Aktivnost crijevne alkalne fosfataze u prasadi hranjene različitim izvorima selena

Drašner, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:634678

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Drašner, apsolvent

Diplomski studij, Specijalna zootehnika

AKTIVNOST CRIJEVNE ALKALNE FOSFATAZE U PRASADI HRANJENE RAZLIČITIM IZVORIMA SELENA

Diplomski rad

Osijek, 2018

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Drašner, apsolvent

Diplomski studij, Specijalna zootehnika

AKTIVNOST CRIJEVNE ALKALNE FOSFATAZE U PRASADI HRANJENE RAZLIČITIM IZVORIMA SELENA

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Marcela Šperanda, predsjednica
2. doc. dr. sc. Mislav Đidara, mentor
3. prof. dr. sc. Matija Domaćinović, član

Osijek, 2018

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. ALKALNA FOSFATAZA 3
2.1. Usporedba alkalne fosfataze sisavaca i bakterija 3
2.2. Kinetička svojstva alkalne fosfataze sisavaca 7
3. CRIJEVNA ALKALNA FOSFATAZA 9
3.1. Biosinteza crijevne alkalne fosfataze 9
3.2. Uloge crijevne alkalne fosfataze 11
3.2.1. Lipopolisaharidi: građa i defosforilacija 12
3.3. Aktivnost crijevne alkalne fosfataze kod prasadi prilikom odbića 18
4. SELEN 21
4.1. Metabolizam selena 21
4.2. Uloge selena 22
4.3. Određivanje selena u organizmu 23
4.4. Selen, vitamin E i imunost 24
5. MATERIJALI I METODE 27
5.1. Uzorkovanje tkiva i priprema pufera 29
5.2. Analiziranje uzoraka 29
5.3. Statistička obrada rezultata 32
6. REZULTATI 33
7. RASPRAVA 35
8. ZAKLJUČAK 38
9. LITERATURA 39
10. SAŽETAK 43
11. SUMMARY 44
12. POPIS TABLICA 45

13. POPIS SLIKA 46

14. POPIS GRAFIKONA..... 47

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....48

BASIC DOCUMENTATION CARD.....49

POPIS KRATICA

AAD–*Antibiotic-associated diarrhoea (engl.)*–Dijareja povezana s antibioticima

ALP–*Alkaline phosphatase (engl.)*–Alkalna fosfataza

CDAD–*Clostridium difficile associated disease (engl.)*–Bolesti povezane s *Clostridium difficle* bakterijom

CpG–*Unmethylated cytosine–guanosine dinucleotides (engl.)*–Nemetilirani citozin–gvanozin dinukleotidi

ECAP–*Escherichia coli alkaline phosphatase (engl.)*–Alkalna fosfataza *Escherichie coli*

GCAP–*Germ–cell alkaline phosphatase (engl.)*–Alkalna fosfataze germinativnih stanica

GPI–*Glycosyl–phosphatidylinositol (engl.)*–Glikozil–fosfatidilinozitol

GPx–*Glutathione peroxidase (engl.)*–Glutation peroksidaza

GSH–*Glutathione (engl.)*–Glutation

Hep–*α–glycero–D–manno–hepatose (engl.)*–α–glicero–D–mano–hepatoza

IAP–*Intestinal alkaline phosphatase (engl.)*–Crijevna alkalna fosfataza

IBD–*Inflammatory bowel disease (engl.)*–Upalna bolest crijeva

Kdo–*3–deoxy–D–manno–oct–2–oculosonic acid (engl.)* – 3–deoksi–D–mano–okta–2–okulosonična kiselina

LPS–*Lipopolysaccharides (engl.)*–Lipopolisaharidi

MDA–*Malondialdehyde (engl.)*–Malondialdehid

MPLA–*Monophosphoryl lipid A (engl.)*–Monofosforil lipid A

MyD88–*Myeloid differentiating factor 88 (engl.)*–Faktor diferencijacije mijeloida 88

NaBu–*Sodium butyrate (engl.)*–Natrijev butirat

OH–SeMet–*Hydroxy–selenomethionine (engl.)*–hidroksi–selenometionin

PLAP–*Placenta alkaline phosphatase (engl.)*–Placentarna alkalna fosfataza

pNPP–*Para–nitrophenylphosphate (engl.)*–Para–nitrofenilfosfat

ROS–*Reactive Oxygen Species (engl.)*–Reaktivni oblici kisika

SeCys–*Selenocysteine (engl.)*–Selenocistein

SeMet–*Selenomethionine (engl.)*–Selenometionin

SOD–*Superoxide dismutase (engl.)*–Superoksid dismutaza

TAOC–*Total antioxidant capacity (engl.)*–Ukupni antioksidativni kapacitet

TNAP–*Tissue non–specific alkaline phosphatase (engl.)*–Tkivno nespecifična alkalna fosfataza

TNF–α–*Tumour necrosis factor–α (engl.)*–Čimbenik nekroze tumora–α

UC–*Ulcerative colitis (engl.)*–Ulcerativni kolitis

1. UVOD

Alkalna fosfataza je enzim koji egzistira u četiri izoenzima, obavlja mnoštvo funkcija i zahvaljujući tome može se pronaći u gotovo svim tkivima. Alkalna fosfataza sisavaca posjeduje 4 ključne karakteristike koje ih razlikuju od bakterijske alkalne fosfataze i to su: specifično okruživanje aktivnih mjesta hidofobnim, hidrofilnim ili alifatskim aminokiselinskim ostacima, dugački N–terminalni α–heliks, granična fleksibilna regija odnosno „krunasta regija“ i četvrto mjesto za vezanje metalnog iona.

Crijevnu alkalnu fosfatazu nalazimo na sluznici svih dijelova probavne cijevi, ali se njezina zastupljenost značajno razlikuje. Najzastupljenija je u proksimalnom dijelu tankog crijeva, a njena aktivnost u želucu nije moguća zbog izrazito kisele pH vrijednosti. Uloge crijevne alkalne fosfataze su brojne, primarno obavlja funkciju defosforilacije toksičnih lipopolisaharida, nemetiliranih citozin–gvanozin dinukleotida te flagelina. Ostale uloge su zaštita od infekcija i razvoja akutni i kroničnih bolesti, poticanje lučenja bikarbonata i održavanje alkalne pH vrijednosti u lumenu crijeva, probava organskih fosfata i masti, sprječavanje prodora bakterija u krvotok te brojne druge. Lipopolisaharidi su građevna jedinica vanjske membrane Gram–negativnih bakterija i sastavljeni su od lipida A, ugljikohidratne osnove i ponavljajućih jedinica oligosaharida koje se nazivaju O–antigen. Ugljikohidratna osnova i lipid A imaju strukturnu ulogu, a toksična svojstva pripisuju se lipidu A. Invadiranjem tkiva ili proizvodnjom toksina bakterijski lipopolisaharidi izazivaju niz različitih bolesti kod svih kategorija svinja a pogotovo su osjetljiva novorođena prasad i prasad prilikom odbića.

Selen je mikroelement koji u organizmu obavlja mnoštvo funkcija, primarna funkcija je antioksidacija reaktivnih oblika kisika pomoću 25 vrsta selenoproteina od kojih je najpoznatija glutation peroksidaza. U kombinaciji s vitaminom E, selen poboljšava reproduktivnu sposobnost mužjaka i koncepcijsku sposobnost ženki, djeluje antikancerogeno i detoksifikacijski, poboljšava zdravlje vimena te osnažuje imuni sustav. Podrijetlo selena u hrani može biti organsko (selenometionin, selenocistein) ili anorgansko (selenit, selenat) no izvrstan izvor selenometionina su selenom obogaćeni kvasci koji omogućuju odličnu iskoristivost organskog selena u organizmu.

Cilj rada bio je utvrditi optimalnu pH vrijednost za utvrđivanje aktivnosti crijevne alkalne fosfataze. Također cilj je bio i utvrditi aktivnost crijevne alkalne fosfataze u sluznici duodenuma i ileuma odbijene prasadi hranjene različitim izvorima selena.

2. ALKALNA FOSFATAZA

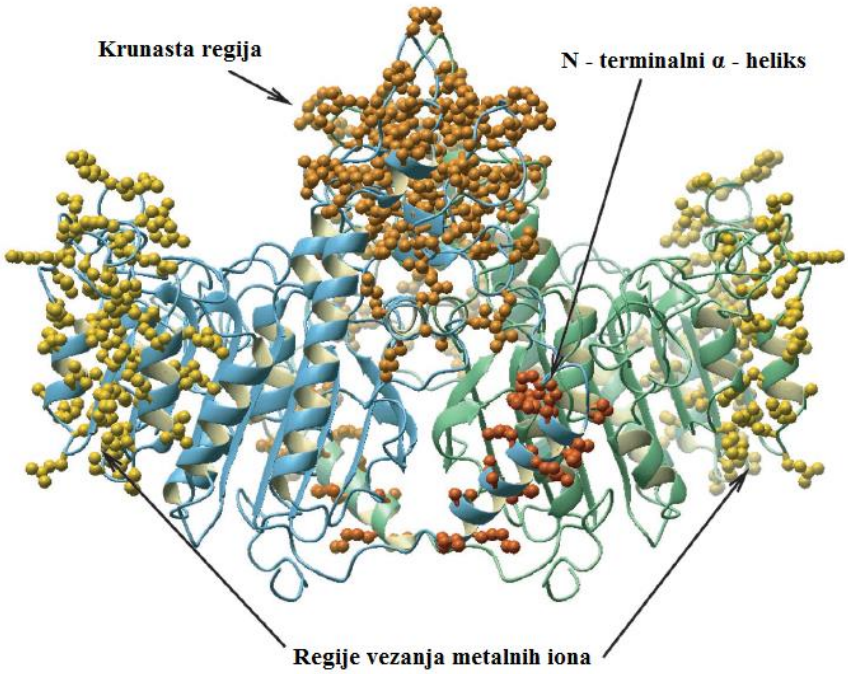
Alkalna fosfataza (ALP) je homodimerni metaloenzim, svaki monomer građen je od pet cisteinskih ostataka i tri metalna iona, dva Zn^{2+} i jednog Mg^{2+} koji su esencijalni za njegov rad. Organizam čovjeka i većine sisavaca sadrži četiri vrste izoenzima alkalne fosfataze: tkivno nespecifičnu alkalnu fosfatazu (TNAP, engl. *Tissue Non–Specific Alkaline Phosphatase*) koju uglavnom nalazimo u jetri, kostima i bubrezima i tkivo specifične alkalne fosfataze odnosno, placentarnu alkalnu fosfatazu (PLAP, engl. *Placenta Alkaline Phosphatase*) te alkalnu fosfatazu germinativnih stanica (GCAP, engl. *Germ Cell Alkaline Phosphatase*) i crijevnu alkalnu fosfatazu (IAP, engl. *Intestinal Alkaline Phosphatase*). Geni koji kodiraju humani TNAP smješteni su na kromosomu 1, a geni za ostale izoenzime smješteni su na kromosomu 2 (Lallès, 2010., Yang, 2013.).

Alkalna fosfataza ubraja se u superporodicu enzima zbog širokog spektra funkcija koje obavlja u organizmu, sudjeluje u mineralizaciji kosti, implantaciji embrija, ranoj embriogenezi, pomaže radu testisa, bubrega i jetre, apsorpciji masti, defosforilaciji, protuupalnim procesima u probavnom traktu i regulaciji pH vrijednosti u crijevima (Millán, 2006a.).

2.1. Usporedba alkalne fosfataze sisavaca i bakterija

Le Du i sur. (2001.) u svome radu opisuju razlike između alkalne fosfataze u bakteriji *Escherichia coli* (ECAP) i placentarne alkalne fosfataze sisavaca. Otkrićem trodimenzionalne strukture placentarne alkalne fosfataze sisavaca uočena je znatno kompleksnija struktura enzima kod sisavaca. Svaki monomer sadrži 479 ostataka, četiri metalna iona, jedan fosfatni ion i 603 molekule vode. Monomeri su međusobno povezani dvostrukom kristalografskom osi. Površina enzima kod sisavaca i *E. coli* dijeli samo 8% zajedničkih ostataka. U aktivnom mjestu enzima nalaze se samo ostaci esencijalni za aktivnost, npr. katalitički serin i tri mjesta za metalne ione i njihove ligande. M1 mjesto sadrži prvi Zn^{2+} (Zn1), M2 mjesto sadrži drugi Zn^{2+} (Zn2) i M3 mjesto sadrži Mg^{2+}. Ostaci koji okružuju vezna mjesta za metalne ione uglavnom se razlikuju za svaki izoenzim, gornji dio aktivnog mjesta sadrži mnogo bazičnih ostataka, a donji dio sadrži uglavnom alifatske ili hidrofobne ostatke. Od hidrofobnih ostataka koji okružuju aktivno mjesto, posebno je značajan Tyr–367 koji pripada drugom monomeru. Ovo specifično okruživanje

aktivnog mjesta karakteristično je za alkalnu fosfatazu sisavaca i uvjetuje kemijske osobine enzima. Polovica površine enzima odgovara trima jasno definiranim regijama čiji slijedovi u velikoj mjeri variraju unutar humanih alkalnih fosfataza i ne nalaze se na enzimima vrsta koje nisu sisavci. Te regije su dugački N–terminalni α–heliks, granična fleksibilna petlja poznata kao „krunasta regija“ i četvrto mjesto za vezanje metalnog iona (M4). Otkriće trodimenzijske strukture PLAP omogućilo je modeliranje humanih izoenzima GCAP, IAP i TNAP jer su sve novo otkrivene osobine također konzervirane u humanim izoenzimima.



Slika 1. Struktura PLAP

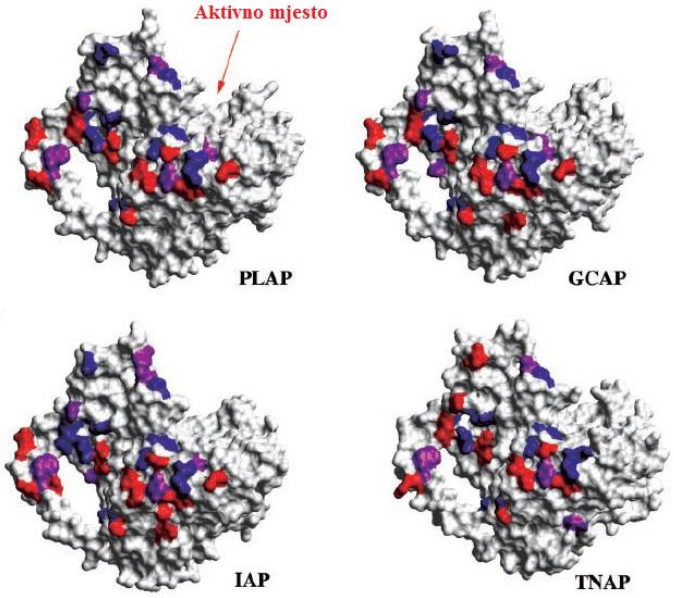
Cjelokupna struktura prikazana je u obliku vrpce s pripadajućim bočnim lancima kojeg čine ostaci od tri dodatne regije u obliku lopte i štapa. Monomer 1 prikazan je svijetlo zelenom bojom, monomer 2 prikazan je plavom bojom, N–terminalni α–heliks prikazan je crvenom bojom, krunasta regija prikazana je narančastom bojom, a regije vezanja metalnih iona prikazane su žutom bojom.

Izvor: Le Du i sur. (2001.)

N–terminalni α–heliks je prvi od tri dodatna sekundarna strukturna elementa koja posjeduju samo alkalne fosfataze sisavaca. Čine ga aminokiselinski ostaci 9–25 formirani u obliku ruke koja obuhvaća susjednu monomernu podjedinicu, α–heliks i β–nabranu ploču u vrlo različitim regijama (ostaci 208 – 280) te različitu organizaciju malih β–nabranih ploča u regiji 365–430. α–heliks koji sadrži ostatke od 10 do 25 predstavlja strukturnu komponentu aktivnog mjesta nužnu za izvršavanje intramolekulske tranzicije tijekom enzimatske katalize. Krunasta regija formira se umetanjem segmenata od 60 ostataka od svakog monomera (ostaci 366 – 430). Sadrži dvije male β–nabrane ploče koje su u međusobnoj interakciji. Svaka ploča sastoji se od tri paralelne niti okružene sa šest velikih fleksibilnih petlji koje sadrže kratki α–heliks. Krunasta regija pokazuje najmanji stupanj konzerviranja između sisavaca. Svojstva specifična izoenzimima kao što u nekompetetivna inhibicija, toplinska stabilnost i alosterička regulacija pripisuju se ostatku 429 koji se nalazi u ovoj regiji. Dodatno četvrto mjesto za vezanje metalnog iona (M4 mjesto) ne posjeduje alkalna fosfataza *E. coli*. Vezivno mjesto sastoji se od 76 ostataka (209–285) savijenih u dvije β–niti okružene α–heliksom, glikozilatnog mjesta na Asn–249 stabiliziranog u interakciji s Trp–248 i dodatnog metalnog iona. Visina i kristalizacijsko stanje vezivnog mjesta odgovara metalu koji ima oko 10 elektrona i lako bi ga mogao zauzeti Mg^{2+}, međutim, četvrto vezivno mjesto koordinirano je karboksilatima iz Glu–216, Glu–270 i Asp–285, karbonilom iz Phe–269 te molekulom vode pa postoji mogućnost da vezivno mjesto zauzme Ca^{2+}. Struktura ovog mjesta očuvana je u humanim i mišjim alkalnim fosfatazama i predstavlja potencijalnu novu osobinu zajedničku svim sisavcima iako njegova značajnost još nije razjašnjena (Le Du i sur., 2001., Millán, 2006a., Millán, 2006b.).

Alkalna fosfataza sisavaca i ECAP razlikuje se u još jednoj značajnoj strukturi koja se naziva Y367 (Tyr–367) a proteže se preko oba monomera. Prvi monomer sadrži dio podjedinice Y367 u blizini fosfatne skupine i His–432 koji kelira cinkov atom na Zn1 aktivnom mjestu drugog monomera. Hidroksilna skupina podjedinice Y367 formira vodikovu vezu s peptidnom skupinom histidina 432 koji je direktni ligand Zn^{2+} na Zn1 aktivnom mjestu. Prema Kozlenkov i sur. (2004.), podjedinica je strukturno slična ostatku 429 te posjeduje ključnu ulogu u određivanju svojstava nekompetetivne inhibicije i alosteričke regulacije kod sisavaca.

Bitna razlika između alkalne fosfataze sisavaca i bakterija je u broju cisteinskih ostataka. Svi izoenzimi sisavaca sadrže pet cisteinskih ostataka dok se kod ECAP nalaze samo četiri ostatka. Niti jedan od ostataka nije homologan ostatku u ECAP. Cisteinski ostaci pronađeni u PLAP su Cys101, Cys121, Cys183, Cys467, Cys474 i međusobno tvore dvije disulfidne veze između Cys121–Cys183 te Cys467–Cys474. Cys101 ostaje slobodan (Millán, 2006a., Millán, 2006b.). Kozlenkov i sur. (2002.) navode kako se u pokušaju zamijene cisteina serinom dogode značajne promjene na enzimu. Ometanjem disulfidne veze između Cys121–Cys183 u potpunosti se spriječava formiranje aktivnog enzima. Veza između Cys467–Cys474 ima mnogo manje značajnu ulogu pri formiranju enzima. Zamjena na Cys101 ne mijenja svojstva enzima. Prema Le Du i sur. (2001.) PLAP ima dva glikozilatna mjesta na Asn–122 i Asn–249, a stupnjevi njihove glikozilacije su varijabilni. Dva disulfidna mosta u enzimu sisavaca nalaze se na različitim mjestima usporedno s mjestima na enzimu *E. coli*. Jedan most blizu je prvog glikozilatnog mjesta i može oštetiti petlju koja nosi ugljikohidratni lanac. Drugi most smješten je u blizini Asp–481 gdje je vezan glikozil–fosfatidilinozitol (GPI) i može stabilizirati orijentaciju PLAP–a u odnosu na membranu.



Slika 2. Površina monomera svih izoenzima alkalne fosfataze. Ostaci uključeni u vodikovu vezu ili ionsku vezu preko bočnih lanaca obojeni su crveno. Ostaci uključeni u vodikovu vezu ili ionsku vezu preko glavnog lanca obojeni su plavo. Hidrofobni ostaci uključeni u međusobno slaganje ili kation–π interakcije obojeni su ljubičasto.

Izvor: Le Du i Millán (2002.)

2.2. Kinetička svojstva alkalne fosfataze sisavaca

Alosterička regulacija alkalne fosfataze u obliku u kojem su sva aktivna mjesta popunjena metalnim ionima bitno je svojstvo koje razlikuje enzim sisavaca i bakterija. Princip alosterije podrazumijeva da će vezanje supstrata u jednom aktivnom mjestu utjecati na drugo aktivno mjesto. Hoylaerts i sur. (1997.) u svom istraživanju otkrili su kako stabilnost i katalitička svojstva svakog monomera kontroliraju konformacijske promjene druge podjedinice alkalne fosfataze. Asn–84 smješten je na površini dimera i stvara vodikovu vezu s Asn–91 preko kojeg utječe na stabilnost katalitičkog serina. Ova interakcija utječe na alosteričke procese zbog povezanosti Asn–84 i procesa dimerizacije. Tyr–367 smješten je na ulazu u aktivno mjesto na drugom monomeru. Mreža kojom je Tyr–367 povezan s His–432, Zn1 aktivnim mjestom i fosfatnim ionim utječe na hidrolizu fosfoserilne skupine smanjujući reaktivnost Zn1 aktivnog mjesta. Dodatna stabilizacija Tyr–367 preko N–terminalnog α–heliksa utječe na enzimatsku aktivnost i alosteričku regulaciju. Mutacija Glu–429 odražava se na afinitet Zn1 aktivnog mjesta za PLAP. Glu–429 povezan je s His–30, Zn1 aktivnim mjestom i fosfatnom skupinom, a njihova povezanost također utječe na hidrolizu fosfoserilne skupine destabiliziranjem Zn1 aktivnog mjesta. Autori su utvrdili da su alkalne fosfataze sisavaca alosterički enzimi u kojima monomeri djeluju neovisno jedan o drugome kada su oba monomera potpuno ispunjena metalnim ionima. Najmanje promjene aminokiselinskih ostataka u blizini aktivnih mjesta mogu snažno utjecati na afinitet aktivnog mjesta prema Zn^{2+}.

Nekompetetivna inhibicija je drugo kinetičko svojstvo koje alkalne fosfataze sisavaca ne dijele s bakterijama. Princip nekompetetivne inhibicije nalaže da se inhibitor može vezati isključivo na kompleks enzim–supstrat, ne zauzima aktivno mjesto enzima, ali djeluje na smanjenje prometnog broja enzima i ne može se nadvladati povećanjem koncentracije supstrata. Nekompetetivni mehanizmi L–aminokiselina stereospecifično inhibiraju alkalnu fosfatazu. U slučaju PLAP, početni kompleks može biti standardni enzim–supstrat kompleks ili bilo koji intermedijarni kompleks. Prema Le Du i sur. (2001.) molekularni mehanizam inhibicije uključuje ostatke Arg–166 i Glu–429 što sugerira prisutnost hidrofobnog džepa u aktivnom mjestu enzima. Za PLAP posebno značajan i jedino njemu svojstven je Glu–429. U ostalim izoenzimima, na tom mjestu nalaze se drugi ostaci; IAP sadrži serin, GCAP sadrži glicin dok je u TNAP na tom mjestu ugrađen histidin. Glu–429 smješten je na ulazu u procjep koji vodi prema aktivnom mjestu i čini granicu „džepa“ koji se proteže od katalitičkog Ser–92 do fosfatnog produkta. Arg–166

također je smješten na rubu procjepa i okružen je Phe–107, Gln–108 i Tyr–367 iz drugog monomera. Selektivni inhibitor PLAP na mjestu ostatka Arg–166 je L–Phe, stabilizira se u hidrofobnom džepu pomoću karboksilne skupine arginina i amidne skupine glutamina. L–Leu inhibira Glu–429 u PLAP i Gly–429 u GCAP. Inhibicija L–Leu i L–Phe ne zahvaća histidinski ostatak u TNAP. Inhibicija L–Leu događa se isključivo tijekom katalitičkog procesa i snažno ovisi o pH vrijednosti, aktivnost je maksimalna pri pH = 10,5 i gotovo da je nema pri pH = 7,5. Aktivnost ovisna o pH vrijednosti u skladu je s protoniranom amino skupinom leucina kao inhibitora (Le Du i sur., 2001., Hoylaerts i sur., 1992., Kozlenkov i sur., 2004.).

3. CRIJEVNA ALKALNA FOSFATAZA

Crijevna alkakna fosfataza (IAP) stateški je pozicionirana kako bi posredovala u interakciji crijevnog sadržaja, mikropopulacije crijeva i samog domaćina. Njezina zastupljenost kroz probavni trakt znatno se razlikuje, a Lallès (2010.) navodi da je u želucu i debelom crijevu vrlo slabo zastupljena. Nasuprot tome, tanko crijevo bogato je alkalnom fosfatazom, posebice duodenum, a pad njene zastupljenosti nastupa već na početku jejunuma i nastavlja se dalje kroz ileum. Zastupljenost crijevne alkalne fosfataze obrnuto je proporcionalna zastupljenosti bakterijske mikroflore u probavnoj cijevi. Histološki gledano, količina i aktivnost IAP raste od kripte prema vrhu crijevne resice. Takva kvantitativna zastupljenost enzima opravdana s više aspekata, u proksimalnom dijelu tankog crijeva apsorbira se najviše hranjivih tvari, IAP smanjuje toksičan učinak patogene mikroflore, aktivnost enzima potiče izlučivanje bikarbonata koji neutraliziraju želučani sadržaj i povećavaju mu pH vrijednost kako bi se spriječila oštećenja crijevnog epitela.

3.1. Biosinteza crijevne alkalne fosfataze

Crijevna alkalna fosfataza enzim je četkastog poruba kojeg izlučuju enterociti. Enterociti su stanice koje grade do 90% epitela kripti i do 95% epitela crijevnih resica. Ekspresija IAP ovisna je o diferencijaciji endocita uzduž kritpa – resica osi i regulirana je pomoću nekoliko transkripcijskih faktora, tiroidnog hormona (T_3), hranjivih tvari i upalnih procesa (Lackeyram, 2012., Fan i sur., 2001.). Transkripcijski faktor cdx1 (engl. *caudal-associated homeobox transcriptional factor*) koji se veže na promotorsku regiju gena za IAP, hepatocit nuklearni faktor 4α, crijevno obogaćeni Kruppel faktor i cink–vežući protein–89 dio su transkripcijskog kompleksa na genu za IAP. Unutarstanična biosinteza odvija se na hrapavom endoplazamtskom retikulumu u obliku visokomanoznog polipeptida. Biosinteza je ograničena dosputnošću mRNA za crijevnu alkalnu fosfatazu, nutrijenata u lumenu crijeva i hormonskom regulacijom putem T_3 tiroidnog hormona. Za pravilnu biosintezu nužne su promjene koje uključuju posttranslacijsku glikozilaciju u Golgijevom aparatu, sortiranje za transport pomoću specifičnih vezikularnih nosača ili za vezanje na apikalnu membranu ili za degradaciju lizosomima ili ubikvitin proteosomima. IAP se većim dijelom nalazi kovalentno vezana na apikalnu membranu pomoću glikozil–

fosfatidilionzitola. Zrela IAP može se vezati za čestice nalik surfaktantu i izlučiti u laminu propriju, limfatične kapilare, serum ili lumen tankog crijeva (Lackeyram, 2012.).

Malo i sur. (2004.) navode kako T_3 tiroidni hormon ima ključnu ulogu u regulaciji homeostaze crijevnog epitela. Razina endogenog T_3 hormona naglo porasta u razdoblju neposredno prije odbića zbog brzog rasta probavnog sustava u cjelini, ali i promjene u odnosima enzima sisajuće prasadi i odbijene prasadi. Sisajuća prasad posjeduje više laktaze i β–galaktozidaze nego odrasle svinje zbog specifične hranidbe. Promjena režima hranidbe koja se događa tijekom odbića potiče crijeva na promjenu količine tih enzima pa tako dolazi do njihovog kvantitativnog smanjenja i kvantitativnog povećanja saharaze, maltaze i crijevne alkalne fosfataze. Prilikom odbića dolazi do hipoplazije odnosno skraćenja crijevnih resica i hiperplazije mukoze u crijevima. T_3 tiroidni hormon, odnosno njegovi receptori, utječu na ekspresiju i diferencijaciju enterocita i potiču lučenje enzima karakterističnih za odrasle jedinke.

Prema Fan i sur. (2001.) postoje četiri pristupa za proučavanje ekspresije ovisne o diferencijaciji enterocita *in vivo*: tehnika serijskog seciranja, kvantitativna citokemijska analiza, kvantitativna imunohistokemijska analiza i sekvencijalna izolacija stanica u kombinaciji s biokemijskom analizom. Prve tri metode kvantitativno su ograničene dostupnošću specifičnih antitijela, dok metoda sekvencijalne izolacije stanica u kombinaciji s biokemijskom analizom omogućava kinetičku analizu enzima. U svome istraživanju, Fan i sur. (2001) pokušali su razviti novu metodu izolacije epitelnih stanica uzduž kripta–resica osi u crijevima novorođene prasadi i kvantitativno odrediti aktivnost glavnih probavnih i apsorpcijskih enzima. U pokusu je korišteno 38 prasadi odbijenih u dobi od 7 dana. Svako prase individualno je smješteno u kavez s hranilicom i temperaturom reguliranom na 28 ˚C. Hranjeni su tri puta dnevno obrokom koji se sastojao od 25 % laktoze, 25 % proteina i 10 % masti. Prasad je zaklana u dobi između 14 i 18 dana i izolirani su uzorci crijevnih epitelnih stanica. Prva pokusna skupina brojala je 20 životinja. Njihovi uzorci korišteni su za mjerenje visine resica i dubine kripti te migracijske kinetike epitelnih stanica od proksimalnog prema distalnom dijelu crijeva. Druga pokusna skupina sastojala se od 10 životinja podijeljenih u dvije skupine. Uzorci su služili za određivanje valjane procedure izolacije epitelnih stanica uzduž kripta–resica osi ispitivanjem gradijenta distribucije staničnih markera kripti i resica. U svakoj skupini 2 praseta su zaklana u dobi od 14 dana, 2 u dobi od 16 dana i jedno u dobi 18 dana. Treća pokusna skupina sastojala se od 8 prasadi podijeljenih u dvije skupine, a njihovi uzorci

korišteni su za usporedbu gradijenta distribucije probavnih i apsorpcijskih enzima iz enterocita uzduž kripta–resica osi. U svakoj grupi, 2 praseta su zaklana u dobi od 14 dana, 2 u dobi od 16 dana i jedno u dobi 18 dana. Rezultati prve pokusne skupine pokazali su da je visina resica statistički značajno niža u proksimalnom dijelu tankog crijeva nego u distalnom dijelu. Proksimalni dio crijeva imao je dublje kripte za razliku od distalnog dijela. Veća dubina kripti i niža visina resica karakterizirala je proksimalni dio tankog crijeva u odnosu na distalni dio. Rezultati migracijske kinetike enterocita proksimalnog i distalnog dijela crijeva nisu se razlikovali. Autori rada zaključili su kako kombinacija migracijske kinetike enterocita i visine resica objašnjava životni vijek enterocita. Naime, enterociti u resicama proksimalnog dijela tankog crijeva imali su životni od 4,7 ± 0,4 dana dok su enterociti distalnog dijela tankog crijeva imali dvostruko duži životni vijek, točnije 10,2 ± 1,5 dana. Rezultati druge eksperimentalne skupine pokazali su nagli porast aktivnosti enzima markera (IAP, aminopeptidaza N, saharaza, laktaza) od kripte prema vrhu resice. Korištena metoda rada bila je sekvencijska izolacija stanica proširene crijevne vreće u kombinaciji s biokemijskom analizom. Rezultati treće eksperimentalne skupine pokazali su kako je ekspresija sva 4 enzima povećana od kripte prema vrhu resice u oba dijela tankog crijeva. Aminopeptidaza N i saharaza imale su linearnu krivulju porasta ekspresije za razliku od IAP i laktaze čije su krivulje rasta ekspresije bile znatno oštrije. Povećana ekspresija laktaze u skladu je s hranidbenim režimom novorođene prasadi.

3.2. Uloge crijevne alkalne fosfataze

Kompleksne interakcije crijevne alkalne fosfataze s prirodnom mikropopulacijom crijeva, crijevnim epitelom te crijevnim sadržajem rezultiraju brojnim pogodnostima za organizam ukoliko niti jedna komponenta kompleksa nije poremećena. Primarna uloga IAP je uklanjanje fosfatnih skupina tj. defosforilacija toksičnih mikrobnih liganada poput lipopolisaharida (LPS, engl. *lipopolysaccharides*) koje su sastavni dio Gram–negativnih bakterija, defosforilacija nemetiliranih citozin–gvanozin dinukleotida (CpG, engl. *unmethylated cytosine–guanosine dinucleotides*) koji su sastavni dio bakterijske DNA te flagelina, bakterijskog proteina koji se nalazi u flagelama (Bilski i sur., 2017., Lallès, 2014.). Osim defosforilacije, IAP pomaže pri zaštiti od sistemskih infekcija, zaštiti od razvoja sepse tijekom akutnih upala te zaštiti od kroničnih upalnih bolesti poput upalne bolesti crijeva (IBD, engl. *inflammatorybowel disease*), ulceroznog kolitisa (UC, engl.

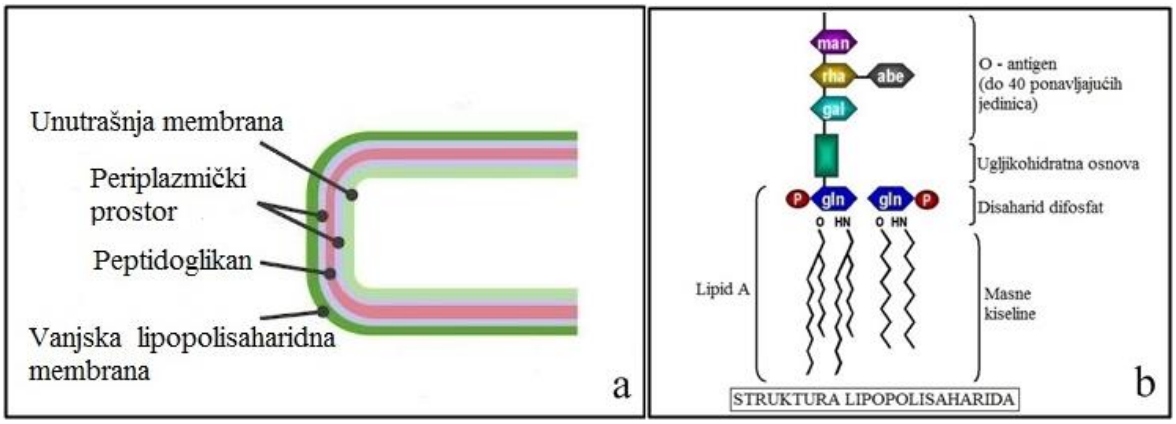
ulcerative colitis), dijareje povezane s antibioticima (AAD, engl. *antibiotic–associated diarrhoea*), bolesti povezane s *Clostridium difficile* (CDAD, engl. *Clostridium difficile associated disease*) te drugih metaboličkih bolesti poput gojaznosti, debljine i raka (Estaki i sur., 2014., Bilski i sur., 2017.). Ključna uloga IAP u održavanju homeostaze crijeva i organizma u cjelini vidljiva je kroz održavanje mukozne tolerancije na komenzalne bakterije i spriječavanje prodora bakterija iz lumena crijeva u mezenterijalne limfne čvorove (Lallès, 2014.). Ostali blagotvorni učinci crijevne alkalne fosfataze su održavanje alkalne pH vrijednosti u crijevima, probava organskih fosfata, apsorpcija masti (Estaki i sur., 2014., Malo i sur., 2010.), pojačavanje izlučivanja bikarbonata čija je uloga neutraliziranje kiselog želučanog sadržaja i stvaranje optimalnih pH vrijednosti za aktivnost IAP te zaštita sluznice crijeva od bakterijskih endotoksina (Lackeyram, 2012., Bilski i sur., 2017.), moduliranje apsorpcije intestinalnih dugolančanih masnih kiselina (LCFA, engl. *long–chain fatty acids*) (Bilski i sur. 2017., Lallès, 2014.) te spriječavanje prodora bakterija iz lumena crijeva u krvotok (Melo i sur., 2016a., Lallès, 2014.)

Defosforilacijom CpG onemogućuje se daljnje razmnožavanje bakterija, a defosforilacijom flagelina spriječava se njihova translokacija u krvotok gdje očituju svoja patogena i patološka svojstva (Bilski i sur., 2017.).

3.2.1. Lipopolisaharidi: građa i defosforilacija

Lipopolisaharidi čine vanjski sloj vanjske membrane kod gotovo svih Gram – negativnih bakterija i odgovorni su za endotoksična svojstva koja dolaze do izražaja kad se bakterije nastane i razmnože u organizmu. Osim vanjske membrane, takve bakterije imaju i dodatne elemente smještene u prostoru do citoplazme a to su: periplazmički prostor, peptidoglikan, ponovno periplazmički prostor i unutrašnja membrana. Molekula LPS može se podijeliti na tri funkcionalna dijela: lipid A, ugljikohidratna osnova i ponavljajuće jedinice O–antigena. Jedinice O–antigena građene su od najviše 40 ponavljajućih jedinica oligosaharida i usmjerene su prema vanjskoj okolini. Lipid A smješten je u vanjskoj strani vanjske membrane, posjeduje hidrofobna svojstva, održava integritet membrane i odgovoran je za endotoksična svojstva molekule. Ugljikohidratna osnova dodatno stabilizira i osnažuje strukturu vanjske membrane i nalazi se po cijeloj površini bakterije. O–antigeni također su smješteni po cijeloj površini bakterije. Lipopolisaharidi koji sadrže samo lipid A i ugljikohidratnu koru nazivaju se „hrapavi“ i često im je drugi naziv

lipooligosaharidi. Kompletnim lipopolisaharidom smatra se onaj koji sadrži i O–antigene i takvi se nazivaju „glatki“ lipopolisaharidi (Wang i Quinn, 2010a., Wang i Quinn, 2010b., Maldonado i sur., 2016.).



Slika 3. Stanični zid Gram–negativne bakterije (a). Struktura lipopolisaharida (b).

Izvor: https://microbeonline.com/lipopolysaccharide-lps-of-gram-negative-bacteria-characteristics-and-functions/

Poznavanje puteva biosinteze LPS–a, prema Wang i Quinn–u (2010a., 2010b.), ključno je za kontrolirano razmnožavanje Gram–negativnih bakterija i liječenje septikemijskog šoka koji je samo jedna od posljedica nekontroliranog razmnožavanja bakterija u domaćinu. Biosinteza lipida A inicira se u bakterijskoj citoplazmi, traži mnoštvo enzima i završava se na unutrašnoj membrani bakterije i predstavlja konzervativno najočuvaniji dio lipopolisaharida. Naročito očuvana je strukutrna okosnica koja se sastoji od disaharida i glukozamina. Lipid A putuje kroz membrane i međumembranski prostor sve dok ne dostigne vanjski sloj vanjske membrane. Ugljikohidratna kora sintetizira se vrlo brzo i učinkovito zahvaljujući kompleksu enzima glikozil–transferaza koji kao donore koriste nukleotidne šećere. Ugljikohidratna osnova može se podijeliti na dvije strukturne regije: unutarnja kora koja se povezuje s lipidom A i vanjska kora koja se povezuje s O–antigenom. Za razliku od lipida A koji pokazuje vrlo visok stupanj konzervativnosti, ugljikohidratna osnova razlikuje se između različitih bakterijskih vrsta. Razlikovanje je dokazano i na razini vrste, različiti podtipovi *Escherichia coli* imaju različito građenu ugljikohidratnu osnovu. Gledano prema

strukturnim regijama, vanjski dio osnove pokazuje veći stupanj razlikovanja od unutarnje. Iako je strukturno vrlo različita, osnovni kostur ugljikohidratne osnove je oligosaharidni lanac od šest podjedinica. Najčešći šećeri su 2–ketooktaza u obliku 3–deoksi–D–mano–okulosonične kiseline (Kdo, engl. *3–deoxy–D–manno–oct–2–oculosonic acid*), L–glicero–D–mano–heptoza (Hep, engl. *L–glycero–D–manno–heptose*), D–glukoza i D–galaktoza. Biosinteza O–antigena obavlja se na citoplazminoj površini unutarnje membrane. Enzimi glikozil–transferaze koriste šećerne donore za sintezu O–antigena na undekaprenil fosfatu, membranski vezanom nosaču. Strukturne jedinice O–antigena razlikuju se prema tipu monomera od kojih su građeni, O–glikozidnim vezama, poziciji i stereokemiji. Veze između podjedinica O–antigena mogu biti linearne ili razgranate (Wang i Quinn, 2010a., Wang i Quinn, 2010b., Maldonado i sur., 2016.).

Tkivo probavne cijevi svih kategorija svinja prima hranjive tvari iz dva izvora: iz hrane (četkasti porub) i sistemske cirkulacije (bazolateralna membrana). Specifične potrebe za rast i razvoj karakteriziraju probavni sustav s obzirom na specifičnu apsorpciju hranjivih tvari. Novorođeno prase ima mogućnost iskorištavanja oko 50% esencijalnih aminokiselina iz hrane (lizin, glutamin, leucin, treonin). Kolostrum ima vitalnu važnost za novorođenu prasad, zahvaljujući njemu prasad stječe pasivni imunitet unošenjem imunoglobulina te unosi u organizam aktivne peptide, aminokiseline i nutrijente neophodne za rast i diferencijaciju tkiva probavnog sustava. Izostanak sisanja kolostruma povlači niz negativnih posljedica za organizam koje u kombinaciji s lošim higijenskim i mikroklimatskim uvjetima te izostankom suplementacije željeza snažno pogoduju razvoju patogenih Gram–negativnih bakterija što može dovesti do uginuća. Bakterijske vrste koje obitavaju u crijevima svinja mogu se podijeliti na komenzalne, oportunističke i patogene. Komenzalne žive u simbiotičkom odnosu s domaćinom, oportunističke iskazuju svoja patogena svojstva samo u slučaju pada imunosti, dok patogene izražavaju svoja svojstva i uzrokuju bolest odmah po ulasku u organizam. Bakterije uzrokuju bolest preko dva mehanizma: invadiranjem tkiva ili proizvodnjom toksina (Post, 2012.).

Tablica 1. Gram–negativne bakterije i bolesti odnosno klinički znakovi do kojih dovode

Bakterija	**Bolest(i) i / ili klinički znaci**
Brachyspira hyodysenteriae	Dizenterija svinja
Brachyspira pilosicoli	Spiroketoza kolona
Campylpbacter coli/jejuni	Enteritis
Escherichia coli	Kolibaciloza, neonatalna septikemija, enteritis
Lawsonia intracellularis	Enteropatija s proljevom
Leptospira species	Slabost prasadi
Salmonella enterica	Enteritička i spetikemijska salmoneloza
Yersinia enterocolitica	Enteritis
Yersinia pseudotuberculosis	Kolitis

Izvor: Post (2012.)

Tablica 2. Gram–negativne bakterije i bolesti koje uzrokuju u probavnom sustavu

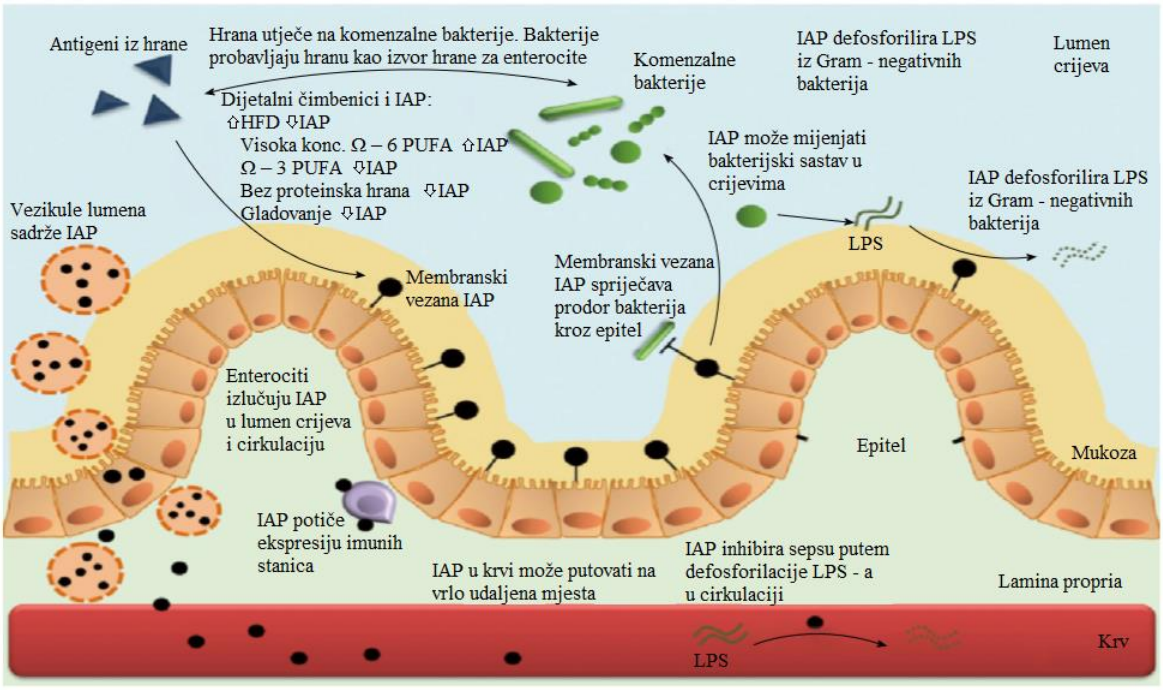
Bakterija	**Bolest**
Bacteroides fragilis	Upala kolona/tumor kolona
Campylobacter jejuni	Gastroenteritis
Enterohemoragična *E. coli* (EHEC)	Krvava dijareja, hemolitički kolitis
Enterotoksična *E. coli* (ETEC)	Dijareja
Izvanstanična patogena *E. coli* (ExPEC)	Izvanstanične infekcije urinarnog trakta, neonatalni meninigitis i septikemija
Shiga toxin producing *E. coli* (STEC)	Hemoragični kolitis
Helicobacter pylori	Gastritis, čirevi, rak želuca
Salmonella typhi	Enteritička groznica
Shigella dysenteriae serotip 1	Shigeloza (bacilarna dizenterija)
Shigella flexneri	Dijareja
Vibrio cholerae	Dijareja

Izvor: Chatterjee i Chaudhuri (2012.)

Wang i Quinn (2010a.) navode da odgovor imunosnog sustava domaćina ovisi o snazi infekcije i strukturi bakterijskog LPS koji se proširio organizmom. LPS stimuliraju membranski protein „Toll–like receptor 4“ (TLR4) smješten na površini stanica imunosnog sustava poput monocita, makrofaga, neutrofila i dendritičkih stanica. TLR4 receptor ovisi o malom MD–2 proteinu koji prepoznaje LPS. Nakon prepoznavanja, TLR4 aktivira druge

unutarstanične proteine koji dalje potiču protuupalni odgovor. Prema Bilski i sur. (2017.) vezanje LPS–a na TLR4 može aktivirati dva različita mehanizma: mehanizam ovisan o MyD88 (engl. *myeloid differentiating factor 88*) ili mehanizam neovisan o MyD88. Aktivacija mehanizma ovisnog o MyD88 vodi do aktiviranja nuklearnog faktora κB (NF–κB, engl. *nuclear factor*-κB) i otpuštanja protuupalnih citokina kao što su interleukini (IL–1, IL–6, IL–8 IL–12) te čimbenika nekroze tumora–α (TNF–α, engl. *tumour necrosis factor-α*). Visoke koncentracije LPS mogu izazvati povećanu temperaturu i povišeni srčani ritam koji vode do septikemijskog šoka i uginuća. Nasuprot tome, niske koncentracije nekih LPS–a aktiviraju imunomodulatore koji mogu inducirati nespecifičnu otpornost. Aktivacija TLR4 receptora ovisi o fosfatnim skupinama te dužini i broju acilnih lanaca na lipidu A, na primjer, lipid A *Escherichie coli* koji sadrži dvije fosfatne skupine i šest acilnih lanaca građenih od 12 do 14 ugljikovih atoma snažan je aktivator imunog sustava. Dvije fosfatne skupine lipida A na lipopolisaharidima podržavaju vezanje kompleksa LPS–TLR4, a defosforilacijom pomoću intestinalne alkalne fosfataze inhibira se mehanizam ovisan o MyD88 zaustavljanjem aktivacije TLR4 i shodno tome smanjene aktivacije NF–κB i protuupalnih citokina. Nakon što IAP izvrši defosforilaciju, LPS ne može stimulirati TLR4 receptore (Bilski i sur., 2017.). Bentala i sur. (2002.) u svome istraživanju navode kako je za toksičnu aktivnost LPS–a esencijalna prisutnost dvije fosfatne skupine vezane na diglukozamin u lipidu A. Monofosforil lipid A (MPLA, engl. *monophosphoryl lipid A*) je u potpunosti netoksičan što dokazuje da IAP mora defosforilirati samo jednu fosfatnu skupinu lipida A kako bi se eliminirala mogućnost razvoja patoloških stanja u organizmu.

Melo i sur. (2016a.) u svome istraživanju utvrđivali su povezanost između IAP, natrijevog butirata i esencijalnih ulja iz brazilske crvene papričice te njihov utjecaj na upalne procese izazvane LPS. Cilj istraživanja bio je utvrditi utječu li esencijalna ulja i natrijev butirat na aktivnost crijevne alkalne fosfataze i regulaciju upalnih procesa izazvanih lipopolisaharidima. Esencijalna ulja dokazano podižu otpornost crijeva djelujući antioksidativno, antimikrobialno, protuupalno i antiulcerogeno. Natrijev butirat, kratkolančana masna kiselina derivat je butirične kiseline i ima regulatornu ulogu upalnih procesa potičući genetsku ekspresiju NF–κB. Najvažnija funkcija natrijevog butirata zapravo je regulacija genske ekspresije i aktivnosti crijevne alkalne fosfataze. Nakon provedenih istraživanja potvrdili su hipotezu da esencijalna ulja i natrijev butirat dodatno pomažu aktivnost IAP preko stimulacije NF–κB. Učinak defosforilacije LPS pomoću IAP može se izmjeriti određivanjem količine otpuštenih fosfatnih skupina.



Slika 4. Crijevna alkalna fosfataza održava homeostazu u probavnoj cijevi

Izvor: Estaki i sur. (2014.)

Enterociti izlučuju IAP koja ima vitalnu ulogu u crijevima i izvan njih jer se defosforilacijom LPS u lumenu crijeva i krvi spriječava razvoj više vrsta bolesti i sepse. Većim je dijelom IAP vezana na membranu ali sadržana je u visokim koncentracijama u apikalnom dijelu enterocita i vezikulama lumena bogatim proteinima. Iz slike 4. vidljivo je da membranski vezana IAP ima esencijalnu ulogu spriječavanja prodora bakterija kroz epitel crijeva u lamina propriju, limfne čvorove i krv. Na taj način membranska IAP spriječava dodatnu aktivaciju imunoloških stanica i protuupalnog odgovora. Apikalna i vezikularna IAP defosforiliraju LPS koji se pronalaze slobodni u lumenu crijeva. Ako LPS ipak probiju membransku obranu, enterociti izlučuju IAP u laminu propriju gdje potiče ekspresiju imunih stanica. Iz lamine proprije prelazi u krvotok, cirkulacijom se raznosi po organizmu kako bi obavila defosforilaciju i spriječila razvoj sepse. Za pravilnu funkciju IAP potreban je dobro balansiran obrok; vrlo masni obroci, ω–3 polinezasićene masne kiseline, proteinima siromašni obroci i gladovanje su čimbenici koji se negativno

odražavaju na koncentraciju i aktivnost IAP. Bjelančevinasta hrana i hrana bogata ω–3 masnim kiselinama pomažu radu crijevne alkalne fosfataze.

3.3. Aktivnost crijevne alkalne fosfataze kod prasadi prilikom odbića

Odbiće prasadi tehološki je najosjetljivije razdoblje intenzivnog uzgoja svinja i u kombinaciji s lošim provođenjem procesa rezultira bolestima i nerijetko smrtnim ishodima. Intenzivni sustavi uzgoja zahtjevaju koji brze rezultate rasta, zdrave životinje i kvalitetne finalne proizvode često se suočavaju s negativnim posljedicama preuranjenog odbića prasadi. Promjena hranidbe, odvajanje od krmače, mješanje s prasadi iz drugog legla i promjena socijalne hijerarhije te potpuno novi sustav uzgoja stresori su koji pogađaju prasad u ovom razdoblju. Lackeyram i sur. (2010.) navode kako je prenaglo i prerano odbiće povezano sa smanjenom konzumacijom hrane što uzrokuje promjene u strukturi i funkciji probavnog sustava. Prasad naime posjeduje fetalne enterocite kao i enterocite karakteristične odraslim životinjama. Potpuna zamjena fetalnih enterocita događa se oko 19 dana po rođenju i preklapa se sa početkom odbića. Stres i iscrpljivanje organizma tijekom odbića reduciraju broj fetalnih enterocita, i iako se razvijaju enterociti kakve imaju odrasle životinje, postoji mogućnost da se patogene bakterije umnože te se razviju bolesti poput dijareje i enteritičkih bolesti. Ekspresija crijevne alkalne fosfataze u tankom crijevu ovisna je o diferencijaciji enterocita. Zbog brojnih funkcija koje ima u tankom crijevu, IAP se smatra ključnim enzimom u primarnoj probavi i apsorpciji (Lackeyram i sur., 2010., Lackeyram, 2012.).

Istraživanjem povezanosti ranog odbića i kinetičkih svojstava IAP (v_{max}, K_M, v_{cap}) Lackeyram i sur. (2010) zaključili su kako postoje statistički značajne razlike ($P < 0,05$) između skupine rano odbijene prasadi i skupine sisajuće prasadi. U istraživanju korišteno je 12 prasadi Yorkshire pasmine, 6 muških i 6 ženskih, nasumično odabranih iz legla 6 različitih krmača. Prasad je odabrana u dobi od 10 dana i tjelesne mase 3,23 ± 0,13 kg, premještena u poseban boks i hranjena slijedećih 12 dana hranom baziranom na kukuruzu i soji. Kontrolna skupina sastojala se od 12 prasadi iste pasmine i istog omjera spolova. Prasad je također odabrana u dobi od 10 dana i dopušteno im je sisanje krmačinog mlijeka slijedećih 12 dana. Na dan uzimanja uzoraka jejunuma prasad je anestezirana, uzeti su uzorci proksimalnog i distalnog jejunuma. Na svim uzorcima jejunuma izmjerena je visina crijevnih resica i dubina kripti te debljina glatkomišićnog tkiva koje okružuje crijeva. Za

određivanje kinetičkih aktivnosti IAP uzorci proksimalnog jejunuma su homogenizirani i kategorizirani na uzorke unutarstanične frakcije i uzorke apikalne membrane. Analiza je izvršena na 37 ˚C i u trajanju od 10 minuta u ukupno 1 mL otopine koja sadrži 10 μg proteina, 2,0 mmol/L KF, 4,0 mmol/L $MgCl_2$ i 0–10 mmol/L P–nitrofenil fosfata (pNPP) na pH vrijednosti 10,5. Rezultati istraživanja pokazali su da je skupina odbijene prasadi imala statistički značajno nižu tjelesnu masu na dan uzimanja uzoraka. Histološke vrijednosti visine crijevnih resica za proksimalni jejunum su 55%, za distalni jejunum 51% manje nego kod kontrolne skupine. Dubina kripti kod prasadi u odbiću se značajno povećala, 128% u proksimalnom jejunumu i 98% u distalnom jejunumu. Debljina mukoznog tkiva (visina resica + dubina kripti) manja je za 20% kod skupine odbijene prasadi.

Tablica 3. Morfologija mukoznog sloja jejunuma kod skupine sisajuće prasadi i skupine odbijene prasadi

Morfološki segement jejunuma	**Sisajuća prasad**	**Odbijena prasad**	**Standardna greška**
	μg		
Proksimalni jejunum			
Visina resica	501,5	223,6*	0,91
Dubina kripti	138,4	315,1*	0,59
Visina resica:dubina kripti	3,8	0,8*	0,01
Debljina mukoznog sloja	639,9	512,0*	0,95
Debljina glatkomišićnog tkiva	182,4	175,1	0,65
Distalni jejunum			
Visina resica	499,8	246,1*	1,64
Dubina kripti	128,9	255,2*	0,60
Visina resica:dubina kripti	4,2	1,0*	0,01
Debljina mukoznog sloja	628,7	501,4*	1,83
Debljina glatkomišićnog tkiva	189,8	203,2	1,16

* Statistički značajne razlike, $P < 0,05$

Izvor: Lackeyram i sur. (2010.)

Kinetička svojstva IAP mjerena su na uzorcima duodenuma, proksimalnog jejunuma, distalnog jejunuma i ileuma. Statistički značajne razlike u duodenumu, proksimalnom i distalnom jejunumu postojale su između svih kinetičkih parametara, vrrijednosti v_{max}, K_M i v_{cap} bile su niže kod skupine odbijene prasadi nego kod skupine sisajuće prasadi. Vrijednosti v_{max} i K_M u ileumu ne pokazuju statistički značajne razlike, jedino je v_{cap} vrijednost snižena kod skupine odbijene prasadi. Rano odbiće rezultiralo je i sniženjem kinetičkih vrijednosti ukupne mukozne IAP, 26% niži K_m, 22% niži v_{max}, 19% niži v_{cap}.

Tablica 4. Kinetička svojstva IAP kod skupine sisajuće prasadi i odbijene prasadi

Segment crijeva	**K_m (mmol/L)**	**v_{max} µmol/(mg proteina*min)**	**v_{cap} mol/(kg tj. mase * dan)**
Duodenum			
Sisajuća prasad	8,36 ± 0,72	0,421 ± 0,062	0,139 ± 0,010
Odbijena prasad	11,06 ± 1,69 *	0,342 ± 0,021 *	0,068 ± 0,011 *
Proksimalni jejunum			
Sisajuća prasad	6,99 ± 0,79	0,509 ± 0,048	0,958 ± 0,029
Odbijena prasad	7,87 ± 0,58 *	0,432 ± 0,032 *	0,831 ± 0,018 *
Distalni jejunum			
Sisajuća prasad	6,00 ± 0,92	0,511 ± 0,061	0,902 ± 0,032
Odbijena prasad	8,64 ± 1,30 *	0,374 ± 0,032 *	0,714 ± 0,019 *
Ileum			
Sisajuća prasad	7,46 ± 0,60	0,362 ± 0,044	0,212 ± 0,020
Odbijena prasad	7,75 ± 0,67	0,349 ± 0,047	0,179 ± 0,021 *
Ukupno tanko crijevo			
Sisajuća prasad	7,06 ± 0,44	0,454 ± 0,029	2,209 ± 0,077
Odbijena prasad	8,87 ± 0,45 *	0,353 ± 0,023 *	1,790 ± 0,058 *

* Statistički značajne razlike, $P < 0,05$

Izvor: Lackeyram i sur. (2010.)

Kasniji početak procesa odbića rezultira brojnim pogodnostima za organizam, rast i razvoj uravnoteženi su s hormonalnim promjenama i promjenama režima hranidbe pa je rizik od negativnih posljedica smanjen. Provedenim istraživanjem, autori su dokazali na staničnoj razini kako je kasnije odbiće bolja opcija za prasad.

4. SELEN

Selen (Se) je kemijski element i nemetal čiji je atomski broj 34. U periodnom sustavu elemenata smješten u elemente 16. skupine koja nosi nazive kisikova skupina ili halkogeni elementi. Fizikalna i kemijska svojstva slična su svojstvima sumpora i telura koji su u periodnom sustavu smješteni iznad i ispod njega. Toksične i letalne sličnosti dijeli s arsenom smještenim lijevo od njega u periodnom sustavu. U prirodi se rijetko javlja u čistom elementarnom stanju ili kao čista ruda, mnogo češće se pojavljuje u alotropskim oblicima ili kao komponenta organskog spoja. Najčešći alotropski oblik selena je crveni amorfni prah zatim crvena kristalična tvar i sivo–crna kristalična tvar slična metalu koja se naziva još i metalični selen (Meija i sur., 2016., Royal Society of Chemistry).

4.1. Metabolizam selena

Bioraspoloživost selena u organizmu direktno je ovisna o podrijetlu. Hranom unešeni selen dijeli se na organski i anorganski. Organski selen podrazumijeva oblike vezane na metionin i cistein, aminokiseline koje sadrže sumpor i nazivaju se selenometionin (SeMet) i selenocistein (SeCys). Dobri izvori organskog selena također su metilirani oblici selenometionina. Anorganski selen čine selenove soli koje se dijele na selenite (SeO_3^{2-}) i selenate (SeO_4^{2}). Dostupnost selena u hrani za životinje ovisi o njegovoj raspoloživosti u tlu koja značajno varira ovisno o geografskoj lokaciji i klimatskim uvjetima, pH vrijednosti tla, dostupnosti kisika u tlu te količini sumpora. Biljke putem korijena akumuliraju anorganske oblike selena i asimiliraju ih u organske oblike, najčešće selenometionin i njegove metilirane oblike, više od 50%, a ostatak čine selenocistein i vrlo male količine neasimiliranih selenata i selenita. Ljudski i životinjski organizam najbolje koristi i skladišti selenometionin, najviše ga se nalazi u skeletnim mišićima, 28–46%. Iako sadrže najviše selena, skeletni mišići nisu najbogatiji istim kada se promatra količina selena po gramu svježeg tkiva. Bubrezi sadrže oko 470 ng/g tkiva dok mišićno tkivo sadrži 51 ng/g selena. Po količini selena između se nalaze još i jetra, slezena, gušterača, srce, mozak, pluća, kosti i tek onda skeletni mišić. Selenocistein i selenit koriste se za sintezu vodikovog selenida koji se zatim koristi za biosintezu selenofosfata i 25 različitih selenoproteina od kojih je najpoznatija glutation peroksidaza (Terry i Diamond, 2012.). Prema istim autorima, selenometionin se apsorbira u tankom crijevu aktivnim transportom

pomoću transportera ovisnog o natriju, veže se za hemoglobin i taloži u jetri i skeletnim mišićima. Selenocistein također se apsorbira u tankom crijevu i veže na eritrocite pomoću za sad još nepoznatih nosača. Anorganski oblici usvajaju se pasivnim transportom, slabije se skladište u organizmu i služe za biosintezu. Selenit se metabolizira do selenida koji se reducira do glutationa te se veže na albumin ili hemoglobin koji ga prenose u jetru za daljnje biosinteze. Za razliku od selenita, selenat se ne metabolizira već se plazmom prenosi se do jetre koja ga metabolizira te se izlučuje mokraćom i fecesom.

4.2. Uloge selena

Selen je mineral koji se ubraja u kategoriju mikroelemenata ne zbog manje važnosti za organizam nego zbog fiziološki niske granice tolerancije koja kod domaćih životinja iznosi 0,2–0,3 mg/kg ST obroka. Toksičnost kod preživača nastupa kada se u organizam unese oko 4–5 mg/kg ST, a kod svinja oko 2 mg/kg ST obroka. Prije nego su prepoznate brojne prednosti i blagotvornosti za organizam, selen je bio smješten u kategoriju toksičnih elemenata. Akutna trovanja suficitom selena na farmama konja imala su simptome sljepila, preznojavanja, abdominalne boli, kolitisa, dijareje te ubrzanog rada srca i pluća. Simptomi kroničnog trovanja skupno su nazvani „alkalijskom bolesti“ koja se manifestirala kao alopecija i pucanje kopita. Suprotno tome, deficit selena u organizmu izaziva nutritivnu mišićnu distrofiju, gubitak tjelesne mase, dijareju, smanjenu plodnost, retenciju posteljice, uginuća mladunčadi, smanjenu aktivnost štitne žlijezde. Tek nakon otkrića fiziološki tolerantnih količina i povezanosti s vitaminom E, prepoznata je neposredna važnost selena za pravilno funkcioniranje organskih sustava (Domaćinović, 2006., Terry i Diamond, 2012.). Najkvalitetniji izvori selena su morski plodovi i jestivi unutrašnji organi, zatim crveno meso, cjelovite žitarice i mliječni proizvodi (National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements).

Primarna uloga selena je antioksidacija reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, *engl. Reactive Oxygen Species*) koji se u organizmu nakupljaju tijekom stresnih stanja poput odbića ili temperaturnog šoka, izazivaju oštećenja stanične membrane te potiču proupalne signale koji zatim potiču rad imunosnog sustava. Reaktivni oblici kisika mogu dolaziti iz hrane i okoliša ili se mogu sintetizirati u stanici iz mitohondrija zbog gubitka elektrona tijekom metabolizma. U težim slučajevima oksidativnog stresa kada urođena obrana organizma nije dovoljno snažna, potrebni su dodatni antioksidansi. Selenoproteini, odnosno glutation

peroksidaza i tioredoksin reduktaza pomažu organizmu u borbi protiv reaktivnih kisikovih vrsta koji uzrokuju oštećenja stanične membrane, proteina i nukleinskih kiselina (Zenagui i sur., 2017.). Ostale uloge selena su antikancerogene i detoksifikacijske (Sun i sur., 2016.), poboljšava reproduktivnu sposobnost mužjaka i ženki u kombinaciji s vitaminom E, prenosi vodik u respiracijskom lancu, sudjeluje u metabolizmu prostaglandina i biosintezi gušteračine lipaze nužne za apsorpciju vitamina E i pravih masti, blagotvorno djeluje na zdravlje vimena mliječnih krava i smanjuje broj somatskih stanica u mlijeku tijekom laktacije te smanjuje mogućnost uginuća janjadi zbog stimulacije imunosnog sustava tijekom razvoja ploda (Domaćinović, 2006.).

4.3. Određivanje selena u organizmu

Kvantitativno određivanje prisutnosti selena u organizmu moguće je obaviti uzorkovanjem tkiva ili tjelesnih tekućina iz više izvora, najčešće su to puna krv, plazma, serum, eritrociti, urin te kosa i nokti kod ljudi odnosno dlaka i papci ili kopita kod životinja. Nekoliko metoda razvijeno je za utvrđivanje selena no još uvijek je diskutabilno koja od metoda je najučinkovitija. Pri utvrđivanju kvantitativnih količina treba biti oprezan jer različiti tkiva ili tjelesne tekućine ne prikazuju uvijek pravo stanje selena u organizmu, na primjer, određivanjem selena iz urina ili krvi možemo dobiti uvid isključivo u trenutnu količinu i stoga je bolje koristiti trajne izvore poput pune krvi, dlake, papaka i kopita. Za utvrđivanje neposrednih promjena u količini selena najbolje je koristiti uzorke plazme ili seruma (Terry i Diamond, 2012). Metode za određivanje količine selena su masena spektrometrija (Raemer i Veillon, 1983.), analiza aktivnosti neutrona (Morris i sur., 1983.), a u novije vrijeme koristi se i metoda indirektnog određivanja selena preko određivanja količine selenoproteina (Terry i Diamond, 2012.). Aktivnost glutation peroksidaze (GPx, *engl. glutathione peroxidase*) određuje se spektrofotometrijski u plazmi ili eritrocitima i najčešće se koristi pri utvrđivanju deficita selena u organizmu, a određivanje koncentracije selenoproteina P (SEPP1) vrši se u plazmi.

Flohe i sur. (1973.) u svome istraživanju glutation peroksidaze potvrdili su pretpostavku kako je selen ne samo sastavni dio enzima već je nužan za njegovu aktivnosti. Prema autorima, glutation peroksidaza ima molekularnu masu 84000 daltona i sadrži ukupno 4 grama selena. Budući da se enzim sastoji od četiri podjedinice od kojih svaka ima molekularnu masu 21 000 daltona, zaključeno je kako svaka podjedinica sadrži

1 gram selena. Uz to, na enzimu nisu pronađene druge funkcionalne skupine poput hema ili flavina što je potaklo autore da zaključe kako selen sudjeluje u oksidacijsko–redukcijskim katalitičkim aktivnostima glutation peroksidaze.

4.4. Selen, vitamin E i imunost

S obzirom na pozitivne odlike selena preporučljivo je svakodnevno korištenje selena u obrocima svih kategorija svinja bilo u obliku dodataka hrani ili u gotovim smjesama koje već sadrže dodane količine organskih ili anorganskih oblika selena. Najučinkovitijim se pokazao organski selen i to u obliku selenometionina zbog čega se proizvodnja usmjerila na selenom obogaćene kvasce, točnije na kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jer je analizom DNK utvrđeno kako se soj ovog kvasca nije promijenio te da se proizvedeni selenom obogaćenih kvasci ne mogu kvalificirati kao GMO (genetički modificirani organizmi) ili GMM (genetički modificirani mikroorganizmi). Nakon obavljenog tehnološkog postupka pripreme, suhi selenom obogaćenih kvasci sadrže oko 2 mg Se/g od čega su 60–84% selenometionin, 2–4% selenocistein i manje od 1% anorganski oblici selena. Čisti organski selen poput hidroski–selenometionina (OH–SeMet, engl. *hydroxy-selenomethionine*) ima 100%-tnu bioučinkovitost odnosno pruža 100% selenometionina koji se može iskoristiti i skladištiti te mobilizirati u slučajevima oksidativnog stresa (Zenagui i sur., 2017., The EFSA Journal, 2008.).

Noviji podaci (Yin i sur., 2014.) ukazuju kako stres prilikom odbića uzrokuje i oksidativni stres kod prasadi koja preuranjeno ulazi u proces odbića. Zbog toga su Chen i sur. (2016.) istraživali utječu li dva različita izvora selena (natrijev selenit i selenom obogaćeni kvasci) i vitamina E (DL–α–tokoferol acetat) u hrani krmača na imunitet njihovih potomaka. Selen i vitamin E dodavani su u hranu krmača u razdoblju od koncepcije do 21. dana postpartum, a cilj istraživanja bio je utvrditi količinu selena iz seruma, pune krvi te tkiva i krvi pupčane vrpce, antioksidativni status jetre i seruma određivanjem ukupne antioksidacijske aktivnosti (TAOC, engl. *total antioxidant capacity*), aktivnosti superoksid dismutaze (SOD, engl. *superoxide dismutase*) i glutation peroksidaze (GPx) te količine glutationa (GSH, engl. *glutathione*) i malondialdehida (MDA, engl. *malondialdehyde*). Novorođena prasad krmača hranjenih dodatkom selenom obogaćenih kvasaca imala je veće količine selena u bubrezima i slabinama, višu aktivnost jetrene TAOC i GSH te serumske TAOC i SOD, niž serumski MDA od prasadi hranjene

natrijevim selenitom. Prasad krmača hranjenih organskim selenom u dobi od 21 dan imala je veću količinu selena u srcu, gušterači, timusu i slabinama, veću količinu serumskog i jetrenog GSH, višu aktivnost jetrene TAOC i SOD i manju količinu serumskog MDA nego prasad u krmača hranjenih anorganskim selenom. Serumski α–tokoferol kod novorođene prasadi i prasadi u odbiću veći je kod krmača hranjenih većim količinama dodanog vitamina E. Broj odbijene prasadi i ujednačenost legla, odnosno masa prasadi na početku odbića, bila je bolja u prasadi krmača hranjenih organskim selenom.

Falk i sur. (2018.) istraživali su povezanost upalnih procesa intravenozno induciranih LPS–om s tri izvora selena (natrijev selenit, selenom obogaćeni kvasci i α-selenometionin). Dobiveni rezultati pokazali su kako organski izvori selena najbolje služe u borbi protiv upalnih procesa stimuliranih LPS–om. Oksidativni stres izazvan lipopolisaharidima aktivirao je pojačano lučenje glutation peroksidaza (GPx – 1 i GPx – 3). Količine selena u plazmi smanjene su uslijed primjene lipopolisaharida, ali su još uvijek bile unutar poželjnih granica. Povezanost selena i LPS–a istraživali su Sun i sur. (2016.) na uzorcima krvi, jetre, slezene, timusa i limfnih čvorova 4 sata nakon intravenoznog uvođenja LPS–a. Koncentracije selena u serumu i slezeni bile su smanjene 4 sata nakon uvođenja LPS–a, dok su koncentracije u jetri, timusu i limfnim čvorovima ostale gotovo nepromjenjene. Smanjena aktivnost glutation peroksidaze uočena je u serumu, timusu i limfnim čvorovima. Retencije selena, supresija selenogena i smanjena aktivnost glutation peroksidaze u imunološkim organima tijekom upalnog procesa nisu u potpunosti razjašnjene, no pretpostavlja se da ovise o životinjskoj vrsti, koncentraciji i vremenskom trajanju ekspozicije lipopolisaharidima. Akutna faza upale izazvana lipopolisaharidima ometa metabolizam selena preko oslabljene ekspresije selenogena što se očituje smanjenjem koncentracije i aktivnosti GPx u serumu, jetri, slezeni, timusu i/ili limfnim čvorovima.

Oksidativni stres mogu potaknuti i toplinski šokovi, hipertermija, hipoksija i upala probavnog sustava narušavajući integritet epitela probavne cijevi. Selen i vitamin E djeluju antioksidativno neutralizirajući slobodne radikale oslobođene tijekom toplinskog stresa, selen učinkovito reducira vodikov peroksid dok vitamin E dobro reducira otpuštene lipidne perokside. Liu i sur. (2016.) istraživali su djeluju li selen i vitamin E zaštitno za epitel crijeva tijekom oksidativnog stresa uzrokovanog temperaturnim šokovima. Odbijene svinje izložene toplinskom stresu pokazale su dramatičnu tahipneju i povišenu rektalnu temperaturu. Različite koncentracije selena i vitamina E u obrocima toplinski stresiranih

životinja utječu na genetsku ekspresiju i aktivnost glutation peroksidaze, odnosno više koncentracije antioksidansa potiču bolju ekspresiju i aktivnost enzima. Omjeri oksidiranog i reduciranog glutationa također se smanjuju s povećanjem koncentracije antioksidansa. Oksidativni stres uzrokovan toplinskim stresom narušava integritet probavne cijevi i propusnost njezine sluznice. Povećane količine selena i vitamina E u hrani pomažu organizmu u borbi protiv ove vrste stresa tijekom ljetnih mjeseci, no ipak je potrebno biti oprezan u primjeni kako se ne bi dostigle toksične razine u organizmu.

5. MATERIJALI I METODE

Za provedbu istraživanja nasumično je odabrana odbijena prasad u dobi od 28 dana i podijeljena u 4 skupine. Svaka skupina sastojala se od 10 prasadi s jednakim omjerom spolova, hranjenih istom grover smjesom s različitim izvorima selena u obroku. Prva skupina prasadi bila je kontrolna skupina (K) i hranjena je bez dodatka selena u premiksu. Druga skupina prasadi (P1) hranjena je obrokom na bazi kukuruza i pšenice biofortificiranih selenom. Treća skupina prasadi (P2) hranjena je obrokom s dodanim količinama keliranog selena tvrtke FRAmelco®. Četvrta skupina prasadi (P3) hranjena je obrokom s dodatkom premiksa SEL-PLEX® kojeg proizvodi tvrtka Alltech® odnosno selenometioninom proizvedenim od selenom obogaćenih kvasaca. U obroke pokusnih skupina dodan je selen u koncentraciji 0,3 ppm. Pokus je trajao 42 dana, prasad je zaklana u dobi 70 dana.

Tablica 5. Hranjiva i energetska vrijednost grover smjese u pokusu

Sirove bjelančevine	17,51
Sirova mast	4,45
Sirova vlakna	3,70
Lizin	1,51
Metionin + cistein	0,75
Triptofan	0,23
Kalcij	0,61
Fosfor	0,52
ME (MJ/kg)	13,95

Tablica 6. Sirovinski sastav grover smjese za prasad u pokusu

Krmivo	**%**
Kukuruz	40,0
Pšenica	15,0
Ječam	5,0
Sojina sačma	6,26
Soja punomasna	7,0
Repin rezanac	1,3
Sirutka sušena	7,0
Serolat	3,0
Vitaprotein 50 plus	2,0
NuProAlltech	3,0
ReproFishMicrum	3,3
Metionin dl	0,18
Lizin	0,65
α–treonin	0,13
Nerafinirano sojino ulje	0,74
Sol (NaCl)	0,3
Vapnenac	0,1
Monokalcij fosfat	0,32
PDFM	0,1
Mikofiks	0,2
0,5 % px za growr (trypt+)	0,5
Faser GOLD	3,0
MCFA aromabiotik	0,2
Vitarocid	0,7
Pigysweet	0,02
Ukupno	**100,0**

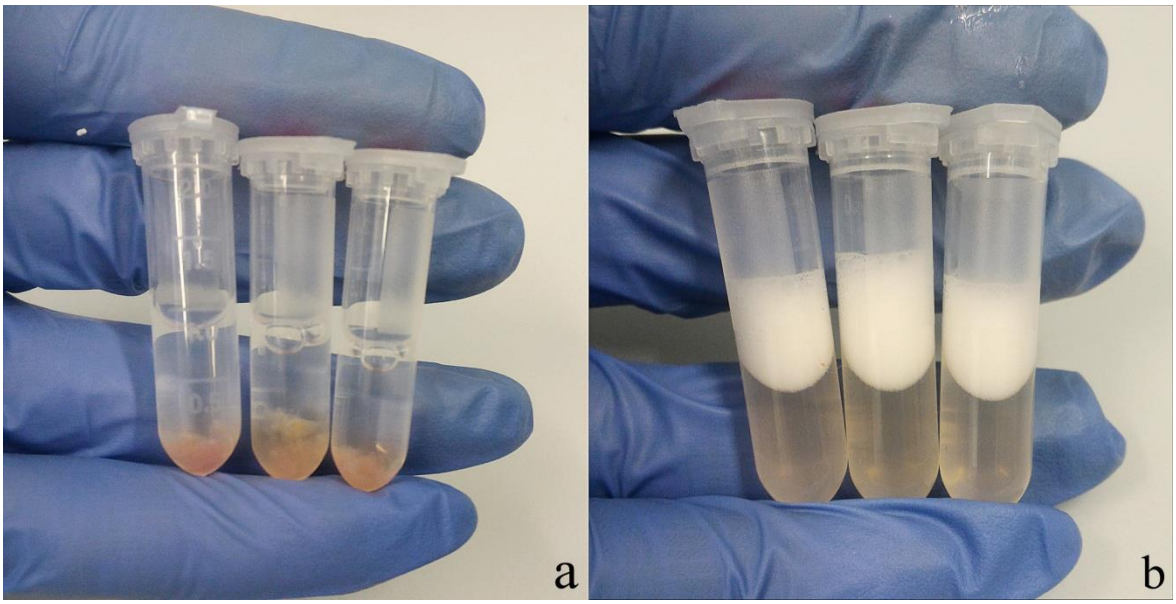
5.1. Uzorkovanje tkiva i priprema pufera

Nakon klanja prasadi eviscerirana je utroba i uzeto je ukupno 80 segmenata crijeva, 40 iz duodenuma i 40 iz ileuma u duljini 10 cm. Segmenti su otvoreni škarama a sluznica crijeva sastrugana je pomoću predmetnog stakalca i pohranjena u mikroepruvete. Uzorci su zamrznuti na –80 °C do laboratorijskih analiza. Analiza je obavljena na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, Zavod za stočarstvo, Laboratorij za hranidbu i fiziologiju domaćih životinja.

Lizirajući pufer načinjen je u volumenu od 1 litre destilirane vode i sastojao se od slijedećih sastojaka: 50 mM tris–HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA i 1% Triton X–100. Svi sastojci vagani su na preciznoj analitičkoj vagi (GIBERTINI–OPREMA, Donau lab d.o.o.) a homogenizacija pufera obavljena je na magnetskom mješaču s toplinskom podlogom MSH–300 (BioSan). Toplinska podloga bila je isključna tijekom mješanja pufera. 50 ml pufera kalibrirano je dodatkom NaOH na pH vrijednosti 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, 8,6, 9,0, 10,0 i 11,0. Analiziranjem uzoraka na različitim pH vrijednostima utvrđena je najveća aktivnost crijevne alkalne fosfataze pri pH vrijednosti 8,6.

5.2. Analiziranje uzoraka

U mikroepruvete maksimalnog volumena 2 mL pipetirano je 1 mL lizirajućeg pufera, pH 8,6, pomoću Thermo Scientific Finnpipette™ F2. Laboratorijskom špatulicom u mikroepruvetu dodano je oko 1 g uzorka sluznice. Svaki uzorak analiziran je tri puta kako bi se kao reprezentativna vrijednost uzorka mogla odabrati srednja vrijednost. Uzorci su homogenizirani štapnim mikserom T10 basic Ultra Turrax® (IKA®–Werke GmbH & co. KG, Njemačka) u trajanju 30 sekundi. Špatulica i nastavak štapnog miksera isprani su tekućom i zatim destiliranom vodom nakon svakog uzorka. Homogenizirani uzorci centrifugirani su u centrifugi kapaciteta 24 uzorka x 2 ml (Eppendorf, 5415 D) na 13 200 okretaja u minuti i trajanju od 15 minuta. Iz supernatanta pipetirano je 200 µL uzorka u posebne čašice. Uzorci su analizirani u automatskom biokemijskom analizatoru Beckman Coulter® AU400 (Tokyo, Japan) na temperaturi od 38 °C. Analizom je utvrđena aktivnost crijevne alkalne fosfataze i koncentracija ukupnih proteina. Aktivnost enzima određena je s obzirom na količinu ukupnih proteina u uzorku.



Slika 5. Uzorci tkiva u puferu prije (a) i nakon (b) homogenizacije

Izvor: Arhiva osobnih fotografija

Princip određivanja enzima crijevne alkalne fosfataze temelji se na fotometrijskom testu bojenja za kvantitativno određivanje alkalne fosfataze. Načelo testiranja utemeljeno je na preporukama IFCC–a (International Federation for Clinical Chemistry). Aktivnost alkalne fosfataze određuje se mjerenjem stope pretvorbe p–nitro–fenilfosfata (pNPP) u p–nitrofenol (pNP) u prisustvu Mg^{2+} i Zn^{2+} te 2–amino–2–metil–1–propanola (AMP) kao fosfatnog akceptora pri pH vrijednosti 10,4. Stopa promjene u apsorbanci tijekom formiranja pNP mjeri se bikromatski na 410/480 nm i direktno je proporcionalna aktivnosti alkalne fosfataze u uzorku. Analiza se odvija na principu slijedeće reakcije:

$$pNPP + AMP \xrightarrow{ALP \quad Mg^{2+}} pNP + AMP - PO_4$$

Rezultati provedenih analiza za aktivnost alkalne fosfataze automatski se izračunavaju za svaki uzorak. Test je linearan za raspon enzimske aktivnosti 5–1500 U/L (jedinica / litri). Kalibracija uređaja učinjena je putem komercijalnog kalibratora. Postupak kalibracije bazira se na bikromatskom eksincijskom koeficijentu za p–nitrofenol čija je molarna apsorbancija 17 900 na 410/480 nm.

Tablica 7. Sastav reagensa u testu aktivnosti alkalne fosfazate

2–amino–2–metil–1–propanol (AMP) na pH 10,4	0,35 mol / L
p–nitro–fenilfosfat	16 mmol / L
HEDTA	2 mmol / L
Cinkov sulfat	1 mmol / L
Magnezijev acetat	2 mmol / L
Konzervans	

Princip određivanja koncentracije ukupnih proteina temelji se na fotometrijskom testu bojenja za kvantitativno određivanje ukupnih proteina. Ukupni proteini zbroj su svih cirkulirajućih proteina te su jedan od glavnih sastojaka krvi. Mjerenja ukupnih proteina koriste se pri dijagnozi i liječenju bolesti jetre, bubrega, koštane srži te metaboličkih poremećaja. Načelo testiranja temeljeno je na reakciji Cu^{2+} u alkalnoj otopini. Bakrovi ioni reagiraju s proteinima i polipeptidima koji sadrže barem dvije peptide veze i stvaraju plavo–ljubičasti kompleks. Apsorpcija kompleksa pri 540/660 nm proporcionalna je koncentraciji proteina u uzorku. Analiza se obavlja na principu slijedeće reakcije:

$$protein + Cu^{2+} \xrightarrow{OH^-} plavo - ljubičasti\ kompleks$$

Rezultati provedenih analiza za ukupne proteine automatski se izračunavaju za svaki uzorak. Test je linearan za raspon koncentracije 30–120 g/L. Uređaj je potrebno kalibrirati u slučajevima promjena u reagens bočici, znatnih pomaka kontrolnih vrijednosti i prilikom održavanja ili zamjene ključnih dijelova analizatora jer atmosferski CO_2 može utjecati na preciznost prijašnje kalibracije.

Tablica 8. Sastav reagensa u testu koncentracije ukupnih proteina

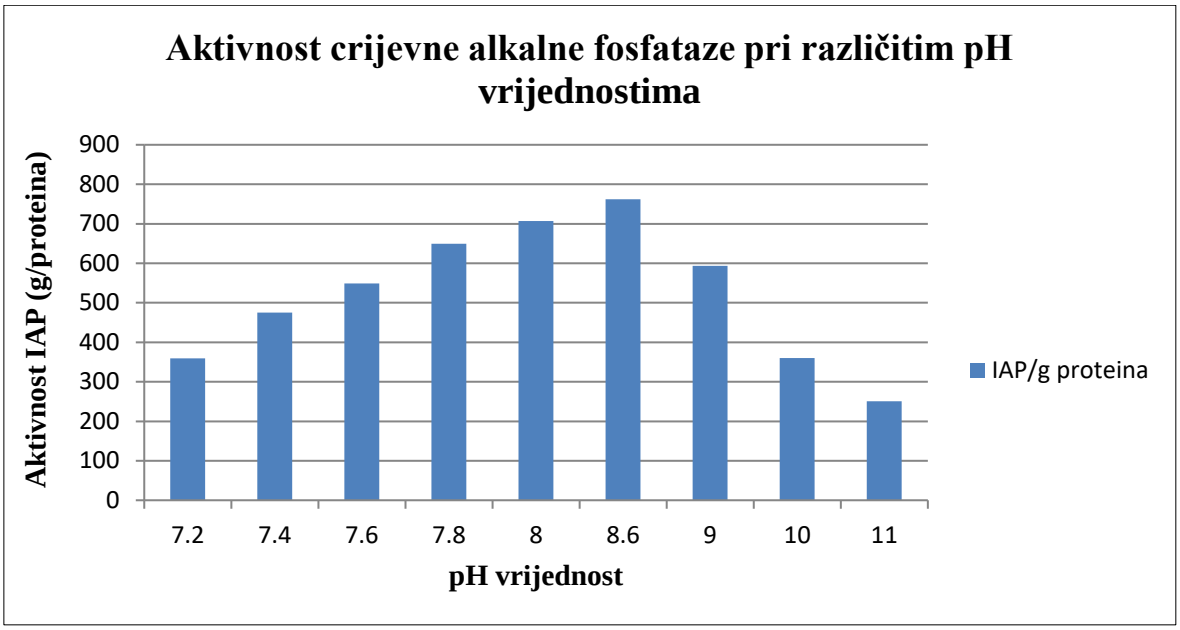
Natrijev hidroksid	200 mmol / L
Natrij – kalij tartarat	32 mmol / L
Bakrov sulfat	18,8 mmol / L
Kalijev jodid	30 mmol / L

5.3. Statistička obrada rezultata

Utvrđeni rezultati obrađeni su statističkim programom StatSoft, Inc. (2007.) STATISTICA. Razlike između srednjih vrijednosti promatranih skupina testirane su GLM one–way ANOVA testom te Fisherovim LSD *post hoc* testom na razini značajnosti $P<0,05$.

6. REZULTATI

Analizom uzoraka na različitim pH vrijednostima (7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8, 8,2, 8,4, 8,6, 8,8, 9, 10, 11) utvrđena je najviša aktivnost crijevne alkalne fosfataze na pH 8,6. Iz grafikona 1. vidljivo je da aktivnost enzima raste s porastom pH vrijednosti i dostiže maksimum pri pH 8,6.



Grafikon 1. Aktivnost crijevne alkalne fosfataze pri različitim pH vrijednostima

Utvrđena vrijednost crijevne alkalne fosfataze statistički se značajno ($P<0,05$) razlikovala u duodenumu između pokusnih skupina prasadi. Statistički značajne ($P<0,05$) razlike utvrđene su između skupine prasadi hranjene biofortificiranim žitaricama (P1) i kontrolne skupine (K) te skupine prasadi hranjene keliranim oblikom selena (P2). Između skupine prasadi hranjene organskim oblikom selena (P3) i skupine P1 nisu utvrđene statistički značajne ($P>0,05$) razlike. U ileumu se aktivnost IAP statistički značajno ($P>0,05$) nije razlikovala između pokusnih skupina. Najveću vrijednost aktivnosti enzima utvrđena je u P2 skupini prasadi hranjenoj keliranim oblikom selena, a nakon nje slijede skupine K, P1 te P3 odnosno kontrolna skupina, skupina prasadi hranjena biofortificiranim žitaricama te skupina prasadi hranjena organskim oblikom selena.

Tablica 9. Aktivnost crijevne alkalne fosfataze u sluznici tankog crijeva prasadi hranjene dodatkom različitih izvora selena

		K (Kontrola)	P1 (Biofortificirane žitarice)	P2 (Kelirani oblik Se)	P3 (Organski oblik Se)	P-vrijednost
Duodenum	$\bar{x}$	$376,25^{A}$	$598,35^{B}$	$408,93^{A}$	$461,87^{AB}$	0,03795
	Minimum	278,68	505,49	248,66	284,71	
	Maksimum	462,77	712,35	579,56	631,25	
	St. dev.	66,43	88,73	122,28	162,94	
Ileum	$\bar{x}$	496,14	450,50	557,37	435,31	0,50489
	Minimun	388,79	323,98	373,77	205,17	
	Maksimum	634,16	629,65	836,53	536,09	
	St. dev.	88,93	122,46	182,48	133,08	

$*^{AB}$ različita slova u eksponentu označavaju statistički značajne razlike srednjih vrijednosti između skupina

7. RASPRAVA

Karakteristika svih izomera alkalne fosfataze je djelovanje pri visokoj pH vrijednosti. Enzimska aktivnost unutar stanice ovisi o kontinuiranoj suradnji aktivatora i inhibitora te staničnoj dinamici hidroliziranja i iskorištavanja tvari koje ulaze.

Hinberg i Laidler (1973.) utvrđivali su optimalnu pH vrijednost pri kojoj aktivnost crijevne alkalne fosfataze iz epitelnog tkiva tankog crijeva kokoši postiže maksimalnu vrijednost. Aktivnost enzima utvrđena je stopom hidrolize p–nitrofenil fosfata u p–nitrofenol pri valnoj duljini 400 nm. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su kako IAP ima maksimalne vrijednosti kinetičkih parametara odnosno brzine (v, μmol/min po mg proteina) i Michaelis–Mentenove konstante (K_M, l/min po mg proteina) pri pH vrijednosti 9,6. Stvarna i optimalna pH vrijednost niža je kad se vrijednosti brzine i K_M konstante stave u odnos (v/K_M, l/min po mg proteina) i iznosi 8,5. Uz utvrđivanje optimalnog pH, autori su razjasnili kako su za reakcije defosforilacije potrebne aminokiseline s baznim ograncima u aktivnom mjestu ali ne sudjeluju u vezanju supstrata. Za vezanje supstrata potrebne su aminokiseline s pozitivno nabijenim odnosno kiselim ograncima te sulfhidrilna skupina cisteina ili hidroksilna skupina tirozina.

Ross i sur. (1951.) istraživali su povezanost optimalnog pH, aktivnosti crijevne alkalne fosfataze i koncentracije različitih supstrata na uzorcima epitelnog tkiva Wistar štakora. Enzimi su inkubirani u 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,005 i 0,003 mg/ml glicerofosfata u trajanju 1 sat. Najveća aktivnost crijevne alkalne fosfataze zabilježena je pri pH vrijednosti 9,13 odnosno pri maksimalnoj koncentraciji supstrata. Smanjenjem koncentracije supstrata uočena je značajna razlika u količini otpuštenih fosfatnih skupina i nižoj optimalnoj pH vrijednosti. Na koncentraciji supstrata od 5 mg/ml optimalni pH iznosi 9,08 dok pri najnižoj koncentraciji od 0,003 mg/ml pH vrijednost gotovo je neutralna, iznosi 7,35. Daljnjim istraživanjem autori su zaključili kako IAP ima različit afinitet prema različitim fosfatnim supstratima i stoga optimalni pH direktno ovisi o vrsti fosfatnog estera koji se koristi kao supstrat u različitim koncentracijama.

Uzorci epitelnog tkiva u ovom radu ispitivani su u širokom rasponu pH vrijednosti i optimalnom se pokazala pH vrijednost 8,6 (grafikon 1.) Utvrđena pH vrijednost ne odstupa mnogo od prijašnih istraživanja i prethodno utvrđenih optimalnih pH vrijednosti. Odstupanja se mogu pripisati fiziološkim karakteristikama i različitostima sluznice crijeva

(dužina resica i dubina kripti) između životinjskih vrsta, vrsti obroka i načinu hranidbe, okolišnim uvjetima te zdravstvenom stanju jedinke.

Fan i sur. (2001.) u svome istraživanju ovisnosti dužine resice i dubine kripti s aktivnošću enzima koje luče enterociti (crijevna alkalna fosfataza, aminopeptidaza N, saharaza, laktaza) navode kako postoje razlike u tim odnosima. Aktivnost crijevne alkalne fosfataze raste od dna kripte prema vrhu resice što znači da je alkalna fosfataza enzim apikalnih stanica u crijevnim resicama. Autori navode kako je enzim aktivniji u distalnim dijelovima tankog crijeva nego u proksimalnom. No kada se uspoređuje njihov rad s ovim istraživanjem, u obzir treba uzeti kako je prasad u njihovom pokusu zaklana u dobi 14 – 18 dana, a prasad za ovo istraživanje zaklana je u dobi 70 dana. Morfologija tankog crijeva i aktivnost enzima kod sisajuće i odrasle prasadi značajno se razlikuje zbog dobi i načina hranidbe. Kod sisajuće prasadi najaktivniji enzim je laktaza čija aktivnost opada nakon odbića kad raste aktivnost mnoštva različitih enzima koji vrše probavu različitih molekula.

Statistička analiza rezultata nakon provedenog istraživanja pokazala je kako postoje razlike u aktivnosti crijevne alkalne fosfataze između pokusnih skupina te između različitih segmenata tankog crijeva. Iz tablice 10. vidljivo je kako prasad hranjena biofortificiranim žitaricama ima najveću aktivnost enzima u duodenumu (P1>P3>P2>K). Folijarno tretiranje kukuruza i pšenice izvorom selena omogućilo je biljci akumulaciju selena u zrnu. U poglavlju 4.1. objašnjeno je da tako apsorbirani selen ima gotovo potpunu bioiskoristivost jer se u biljci nalazi pohranjen u obliku selenometionina. Organski oblik selena, to jest, selenometionin kojeg proizvode selenom obogaćeni kvasci u obrocima prasadi pokazuje dobar učinak na aktivnost crijevne alkalne fosfataze u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu prasadi hranjenu keliranim oblikom selena. Aktivnost crijevne alkalne fosfataze u ileumu pokazuje suprotne rezultate, najveća aktivnost zabilježena je kod skupine prasadi hranjene dodatkom keliranog oblika selena (P2>K>P1>P3). Iznenađujući rezultat je visoka aktivnost u kontrolnoj skupini, viša nego kod skupine prasadi hranjene biofortificiranim žitaricama i skupine hranjene organskim izvorom selena.

Razlike u aktivnosti IAP uočene su između različitih segmenata crijeva u istim pokusnim skupinama prasadi. U duodenumu je apsorbirano najviše selena iz biofortificiranih žitarica dok je u ileumu apsorpcija takvog oblika selena tek na trećem mjestu prema aktivnosti enzima. Aktivnost enzima u skupini prasadi hranjene organskim oblikom selena u duodenumu i ileumu ne razlikuje se značajno no vrlo značajne razlike

uočene su u skupini prasadi hranjenih keliranim oblikom selena. Kelirani oblici selena vezani su na druge minerale, najčešće cink (Zn–SeMet) i kao takvi ne mogu se apsorbirati odmah po ulasku u tanko crijevo jer se veze između dva minerala moraju pokidati kako bi usvajanje bilo učinkovito. Apsorpcija cinka primarno se odvija u jejunumu, segmentu crijeva koji se nalazi između duodenuma i ileuma, a nakon usvajanja, selenometionin prolazi dalje do ileuma gdje se usvaja kroz epitel i omogućuje višu aktivnost enzima nego što je određena u duodenumu.

Iz navedenih rezultata vidljivo je kako dodane količine selena bilo kojeg podrijetla u obroku utječu na povišenu aktivnost enzima u odnosu na kontrolnu skupinu prasadi. Primjena selena u obroku tijekom i nakon procesa odbića pomaže održavanju zdravstvenog statusa prasadi smanjenjem mogućnosti oboljenja od različitih bolesti koje zahvaćaju probavni sustav a uzrokovane su lipopolisaharidima odnosno Gram–negativnim bakterijama. Selen je prirodni antioksidans i stimulator imunosnog sustava koji pomaže u borbi protiv reaktivnih kisikovih vrsta i toplinskog stresa te stresa uzrokovanog odbićem prasadi od krmače. Pravilan rad imunosnog sustava omogućuje pravilan rad probavnog sustava, epitel crijeva kod prasadi hranjenih dodanim količinama selena ima duže crijevne resice s jačim i brojnijim mikroresicama. Zdrava prasad je vitalnija i otpornija te postižu veće dnevne priraste jer imaju višu apsorpciju nutrijenata koja je posljedica konzumiranja selena u obroku. Duže i zdravije crijevne resice odnosno enterociti crijevnih resica izlučuju veće količine alkalne fosfataze koja će uspješno obraniti organizam od patogenih uzročnika bolesti.

Bolji rezultati i izraženija aktivnost enzima mogu se postići i ranijom primjenom dodanih količina selena u obrok, dok prasad još aktivno siše, ali na raspolaganju imaju i drugi izvor hrane.

8. ZAKLJUČAK

U obrocima prasadi selen se može primjenjivati u organskim (selenometionin dobiven od selenom obogaćenih kvasaca, selenometionin, selenocistein) ili anorganskim (selenit, selenat) oblicima koji će se u većoj ili manjoj količini usvojiti kroz epitel tankog crijeva. Za maksimalnu učinkovitost i iskorištavanje preporučava se korištenje selena iz organskih izvora. Selen u obrocima krmača doprinosi povećanju porodne mase legla, prasad je zdravija i vitalnija te manje podložna obolijevanju. Kombinacija s crijevnom alkalnom fosfatazom rezultira pozitivnom uzročno–posljedičnom vezom koja se odražava na jači imunosni sustav, veću konzumaciju i konverziju hrane, bolje dnevne priraste, niže troškove liječenja i nižu stopu mortaliteta u osjetljivom razdoblju odbića te bolje krajnje ekonomske pokazatelje i nutritivna svojstva mesa.

9. LITERATURA

1. Bentala, H. i sur. (2002.): Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. SHOCK, 18 (6): 561 – 566

2. Bilski, J. i sur. (2017.): The role of intestinal alkaline phosphatase in inflammatory disorders of gastrointestinal tract. Hindawi, Mediators of Inflammation

3. Chatterjee, S. N. i Chaudhuri, K. (2012.): Gram – negative bacteria: The cell membranes. U: Chatterjee, S. N. i Chaudhuri, K. (ur.) Outer Membrane Vesicles of Bacteria. SpringBriefs in Microbiology, 15 – 34

4. Chen, J. i sur. (2016.): Selenium and vitamin E in sow diets: II. Effect on selenium status and antioxidant status of the progeny. Animal Feed Science and Technology, 221 (part A): 101 – 110

5. Domaćinović, M. (2006.): Selen, Se. U: Domaćinović, M. (ur.) Hranidba domaćih životinja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 101 – 102

6. Estaki, M. i sur. (2014.): Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity. World Journal of Gastroenterology, 20 (42): 15 650 – 15 656

7. Falk, M. i sur. (2018.): Effects of dietary sodium selenite and organic selenium sources on immune and inflammatory responses and selenium deposition in growing pigs. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. (Izdanje u tisku, https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X17309641)

8. Fan, M. Z. i sur. (2001.): Enterocyte digestive enzyme activity along the crypt – villus and longitudinal axes in the neonatal pig small intestine. American Society of Animal Science, 79: 371 – 381

9. Flohe, L. i sur. (1973.): Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. FEBS Letters, 32 (1): 132 – 134

10. Hinberg, I. i Laidler, K. J. (1973.): Influence of pH on the kinetics of reactions catalyzed by alkaline phosphatase. Journal of Biochemistry, 51: 1 096 – 1 103

11. Hoylaerts, M. F. i sur. (1992.): Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ – cell alkaline phosphatase. Biochemical Journal, 286: 23 – 30

12. Hoylaerts, M. F. i sur. (1997.): Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. The Journal of Biological Chemistry, 272 (36): 22 781 – 22 787

13. Kozlenkov, A. i sur. (2002.): Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. The Journal of Biological Chemistry, 277 (25): 22 992 – 22 999

14. Kozlenkov, A. i sur. (2004.): Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue – nonspecific alkaline phosphatase. Journal of Bone and Mineral Research. American Society for Bone and Mineral Research, 19 (11): 1 862 – 1 872

15. Lackeyram, D. A. i sur. (2010.): Early weaning reduces small intestinal alkaline phosphatase expression in pigs. American Society for Nutrition, The Journal of Nutrition, 140 (3): 461 – 468

16. Lackeyram, D. A. (2012.): Expression of the small intestinal apical membrane hydrolases in early – weaned piglet. PhD Thesis. University of Guelph. Guelph, Ontario,

17. Lallès, J. – P. (2010.): Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostatis and modulation by diet. Nutrition Reviews, 68 (6): 323 – 332

18. Lallès, J. – P. (2014.): Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. Nutrition Reviews, 72 (2): 82 – 94

19. Le Du, M. H. i sur. (2001.): Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1,8 Å resolution. The Journal of Biological Chemistry, 276 (12): 9 158 – 9 165

20. Le Du, M. H. i Millán, J. – L. (2002.): Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. The Journal of Biological Chemistry, 277 (51): 49 808 – 49 814

21. Liu, F. i sur. (2016.): Selenium i vitamin E together improve intestinal epithelial barrier function and alleviate oxidative stress in heat – stressed pigs. Experimental Physiology, 101 (7): 801 – 810

22. Maldonado, R. F. i sur. (2016.): Lipopolysaccharide modification in Gram – negative bacteria during chronic infection. FEMS Microbiology Reviews, 40: 480 – 493

23. Malo, M. S. i sur. (2004.): Thyroid hormone positively regulates the enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase gene via atypical response element. Molecular Endocrinology, 18 (8): 1 941 – 1 962

24. Malo, M. S. i sur. (2010.): Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. British Medical Journal, 59: 1 476 – 1 484

25. Meija, J. i sur. (2016.): Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 88 (3): 265 – 291

26. Melo, A. D. B. i sur. (2016a.): Intestinal alkaline phosphatase and sodium butyrate may be beneficial in attenuating LPS – induced intestinal inflammation. Genetics and Molecular Research, 15 (4):

27. Melo, A. D. B. i sur. (2016b.): Intestinal alkaline phosphatase: Potential roles in promoting gut health in weanling piglets and its modulation by feed aditives – A review. Asian – Australasian Journal of Animal Sciences, 29 (1): 16 – 22

28. Millán, J. – L. (2006a.): Alkaline phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamiliy of enzymes. Purinergic Signalling, 2: 335 – 341

29. Millán, J. – L. (2006b.): Protein structure and functional domains.U: Millán, J. – L. (ur.) Mammalian alkaline phosphatases: From biology to applications in medicine and biotechnology. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 22 – 56

30. Morris, J. S. i sur. (1983.): Dietary selenium in human toenails as an indicator. Biological Trace Element Research, 5: 529 – 537

31. National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements. Selenium, Fact sheet for health professionals. 02. 03. 2018. (https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/). 22. 05. 2018.

32. Post, K. W. (2012.): Overview of bacteria. U: Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G. W. (ur.) Diseases of swine, 10th edition. John Wiley and Sons, Inc., 649 – 653

33. Reamer, D. C. i Veillon, C. (1983): A double isotope dilution method for using stable selenium isotopes in metabolic tracer studies: analysis by gas chromatography / mass spectrometry (GC / MC). Journal of Nutrition, 113: 786 – 792

34. Ross, M. H. i sur. (1951.): Alkaline phosphatase activity and pH optima. Journal of Biological Chemistry. 192: 561 – 568

35. Royal Society of Chemistry. Periodic Table. 2017. (http://www.rsc.org/periodic-table/element/34/selenium). 22. 05. 2018.

36. Sun, L. – H. i sur. (2016.): Respons of selenium and selenogenome in immune tissues to LPS – induced inflammatory reaction in pigs. Biological Trace Element Research, 177 (1): 90 – 96

37. Terry, E. N. i Diamond, A. M. (2012.): Selenium. U: Erdman Jr., J. W., Macdonald, I. A., Zeisel, S. H. (ur.) Present knowledge in nutrition, 10th edition. Wiley – Blackwell, 568 – 585

38. The EFSA Journal (2008.): Selenium – enriched yeast as source for selenium added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses and foods (including food supplements) for the general population. 766, 1 – 42

39. Wang, X. i Quinn, P. J. (2010a.): Endotoxins: Lipopolysaccharides of Gram – negative bacteria. U: Wang, X. i Quinn, P. J. (ur.) Endotoxins: Structure, function and recognition. Springer Science + Business Media, 3 – 25

40. Wang, X. i Quinn, P. J. (2010b.): Lipopolysaccharide: Biosinthetic pathway and structure modification. Progress in Lipid Research, 49: 97 – 101

41. Yang, Y. (2013.): Investigation into the regulation and function of alkaline phosphatase (ALP) in host – microbe interactions. A dissertation. University of Oregon Graduate School

42. Yin, J. i sur. (2014.): Development of an antioxidant system after early weaning in piglets. American Society of Animal Science. Journal of Animal Science. 92, 612 – 619

43. Zenagui S. i sur. The benefits of pure organic selenium. 13. 11. 2017. (https://www.pigprogress.net/Piglets/Articles/2017/11/The-benefits-of-pure-organic-selenium-209475E/?dossier=34961&widgetid=0). 22. 05. 2018.

10. SAŽETAK

Crijevna alkalna fosfataza jedan je od četiri izoenzima alkalne fosfataze koja ima brojne funkcije u organizmu, između ostalih defosforilaciju toksičnih lipopolisaharida koji su sastavni dio vanjske stijenke Gram–negativnih bakterija. Izlučuju je enterociti crijevnih resica koje štiti od atrofije uzrokovane bolestima pa se može reći da postoji pozitivna povratana sprega između visine crijevnih resica i količine izlučene crijevne alkalne fosfataze. Selen je mikroelement koji djeluje kao pojačivač imunosnog sustava i antioksidans, izgrađuje selenoproteine od kojih je najpoznatija glutation peroksidaza. Glutation peroksidaza djeluje u očuvanju staničnih membrana i nukleinskih kiselina koje se oštećuju tijekom oksidativnog stresa uzrokovanog reaktivnim kisikovim vrstama. Različiti izvori dodanih količina selena u obroku prasadi povećavaju aktivnost crijevne alkalne fosfataze. Najoptimalniji izvor selena je organski selen u obliku selenometionina jer posjeduje vrlo visoku bioiskoristivnost u organizmu. Prasad u odbiću prolazi stresno razdoblje u kojem se često pojavljuju enteritičke bolesti i dijareja, a zaštitna uloga selena i detoksifikacijska uloga alkalne fosfataze pomaže organizmu u prevenciji razvoja toksičnih bakterija. Prasad s jačim imunosnim sustavom prije postiže završnu tjelesnu masu jer ima bolju konverziju hrane i veće dnevne priraste.

Ključne riječi: crijevna alkalna fosfataza, selen, lipopolisaharidi, prasad, odbiće

11. SUMMARY

Intestinal alkaline phosphatase is one out of four isoenzymes of alkaline phosphatase which has numerous functions in the organism, including dephosphorylation of toxic lipopolysaccharides that are a key component of the outer wall of Gram–negative bacteria. It is secreted by intestinal enterocytes which protects against atrophy caused by diseases, so it can be said that there is a positive correlation between the height of the villus and the amount of excreted intestinal alkaline phosphatase. Selenium is a microelement that acts like a immune system booster and an antioxidant. It forms selenoproteins, and one of the most known is glutathione peroxidase. Glutathione peroxidase takes part in perservation of cell membranes and nucleic acids that are damaged during oxidative stress which is caused by reactive oxygen species. Various sources of excess quantities of selenium in pigs food increase the activity of intestinal alkaline phosphatase. The most optimal source of selenium is the organic selenium in the form of selenomethionine because it has a high percentage of bioavailability in the organism. Piglets in weaning goes through a stress period in which it is common for diseases like enteritis and diarrhoea and the protective role of selenium and the detoxifying role of alkaline phosphatase aids the organism in prevention of the development of toxic bacteria. Pigs with better immunity reach their final body mass faster because they have better conversion of food and larger daily increments.

Key words: intestinal alkaline phosphatase, selenium, lipopolysaccharides, piglets, weaning

12. POPIS TABLICA

Tablica 1. Gram – negativne bakterije i bolesti odnosno klinički znakovi do kojih dovode.....15

Izvor: Post (2012.)

Tablica 2. Gram – negativne bakterije i bolesti koje uzrokuju u probavnom sustavu.....15

Izvor: Chatterjee i Chaudhuri (2012.)

Tablica 3. Morfologija mukoznog sloja jejunuma kod skupine sisajuće prasadi i skupine odbijene prasadi.....19

Izvor: Lackeyram i sur. (2010.)

Tablica 4. Kinetička svojstva IAP kod skupine sisajuće prasadi i odbijene prasadi.....20

Izvor: Lackeyram i sur. (2010.)

Tablica 5. Hranjiva i enegretska vrijednost smjese u pokusu.....27

Tablica 6. Sirovinski sastav smjese za prasad u pokusu.....28

Tablica 7. Sastav reagensa u testu aktivnosti alkalne fosfazate.....31

Tablica 8. Sastav reagensa u testu koncentracije ukupnih proteina.....31

Tablica 9. Aktivnost crijevne alkalne fosfataze u sluznici tankog crijeva prasadi hranjene dodatkom različitih izvora selena.....34

13. POPIS SLIKA

Slika 1. Struktura PLAP.....4

Izvor: Le Du i sur. (2001.)

Slika 2. Površina monomera svih izoenzima alkalne fosfataze.....6

Izvor: Le Du i Millán (2002.)

Slika 3. Stanični zid Gram – negativne bakterije (a). Struktura lipopolisaharida (b).....13

Izvor: https://microbeonline.com/lipopolysaccharide-lps-of-gram-negative-bacteria-characteristics-and-functions/

Slika 4. Crijevna alkalna fosfataza održava homeostazu u probavnoj cijevi.....17

Izvor: Estaki i sur. (2014.)

Slika 5. Uzorci tkiva u puferu prije (a) i nakon (b) homogenizacije.....30

Izvor: Arhiva osobnih fotografija

14. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Aktivnost crijevne alkalne fosfataze pri različitim pH vrijednostima.....33

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera **Diplomski rad**
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij, smjer Specijalna zootehnika

AKTIVNOST CRIJEVNE ALKALNE FOSFATAZE U PRASADI HRANJENE RAZLIČITIM IZVORIMA SELENA

Ana Drašner

Sažetak

Crijevna alkalna fosfataza jedan je od četiri izoenzima alkalne fosfataze koja ima brojne funkcije u organizmu, između ostalih defosforilaciju toksičnih lipopolisaharida koji su sastavni dio vanjske stijenke Gram–negativnih bakterija. Izlučuju je enterociti crijevnih resica koje štiti od atrofije uzrokovane bolestima pa se može reći da postoji pozitivna povratana sprega između visine crijevnih resica i količine izlučene crijevne alkalne fosfataze. Selen je mikroelement koji djeluje kao pojačivač imunosnog sustava i antioksidans, izgrađuje selenoproteine od kojih je najpoznatija glutation peroksidaza. Glutation peroksidaza djeluje u očuvanju staničnih membrana i nukleinskih kiselina koje se oštećuju tijekom oksidativnog stresa uzrokovanog reaktivnim kisikovim vrstama. Različiti izvori dodanih količina selena u obroku prasadi povećavaju aktivnost crijevne alkalne fosfataze. Najoptimalniji izvor selena je organski selen u obliku selenometionina jer posjeduje vrlo visoku bioiskoristivnost u organizmu. Prasad u odbiću prolazi stresno razdoblje u kojem se često pojavljuju enteritičke bolesti i dijareja, a zaštitna uloga selena i detoksifikacijska uloga alkalne fosfataze pomaže organizmu u prevenciji razvoja toksičnih bakterija. Prasad s jačim imunosnim sustavom prije postiže završnu tjelesnu masu jer ima bolju konverziju hrane i veće dnevne priraste.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Mentor: doc. dr. sc. Mislav Đidara

Broj stranica: 55
Broj grafikona i slika: 6
Broj tablica: 9
Broj literaturnih navoda: 43
Broj priloga:
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: crijevna alkalna fosfataza, selen, lipopolisaharidi, prasad, odbiće

Datum obrane: 25. 09. 2018.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. prof. dr. sc. Marcela Šperanda, predsjednica
2. doc. dr. sc. Mislav Đidara, mentor
3. prof. dr. sc. Matija Domaćinović, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1

BASIC DOCUMENTATION CARD
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate thesis**
Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek
University Graduate Studies, Special zootechnique, course

ACTIVITY OF INTESTINAL ALKALINE PHOSPHATASE IN PIGLETS FED WITH DIFFERENT SELENIUM SOURCES

Ana Drašner

Summary

Intestinal alkaline phosphatase is one out of four isoenzymes of alkaline phosphatase which has numerous functions in the organism, including dephosphorylation of toxic lipopolysaccharides that are a key component of the outer wall of Gram-negative bacteria. It is secreted by intestinal enterocytes which protects against atrophy caused by diseases, so it can be said that there is a positive correlation between the height of the villus and the amount of excreted intestinal alkaline phosphatase. Selenium is a microelement that acts like a immune system booster and an antioxidant. It forms selenoproteins, and one of the most known is glutathione peroxidase. Glutathione peroxidase takes part in perservation of cell membranes and nucleic acids that are damaged during oxidative stress which is caused by reactive oxygen species. Various sources of excess quantities of selenium in pigs food increase the activity of intestinal alkaline phosphatase. The most optimal source of selenium is the organic selenium in the form of selenomethionine because it has a high percentage of bioavailability in the organism. Piglets in weaning goes through a stress period in which it is common for diseases like enteritis and diarrhoea and the protective role of selenium and the detoxifying role of alkaline phosphatase aids the organism in prevention of the development of toxic bacteria. Pigs with better immunity reach their final body mass faster because they have better conversion of food and larger daily increments.

Thesis performed at: Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek
Mentor: doc. dr. sc. Mislav Đidara

Number of pages: 55
Number of figures: 6
Number of tables: 9
Number of references: 43
Number of apendices:
Original in: Croatian

Key words: intestinal alkaline phosphatase, selenium, lipopolysaccharides, piglets, weaning

Thesis defended on date: 25. 09. 2018

Reviewers:
1. prof. dr. sc. Marcela Šperanda, president
2. doc. dr. sc. Mislav Đidara, mentor
3. prof. dr. sc. Matija Domaćinović, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1