M.D.: Determination of 60 elements in whole blood by sector-field inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000; 15: 937-944
- [73] Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B.: Hafeman D.G., Hoekstra W.G.: Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 1973; 179: 588-590
- [74] Skrzycki M., Czacot H.: Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) – structure, properties and functions. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 301-311
- [75] Starek A.: Mangan i jego związki nieorganiczne. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. *Podst. Met. Oceny Środ. Przyr.*, 2012; 1: 27-58
- [76] Ścibior-Bentkowska D., Czacot H.: Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 58-72
- [77] Tainer J.A., Arvai A.S., Barondeau D.P., Brudler R., Chapados B.R., Craig L., Divita G., Fan L., Hitomi C., Hitomi K., Huffman J.L., Perry J.J., Shin D.S., Sundheim O., Tubbs J.L., Wood T.I., Williams R.S., Yamagata A.: Macromolecular machines as master keys for genome integrity, the cell cycle, control of reactive oxygen species, and pathogenesis. <https://www.scripps.edu/news/scientificreports/sk2005/sk05stainer.html> (11.12.2016)
- [78] Tian X., Diaz F.J.: Zinc depletion causes multiple defects in ovarian function during the periovulatory period in mice. *Endocrinology*, 2012; 153: 873-886
- [79] Treble R.G., Thompson T.S., Lynch H.R.: Determination of copper, manganese and zinc in human liver. *Biometals*, 1998; 11: 49-53
- [80] UniProt. <http://www.uniprot.org/> (11.12.2016)
- [81] Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007; 39: 44-84
- [82] Wang J., Pantopolous K.: Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.*, 2011; 434: 365-381
- [83] Wielkoszczyński T., Zawadzki M., Lebek-Ordon A., Olek J., Korzonek-Szlacheta I.: Enzymatyczne układy anytyoksydacyjne – właściwości, występowanie i rola biologiczna. *Diag. Lab.*, 2007; 43: 283-294
- [84] Wierzbička D., Gromadzka G.: Ceruloplazmina, hefajstyna i cyklopen – trzy multimiedziowe oksydazy uczestniczące w metabolizmie żelaza u człowieka. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 912-924
- [85] Wierzbička M., Bułska E., Pырzyńska K., Wysocka I., Zachara B.A.: Selen pierwiastek ważny dla zdrowia, fascynujący dla badacza, Wyd. Malamut, Warszawa 2007
- [86] Yari H., Mohseni M., Vardi R., Alizadeh A.M., Mazloomzadeh S.: Copper, lead, zinc and cadmium levels in serum of prostate cancer patients by polarography in Iran. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2015; 7: 403-408
- [87] Zabłocka A., Janusz M.: Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 118-124
- [88] Zagrodzki P., Łaszczuk P.: Selen, a choroby układu sercowo-naczyniowego – wybrane zagadnienia. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 624-631
- [89] Zdrojewicz Z., Wiśniewska A.: Rola cynku w seksualności mężczyzny. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2005; 14: 1295-1300
- [90] Zhang S., Zhou Z., Fu J.: Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. *Environ. Res.*, 2003; 93: 149-157
- [91] Ziemiański Ś., Bułhak-Jachymczyk B., Budzyńska-Topolowska J.: Normy żywienia dla ludności w Polsce. *Nowa Med.*, 1998; 4: 1-27
- [92] Zwolak I., Zaporowska H.: Rola selenu oraz wybranych Se-białek w organizmie człowieka, *Annales UMCS Lublin-Polonia*, 2005; 60, supl. 16: 457-460
- [93] Żbikowska H.M.: Metabolizm selenu w komórce i organizmie człowieka. *Postępy Biol. Kom.*, 1997; 24: 303-313

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.