

REPUBLIKA HRVATSKA  
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

**Neška Vukšić, mag. ing. agr.**

**UTJECAJ SELENA NA RASPODJELU TEŠKIH METALA U TKIVIMA  
JELENA LOPATARA (*Dama dama L.*)**

DOKTORSKI RAD

Osijek, 2015.

REPUBLIKA HRVATSKA  
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
U OSIJEKU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

**Neška Vukšić, mag. ing. agr.**

**UTJECAJ SELENA NA RASPODJELU TEŠKIH METALA U TKIVIMA  
JELENA LOPATARA (*Dama dama L.*)**

- Doktorski rad -

Osijek, 2015.

REPUBLIKA HRVATSKA  
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
U OSIJEKU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

**Neška Vukšić, mag. ing. agr.**

**UTJECAJ SELENA NA RASPODJELU TEŠKIH METALA U TKIVIMA  
JELENA LOPATARA (*Dama dama L.*)**

- Doktorski rad -

Mentor: prof. dr. sc. Marcela Šperanda

**Povjerenstvo za ocjenu:**

- 1. prof. dr. sc. Tihomir Florijančić, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, predsjednik**
- 2. prof. dr. sc. Marcela Šperanda, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentor i član**
- 3. prof. dr. sc. Zdenko Lončarić, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član**
- 4. prof. dr. sc. Matija Domaćinović, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član**
- 5. doc. dr. sc. Siniša Ozimec, docent Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član**

Osijek, 2015.

REPUBLIKA HRVATSKA  
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
U OSIJEKU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

**Neška Vukšić, mag. ing. agr.**

**UTJECAJ SELENA NA RASPODJELU TEŠKIH METALA U TKIVIMA  
JELENA LOPATARA (*Dama dama L.*)**

- Doktorski rad -

**Mentor: prof. dr. sc. Marcela Šperanda**

**Javna obrana doktorskog rada održana je 10. srpnja 2015. godine pred  
Povjerenstvom za obranu:**

- 1. prof. dr. sc. Tihomir Florijančić, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, predsjednik**
- 2. prof. dr. sc. Marcela Šperanda, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentor i član**
- 3. prof. dr. sc. Zdenko Lončarić, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član**
- 4. prof. dr. sc. Matija Domaćinović, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član**
- 5. doc. dr. sc. Siniša Ozimec, docent Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član**

Osijek, 2015.

## **ZAHVALA**

*Ovim doktorskim radom zaokružuje se jedno lijepo i intenzivno razdoblje u mom životu. Mnogi lijepi i teški trenutci dio su ovoga rada.*

*Iskrene zahvale Hrvatskom lovačkom savezu i predsjedniku Đuri Dečaku na financiranju pokusa, bez Vaše pomoći ovaj doktorski rad sigurno nebi ovako izgledao.*

*Zahvaljujem svim djelatnicima Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku koji su pomogli u izradi ovog rada, kao i svima ostalima koji su na bilo koji način pomogli tijekom moga dokorskog studija.*

*Veliko hvala prof. dr. sc. Marceli Šperandi, mojoj mentorici, na ukazanom povjerenju, strpljenju i prenesenom znanju kroz sve godine mojeg diplomskog i dokorskog studija. Hvala Vam na velikoj znanstvenoj i prijateljskoj podršci, uveli ste me u svijet znanosti i bili ste mi puno više od mentorice. Brojni zajednički razgovori dali su mi snagu u trenucima kada mi je bilo najteže.*

*Na kraju, najveće hvala mojim roditeljima Nenadu i Đurđi i bratu Bojanu za ljubav i povjerenje koje su imali u mene. Hvala za trud i samoodricanje kao i za pružanje podrške tijekom cijelog mog obrazovnog puta od prvoškolske klupe do dokorskog rada.*

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorski rad

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Poslijediplomski doktorski studij: Poljoprivredne znanosti

Smjer: Lovstvo i kinologija

UDK:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda

Grana: Lovstvo

**Utjecaj selen na raspodjelu teških metala u tkivima jelena lopatara (*Dama dama* L.)**

**Neška Vukšić, mag. ing. agr.**

**Rad je izrađen na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Mentor: Prof. dr. sc. Marcela Šperanda**

**Sažetak:** Svrha ovoga istraživanja bila je utvrditi koncentraciju teških metala (Cd, Pb, Hg i As) i esencijalnih elemenata (Fe i Se) u tkivima jelena lopatara (mišić, bubreg, jetra, masno tkivo i slezena) prije dodavanja selen u hranu i nakon toga kako bi smo utvrdili međudjelovanje selen s teškim metalima u tkivima i utjecaj dodatka selen na imunohematološke (KKS i DKS), biokemijske (GUK, UREA, CRE, ALB, TGC, KOL, HLD, LDL, Fe, TP, GLOB i IgG) pokazatelje i pokazatelje oksidacijskog stresa (SOD, GPx, GSH i vitamin E). Istraživanje je provedeno na 40 jelena lopatara koji su odstrijeljeni u sezoni lova tijekom dvije godine istraživanja. Napravljena je i analiza staništa koja je obuhvaćala analize tla, listinca, prizemne flore i prihrane. Dopunska hranidba uz dodatak selen (0,5 mg/kg) provodila se 60 dana tijekom druge godine istraživanja. Tijekom prve godine istraživanja utvrđene su povećane koncentracija Cd i Pb u tkivima jelena lopatara, dok je koncentracija Se bila niska. Nakon dopunske hranidbe uz dodatak selen utvrđena je manja koncentracija teških metala u tkivima i poboljšana je antioksidativna zaštita. Dodatak selen nije imao negativan učinak na ostale ispitane parametre.

**Broj stranica:** 158

**Broj slika:** 14

**Broj tablica:** 48

**Broj literaturnih navoda:** 492

**Jezik izvornik:** hrvatski

**Ključne riječi:** jelen lopatar, teški metali, selen, antioksidativna zaštita, imunost jelena lopatara

**Datum obrane:** 10.07.2015.

**Povjerenstvo za obranu:**

1. **prof. dr. sc. Tihomir Florijančić** – predsjednik
2. **prof. dr. sc. Marcela Šperanda** – mentor i član
3. **prof. dr. sc. Zdenko Lončarić** – član
4. **prof. dr. sc. Matija Domaćinović** – član
5. **doc. dr. sc. Siniša Ozimec** – član

**Rad je pohranjen u:** Nacionalna i sveučilišna knjižnica u Zagrebu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilište u Rijeci, Sveučilište u Splitu

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek**

**PhD thesis**

**Faculty of Agriculture in Osijek**

**Postgraduate study: Agricultural sciences**

**Course: Hunting and cynology**

**UDK:**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences**

**Scientific Field: Agriculture**

**Branch: Hunting**

**Effect of selenium on the distribution of heavy metals in tissues of fallow deer (*Dama dama* L.)**

**Neška Vukšić, mag. ing. agr.**

**Thesis performed at Faculty of Agriculture in Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek**

**Supervisor: Prof. dr. sc. Marcela Šperanda**

**Short abstract:** The aim of this study was to determine the concentration of heavy metals (Cd, Pb, Hg and As) and essential elements (Fe and Se) in fallow deer tissues (muscle, kidney, liver, adipose tissue and spleen) before the addition of selenium in the food and after that to determine the interaction of selenium with heavy metals in the tissues and the influence of selenium on immunohaematological (CBC and WBC), biochemistry (glucose, urea, CRE, ALB, TGC, KOL, HLD, LDL, Fe, TP, GLOB, IgG) indicators and indicators of oxidative stress (SOD, GPx, GSH and vitamin E). The research was conducted on 40 fallow deer that were shot in the hunting season during the two years of research. Analysis of habitat included analyzes of soil, tree leaves, grasses and fodders. Supplemental nutrition with the addition of selenium (0.5 mg/kg) carried out for 60 days in the second year of research. During the first year of the experiment there was increased concentrations of Cd and Pb in the tissues of fallow deer and concentration of Se was low. After supplementary feeding with the addition of selenium concentration of heavy metals in the tissues was lower and antioxidant protection was improved. Addition of selenium had no negative impact on other tested parameters.

**Number of pages:** 158

**Number of figures:** 14

**Number of tables:** 48

**Number of references:** 492

**Original in:** croatian

**Key words:** fallow deer, heavy metals, selenium, antioxidant protection, immunity of fallow deer.

**Date of the thesis defense:** 10.07.2015.

**Reviewers:**

- 1. prof. dr. sc. Tihomir Florijančić** – president
- 2. prof. dr. sc. Marcela Šperanda** – mentor and member
- 3. prof. dr. sc. Zdenko Lončarić** – member
- 4. prof. dr. sc. Matija Domaćinović** – member
- 5. doc. dr. sc. Siniša Ozimec** – member

**Thesis deposited in:** National and University Library, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, University of Zagreb; University of Rijeka; University of Split

## KAZALO

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Pregled literature</b> .....	3
1.1.1. Zoološka klasifikacija jelena lopatara.....	3
1.1.2. Rasprostranjenost jelena lopatara.....	4
1.1.3. Biologija i morfologija jelena lopatara.....	4
1.1.4. Uzgoj jelena lopatara.....	6
<b>1.2. Teški metali</b> .....	7
1.2.1. Kadmij.....	11
1.2.2. Olovo.....	13
1.2.3. Živa.....	14
1.2.4. Arsen.....	15
1.2.5. Željezo.....	16
1.2.6. Zakonodavstvo vezano za teške metale u mesu.....	17
<b>1.3. Biljke i teški metali</b> .....	18
<b>1.4. Selen i biološka uloga u višestaničnim organizmima</b> .....	20
1.4.1. Biološka funkcija selenoproteina.....	22
1.4.2. Prirodni izvori selena i metabolički put u organizmu sisavaca.....	23
<b>1.5. Implikacija selena i teških metala</b> .....	24
1.5.1. Međudjelovanje kadmija i selena.....	25
1.5.2. Međudjelovanje olova i selena.....	26
1.5.3. Međudjelovanje žive i selena.....	27
1.5.4. Međudjelovanje arsena i selena.....	28
<b>1.6. Hematološki i biokemijski pokazatelji</b> .....	28
1.6.1. Metaboliti.....	29
1.6.1.1. Glukoza.....	30
1.6.1.2. Urea.....	30



1.6.1.3. Ukupni proteini.....	31
1.6.1.4. Globulini.....	31
1.6.1.5. Imunoglobulini.....	32
1.6.1.6. Trigliceridi.....	33
1.6.1.7. Kolesterol.....	33
1.6.1.8. LDL i HDL kolesterol.....	34
1.6.1.9. Željezo.....	34
<b>1.7. Enzimi antioksidativnog statusa.....</b>	<b>35</b>
1.7.1. Glutation peroksidaza (GPx).....	36
1.7.2. Superoksid dismutaza (SOD).....	37
1.7.3. Glutation (GSH).....	37
1.7.4. Vitamin E.....	39
<b>1.8. Cilj istraživanja.....</b>	<b>40</b>
<b>2. MATERIJAL I METODE RADA.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1. MATERIJAL.....</b>	<b>41</b>
2.1.1. Područje određivanja rasprostranjenosti teških metala u jelena lopatara.....	41
2.1.2. Topografija kretanja i prihrane lovne divljači na području otvorenog lovišta "KRNDIJA II".....	42
2.1.3. Kartografski prikaz mjesta odstrjela jelena lopatara tijekom dviju godina istraživanja.....	43
2.1.4. Dopunska hranidba jelena lopatara.....	46
2.1.5. Biljne zajednice na području otvorenog lovišta "KRNDIJA II".....	48
2.1.6. Uzorkovanje životinjskog materijala.....	50
<b>2.2. METODE.....</b>	<b>51</b>
2.2.1. Kemijska analiza krmiva za prihranu, listinca i prizemne flore.....	51
2.2.2. Kemijska analiza tla.....	51
2.2.3. Agrokemijski pokazatelji svojstava tla.....	52

2.2.4. Određivanje koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u tlu, listincu, prizemnoj flori, krmivima za prihranu i tkivima jelena lopatara.....	53
2.2.5. Određivanje hematoloških pokazatelja.....	53
2.2.5.1. Kompletna krvna slika i diferencijalna krvna slika.....	53
2.2.6. Određivanje biokemijskih pokazatelja.....	54
2.2.6.1. Određivanje koncentracije metabolita u serumu.....	54
2.2.6.2. Određivanje koncentracije imunoglobulina G u serumu ELISA metodom.....	54
2.2.7. Određivanje enzima antioksidativnog statusa.....	55
2.2.7.1. Određivanje koncentracije glutacione peroksidaze i superoksid dismutaze u plazmi.....	55
2.2.7.2. Određivanje koncentracije glutationa u plazmi.....	55
2.2.7.3. Određivanje koncentracije vitamina E u serumu ELISA metodom.....	56
2.2.8. Statističke metode.....	56
<b>3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1. Tlo, listinac, prizemna flora i krmna smjesa za jelensku divljač.....</b>	<b>57</b>
3.1.1. Kemijska analiza tla i koncentracija teških metala i esencijalnih elemenata u tlu.....	57
3.1.2. Kemijski sastav listinca, prizemne flore i krmne smjese za jelensku divljač tijekom prve i druge godine istraživanja.....	60
3.1.3. Teški metali i esencijalni elementi u listincu, prizemnoj flori i krmnoj smjesi za jelensku divljač tijekom prve i druge godine istraživanja.....	63
<b>3.2. Koncentracija teških metala i esencijalnih elemenata u tkivima jelena lopatara tijekom prve i druge godine istraživanja.....</b>	<b>66</b>
<b>3.3. Imunohematološki pokazatelji u jelena lopatara tijekom prve i druge godine istraživanja.....</b>	<b>75</b>
3.3.1. Biokemijski pokazatelji u jelena lopatara tijekom prve i druge godine istraživanja.....	78

3.3.2. Pokazatelji humoralne imunosti u jelena lopatara tijekom prve i druge godine istraživanja.....	79
<b>3.4. Pokazatelji antioksidacijske zaštite i oksidacijskog stresa u jelena lopatara tijekom prve i druge godine istraživanja.....</b>	<b>81</b>
<b>3.5. Poredbeni učinak dodatka veće koncentracije selena u hrani jelena lopatara na koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata, staničnu i humoralnu imunost i pokazatelje antioksidacije.....</b>	<b>83</b>
3.5.1. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u listincu, prizemnoj flori i krmnoj smjesi za jelensku divljač prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.....	83
3.5.2. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u tkivima jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.....	85
3.5.3. Poredbeni prikaz imunohematoloških pokazatelja u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.....	89
3.5.4. Poredbeni prikaz biokemijskih pokazatelja u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.....	90
3.5.5. Poredbeni prikaz pokazatelja humoralne imunosti u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.....	91
3.5.6. Poredbeni prikaz antioksidacijske zaštite i oksidacijskog stresa u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.....	92
<b>4. RASPRAVA.....</b>	<b>93</b>
4.1. Tlo, biljne zajednice i prihrana jelena lopatara.....	93
4.2. Teški metali i esencijalni elementi u tkivima jelena lopatara.....	101
4.3. Imunohematološki i biokemijski pokazatelji u jelena lopatara.....	107
4.4. Antioksidativni status u jelena lopatara.....	110
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>114</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>116</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>156</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>157</b>

<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	158
------------------------	-----

## TUMAČ KRATICA

AE1	anion transportni protein
Ag	srebro
Al	aluminij
Al <sup>3+</sup>	aluminijev ion
As	arsen
ATP	adenozin trifosfat
B	bor
Be	berilij
Ca	kalcij
CaCO <sub>3</sub>	kalcijev karbonat
CAT	katalaza
Cd	kadmij
cGPx	citosolna glutation peroksidaza
CO-	karbonilna skupina
Co	kobalt
CO <sub>2</sub>	ugljičkov dioksid
Cr	krom
Cu	bakar
Cu/Zn SOD	citosolna superoksid dismutaza
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EcSOD	izvanstanična superoksid dismutaza
FcRn	neonatalni Fc receptor
Fe	željezo
Fe <sup>2+</sup>	divalentno željezo
Fe <sup>3+</sup>	trovalentno željezo

GABA	gama-aminomaslačna kiselina
GGT	glutation transferaza
GLS	glutation sintetaza
GPx	glutation peroksidaza
GPx1	mitohondrijska glutation peroksidaza
GPx3	izvanstanična glutation peroksidaza
GPx4	fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation
GSSG	glutation disulfid
H <sup>+</sup>	vodikov ion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
HCT	hematokrit
HDL	lipoproteini velike gustoće
Hg	živa
HGB	hemoglobin
Ig	imunoglobulin
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
K	kalij
LDL	lipoproteini male gustoće
MCH	prosječna masa hemoglobina po eritrocitu
MCHC	prosječna koncentracija hemoglobina u 1L obujma eritrocita
MCV	prosječni volumen eritrocita

MDA	malondialdehid
MDK	maksimalno dopuštene količine
Mg	magnezij
Mn	mangan
Mn <sup>2+</sup>	manganov (II) ion
MnSOD	mitohondrijska superoksid dismutaza
MT	metalotionein
Mo	molibden
Na <sup>+</sup>	natrijev ion
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
NaOH	natrijev hidroksid
-NH <sub>2</sub>	amino skupina
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	amonijev kation
Ni	nikal
·OH	hidroksilni radikal
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superoksidni anion
P	fosfor
Pb	olovo
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	fosfor pentoksid
RBC	eritrociti
RNA	ribonukleinska kiselina
RNS	reaktivni dušikovi spojevi
ROOH	hidroperoksid
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
Se	selen
-SH	sulfhidrilna skupina
SOD	superoksid dismutaza

T3	trijodtironin
T4	tiroksin
V	vanadij
WBC	leukociti
Zn	cink



## 1. UVOD

Elementi poput kadmija, žive, olova i arsena, sastavnim su dijelom Zemljine biosfere, oni se ne razgrađuju već kruže u prirodi u različitim oksidacijskim i kemijskim oblicima. Čovjek svojim djelovanjem povećava prirodno prisutne razine tih elemenata u okolišu. Oni u određenim količinama mogu biti štetni, a toksični učinci ovise o unesenoj koncentraciji, kemijskom obliku i oksidacijskom stanju. Toksičnost teških metala uključuje blokiranje funkcionalnih skupina enzima, polinukleotida, transportnog sustava za esencijalne hranjive tvari i ione. Toksični metali su Pb, Cd i Hg, dok je za Cr i As dokazano i povoljno djelovanje kod nekih vrsta u određenim oksidacijskim oblicima i koncentracijama. Arsen u malim količinama ima povoljan metabolički učinak. Glavne osobine teških metala su: imaju sposobnost nakupljanja u organizmu, ograničena mogućnost detoksikacije, sporo se izlučuju iz organizma i toksično djeluju na pluća, bubrege, jetru i probavne organe. Iako su neki teški metali bitni mikronutrienti za životinje, biljke i mnoge mikroorganizme, svi pokazuju toksične učinke na žive organizme uzrokujući metaboličke smetnje i mutagenezu. Mehanizam toksičnosti teških metala može se pratiti do metaboličkih smetnji vezanih za sintezu enzima ili DNA replikaciju.

Divljač se smatra pogodnim bioindikatorom onečišćenosti okoliša, tako su pronađeni Pb i Cd u tkivima jetre i bubrega jelena običnog (*Cervus elaphus* L.), divlje svinje (*Sus scrofa* L.), srne obične (*Capreolus capreolus* L.) u različitim područjima. Koncentracije teških metala kod divljih i domaćih životinja u pravilu se razlikuju jer se divlje životinje hrane na velikom području, imaju slobodan izvor hrane, a sama hranidba ovisi o sezonskoj raspoloživosti određene vrste hrane. Većina teških metala, pa i onih esencijalnih, imaju svoju granicu toksičnosti. Putevi primanja u životinjski organizam uključuju dišni i probavni sustav. Najznačajniji put primanja je putem probavnog sustava, konzumiranjem hrane i vode iz zagađenih područja. Primanjem u organizam, transportiraju se različitim načinima i distribuiraju po određenim tkivima, skladište se i izazivaju metaboličke poremećaje. Bitno je napomenuti da se teški metali talože u masnom tkivu, jetri, bubrezima i mozgu, a odatle pokazuju djelovanje na biokemijske i hormonske procese, kao što su metabolizam, rast stanica, plodnost, te tako utječu na cjelokupni organizam.

Selen je element u tragovima koji je prirodno prisutan u mnogim namirnicama, a dostupan je i kao dodatak hrani. Selen je u organizmu sastavni dio najmanje 25 selenoproteina koji imaju ključnu ulogu u reprodukciji, metabolizmu, sintezi DNA i zaštiti od oksidacijskog oštećenja i infekcije. S obzirom da je dijelom antioksidativnih enzima, selen posredno

sudjeluje u vezanju slobodnih radikala. Na taj način štiti stanice, membrane i stanične organele od lipidne peroksidacije, enzime i nukleinske kiseline od štetnog djelovanja reaktivnih vrsta kisika. Selen se u organizam može primiti iz organskih i anorganskih izvora, ali postoje razlike u njihovom postapsorpcijskom metabolizmu. Resorpcija i zadržavanje u tijelu je veće ako je izvor selenometionin, nego ako je to selenit. Dok se selenit pasivno resorbira jednostavnom difuzijom, selenat se aktivno transportira preko kotransportnog puta zajedno s natrijem, tako da se njegova resorpcija može inhibirati ukoliko u obroku postoji previše sumpornih spojeva. Resorbira se u dvanaesniku, a kod preživača u buragu i sirištu. Poznato je da hranidba selenom ima pozitivan učinak na imunološki odgovor i regulaciju upalnih procesa. Ima zaštitni učinak protiv nekih malignih bolesti, može povećati plodnost kod muškaraca i smanjiti smrtnost od kardiovaskularnih bolesti. Nedostatak selena povezuje se s mnoštvom bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, upalne procese i tumorska bujanja. Selen iz biljnog izvora ima najveću bioraspoloživost (više od 60%), dok je bioraspoloživost selena životinjskog podrijetla manja od 25%. Selen se nalazi u svim stanicama i tkivima tijela u različitim koncentracijama. U posljednjih nekoliko godina selen je privukao veliku pozornost zbog svog antioksidativnog i imunostimulirajućeg djelovanja. Ukupan iznos selena u ljudskom organizmu varira od 10 do 20 mg. Polovica količine selena u organizmu nalazi se u skeletnim mišićima, iako organi poput bubrega, testisa i jetre imaju najveću relativnu koncentraciju selena. S druge strane, stanice koje imaju najveću potrošnju selena su one imunskog sustava, eritrociti i trombociti. Selen se uglavnom iz organizma izlučuje mokraćom, a značajni su i gubici putem fecesa. Selen je prisutan u mnogim namirnicama, a dostupan je i kao dodatak hrani. Obrok koji sadrži od 0,1 do 0,3 mg/kg selena, pruža adekvatnu količinu selena koja je važna za životne procese u organizmu životinje. Hranidba od 0,1 mg/kg selena potrebna je kod životinja koje žive u standardnim optimalnim uvjetima, bez zagađenja, a hranidba od 0,3 mg/kg Se potrebna je kada su prisutni različiti antagonisti, kao i u uvjetima intenzivne proizvodnje. Antioksidansi, kao što je selen i vitamin E, djeluju u zaštiti stanice protiv djelovanja slobodnih radikala koji su štetni nusproizvodi metabolizma. Slobodni radikali mogu oštetiti stanice i pridonijeti razvoju bolesti. Selen djeluje na sve komponente imunog odgovora, uključujući razvoj i ekspresiju kako nespecifičnog, tako humoralnog i staničnog imunog odgovora. Količina selena u namirnicama animalnog podrijetla ovisi o statusu selena u hrani kojom su te životinje hranjene i o obliku u kojem se selen nalazi tj. o njegovoj biološkoj raspoloživosti.

Postoji mnoštvo podataka o zaštitnom učinku selena protiv djelovanja teških metala u organizmu. S druge strane, na resorpciju, distribuciju i eliminaciju selena kod životinja mogu značajno utjecati okolišni i hranidbeni čimbenici kao što su teški metali. Olovo, kadmij i živa javljaju se u okolišu i prisutni su kao kontaminanti u hrani. Poznato je da ovi metali imaju brojne interakcije s metabolizmom selena. Selen također tvori netopljive komplekse sa srebrom, bakrom, kadmijem i živom. Može spriječiti toksične učinke kadmija, a može smanjiti i toksični učinak metil-žive. Selen može reducirati živu i kadmij koji su prisutni kao kontaminanti u hrani, imaju značajnu interakciju s metabolizmom selena, što je izuzetno važno za procese eliminacije teških metala u životinja koje su izložene toksičnom djelovanju teških metala. Hranidbena vrijednost selena prvi puta je prepoznata 1957. godine kada je utvrđeno da selen ima komplementarnu ulogu s vitaminom E kod jetrene nekroze u štakora i pilića. Ostalim istraživanjima pokazane su slične interakcije između selena i vitamina E kod ptica i životinja.

## **1.1. Pregled literature**

Jelen lopatar (*Dama dama* L.) široko je rasprostranjen u Europi, zahvaljujući djelovanju čovjeka. Obitava u brdima i ubraja se među preživače papkare. Kao divljač, pogodan je bioindikator onečišćenosti okoliša. Razine teških metala kod divljih i domaćih životinja u pravilu se razlikuju jer se divlje životinje hrane na velikom teritoriju, imaju slobodan izvor hrane, a sama hranidba ovisi o sezonskoj raspoloživosti određene vrste hrane.

### **1.1.1. Zoološka klasifikacija jelena lopatara**

Jelen lopatar (*Dama dama* L.) pripada razredu sisavci (Mammalia), redu parnoprstaši (Artiodactyla), porodici jeleni (Cervidae), potporodici pravi jeleni (Cervinae) i rodu jelena lopatara (*Dama*). Prema lovnom zakonodavstvu Republike Hrvatske, jelen lopatar uvršten je u krupnu divljač zaštićenu lovostajom (NN 140/2005).

### **1.1.2. Rasprostranjenost jelena lopatara**

Arheološki dokazi pokazuju da se jelen lopatar pojavio prije pojave neolitika. Na temelju nalaza iz paleolitskih arheoloških nalazišta (prije 10 000 i 100 000 godina), jelen lopatar pojavljuje se kao polupripitomljena životinja kod Feničana koji su bili velika pomorska nacija. Izgleda da su oni bili uključeni u trgovinu i distribuciju divljači. Distribuirali su ih s istoka Mediteranskog mora na područje današnjeg Libanona i Sirije, kroz regije Europe, pa sve do Velike Britanije. Jelen lopatar bio je popularan i kod Rimljana i Grka. On se pojavljuje na drevnim grčkim novčićima, kao i u rimskoj umjetnosti. Postoje zapisi o lovu, kroćenju i uzgoju jelena lopatara u rimskim parkovima (Smith i Haigh, 1990.). Od posljednje glacijacije prirodno obitava u južnoj Europi, Maloj Aziji, duž Sredozemnog mora. Rasprostranjen je u 38 zemalja Sjeverne i Južne Amerike, Europu, južnu Afriku, Australiju, Novi Zeland i Fidži (Feldhamer i sur., 1988.; Nowak, 1999.). Na područje Hrvatske naseljen je 1850. godine u ograđeni prostor u Suhopolju. Bisukup Josip Juraj Strossmayer držao je 1870. godine 160 jelena lopatara na području današnjeg lovišta Breznica pokraj Đakova. U drugoj polovici 19. stoljeća naseljen je i na područja Zelendvora i Brijuna. Lopatari s Brijuna bili su ishodište za osnivanje prvih kolonija lopatara na našim kvarnerskim otocima. Brijunski lopatari naseljeni su na otok Sv. Grgur kraj Raba, Cres, Plavnik i druga područja na prostoru Hrvatske. U Kunjevce kraj Vinkovaca unesen je 1941. godine, a u drugoj polovici 20. stoljeća u lovište Pajzoš pokraj Iloka, na Petrovu Goru i područje Hrvatske Dubice (Mustapić i sur., 2004.).

### **1.1.3. Biologija i morfologija jelena lopatara**

Jelen lopatar je, zbog ljudske aktivnosti, rasprostranjen po cijelom svijetu, a može se pronaći u mnogim različitim staništima. Oni obično traže utočište u šumama, iako su uglavnom životinje koje pasu u poljima i pašnjacima. Jeleni lopatari su društveni i pretežno borave u krdima, koja mogu varirati u veličini i sastavu (Chapman i Chapman, 1997.). Žive u različitim klimatskim uvjetima, od hladnih i humidnih do toplih i suhih područja. Stanište im je obično kombinacija više tipova vegetacije. Vole stare, listopadne šume različite gutoće prožete travnatim područjima, ali također se mogu pronaći i u mješovitim šumama, predalpskoj vegetaciji, travnjacima, šikarama i savanama (Grizmek i sur., 1988.; Grizmek, 1990.). Poput mnogih vrsta jelena i jelen lopatar je aktivan tijekom 24 sata, ali u područjima velike ljudske aktivnosti oni imaju tendenciju da budu aktivniji noću. Jeleni općenito

pokazuju veće hranidbene prilagodbe od govedih vrsta. Oni imaju sezonsku usklađenost rođenja, rasta, ciklusa aktivnosti i zastoja rasta koji odgovaraju količini, kvaliteti i dostupnosti hrane. Primjerice, maksimalni hranidbeni zahtjevi za ženke su tijekom laktacije, to razdoblje podudara se s razvojem vegetacije koja je tada najbujnija i najbogatija. Ljeto je vrijeme teljenja i vrijeme za postizanje najveće tjelesne mase teladi. Za zrele jelene to je vrijeme rasta rogovlja i ponovnog obnavljanja tjelesne mase i masnih rezervi koje su se iscrpile prethodne jeseni i zime. Tijekom razdoblja smanjene dostupnosti krmne smjese u prirodi, koriste se rezerve masti koje su ugrađene tijekom intenzivnog hranjenja i debljanja, upravo to zahtjeva neograničenu opskrbu kvalitetnom, visoko proteinskom hranom tijekom ljetnih mjeseci (Smith i Haigh, 1990.).

Tjelesna masa odraslih mužjaka kreće se u rasponu od 56 do 80 kg, s prosjekom od 67 kg, a masa odraslih ženki od 30 do 50 kg s prosjekom od 44 kg. Glava i tijelo dužine su od 1,3 do 1,75 metara, dužina repa je od 150 do 230 milimetra. Visina grebena kod mužjaka je od 0,9 do 1,0 metra, dok je ženka nešto manja. Prednje noge jelena lopatara obično su nešto kraće od stražnjih nogu, kao rezultat toga linija leđa je uzdignuta posteriorno. Kod mužjaka je istaknut grkljan – *larinx* (Feldhamer i sur., 1988.; Grizmek, 1990.; Nowak 1990.). Najčešća boja, u ljetnoj dlaci, je svijetlohrđastosmeđa, s tamnom prugom na hrptu, koja je prema repu izraženija. Na tijelu se ističu bijele pjege koje se prema vratu gube, a u donjoj trećini ograničava ih svijetla uzdužna pruga. Donji dio vrata, prsa i noge su svjetliji, trbuh je bijel. Stražnji dio tijela, ogledalo, s obje je strane ograničen crnom prugom, rep je s gornje strane smeđecrne do crne, a s donje bijele boje. Zimska je dlaka jednolično sivosmeđa, po hrptu tamnija, prema trbuhu svijetlija, a unutrašnje su strane nogu, donja strana repa i stražnji dio, ogledalo, bijeli. Među najčešćim su varijantama boje jelena lopatara crna, crvenosmeđa i tzv. porculanska obojenost u više nijansi (od tamne do gotovo bijele). Sva osjetila podjednako su razvijena, a vid je razvijeniji nego u običnog jelena (Mustapić i sur., 2004.).

Jeleni lopatari razvrstavaju se prema dobi u dobne razrede, pa tako kod mužjaka razlikujemo: jelenče – do 1 godine, šiljkan – dobi 2 godine, mladi jelen od 3 do 4 godine, srednji jelen od 5 do 7 godina i stari jelen od 8 godina i više. Kod košuta prema dobi razlikujemo: mladunče – jelenče, ženku od 1 do 2 godine – dvizica, od 2 do 4 godine – mlada košuta, od 5 do 7 godina – srednjedobna košuta i od 8 godina i više – stara košuta. Životni vijek jelena lopatara kreće se od 20 do 25 godina (Bajović i sur., 1987.). Spolno sazrijeva u drugoj godini života, u dobi od oko 16 mjeseci. Košute uglavnom sve bivaju oplodene u drugoj godini, ali u jelena do četvrte godine života spermiogeneza nije dostatna za cijelu sezonu parenja koja traje od 20 do 30 dana. Parenje počinje početkom listopada, a u nekim

lovištima sredinom i potkraj listopada, što ovisi o nadmorskoj visini, klimi i vremenskim prilikama. Rika jelena lopatara zvuči kao roktanje i ne sliči onoj u običnog jelena. Gravidnost košute traje oko 240 dana, a oteli jedno tele (rijetko dva), potkraj svibnja ili početkom lipnja. Telad siše 3 do 4 mjeseca (Mustapić i sur., 2004).

#### 1.1.4. Uzgoj jelena lopatara

Jeleni lopatari žive u krdima koje obično predvodi stariji jelen. Najpovoljniji tereni za život lopatara su ravni do brežuljkasti, nadmorske visine od 500 do 600 metara (Bajović i sur., 1987.). Toj vrsti jelena najviše odgovaraju šumska područja s dosta livada i pašnjaka. Njegova horizontalna i vertikalna premještanja mnogo su manja i najčešće ne prelaze 2 do 5 km. Jelen lopatar uspješno se može uzgajati u lovištima od 1000 do 2000 ha. Računa se da je gospodarski primjerena prosječna gustoća populacije od 2 do 10 grla na 100 ha. Budući da jelen lopatar nije naša izvorna gospodarska vrsta, svrha je gospodarenja prije svega omogućavanje odstrjela što većeg broja zrelih, trofejno vrijednih grla. Pri određivanju količine odstrjela, osim brojnog stanja populacije i njezina usklađenja sa staništem, treba odrediti visinu godišnjeg prirasta. Računa se da je godišnji priplod 80 do 85%, a prirast između 70 do 75% broja svih košuta u proljetnom fondu. Da se spriječi premještanje lopatara, nužno je u lovištima urediti potreban broj kvalitetnih oranica isključivo za ljetnu hranidbu divljači (0,05 ha uređene površine po grlu). Kvalitetno sijeno i otavu dobro je pomiješati s približno 20% lisnika (Mustapić i sur. 2004.).

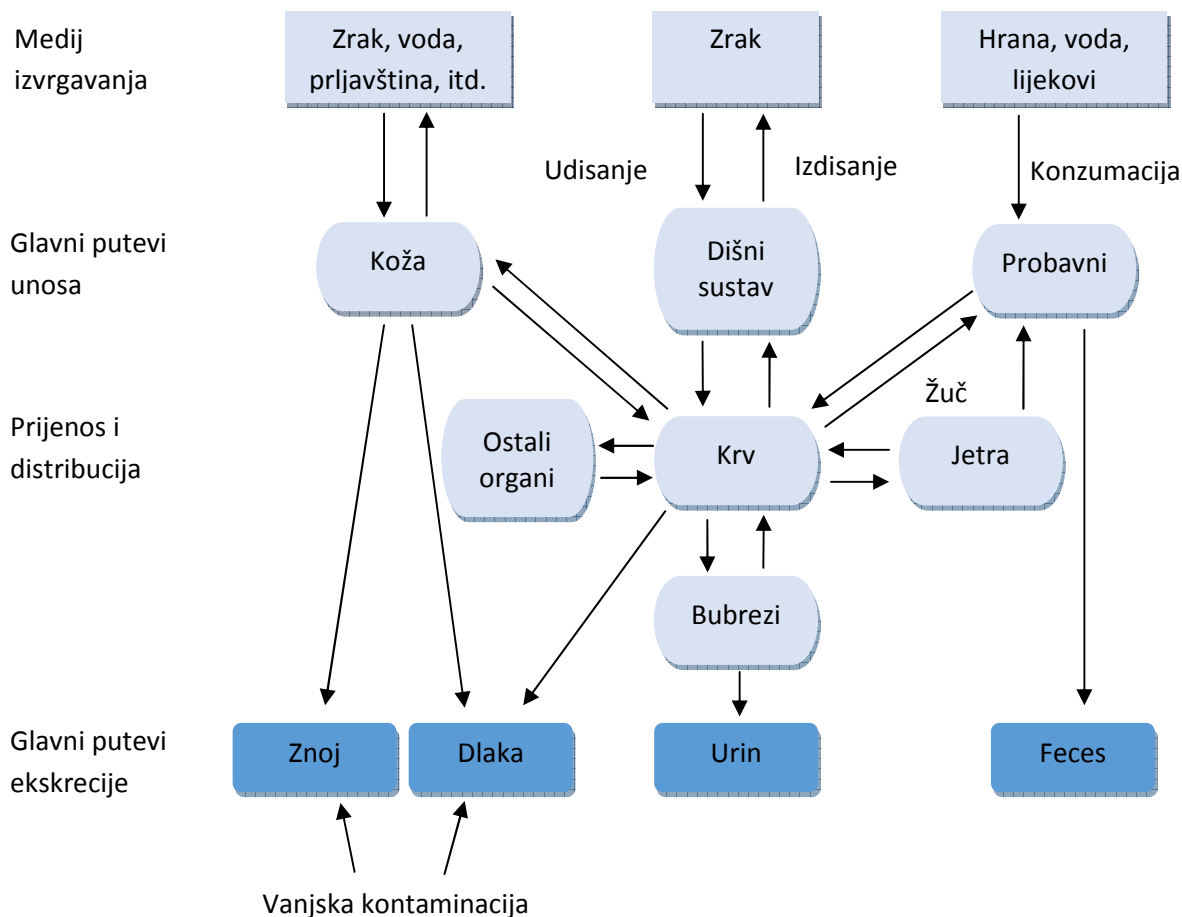
Kada se govori o uzgoju divljači u ograđenim lovištima, praksa zemalja koje imaju tradiciju uzgoja lopatara (poput Mađarske) pokazuje da se najmanja površina kreće od 400 do 500 ha. Pri tome se u najboljim uvjetima može uzgajati jedno grlo na 3 do 10 ha površina ograde i da je u tome prostoru potrebno osigurati od 0,1 do 0,2 ha obradivih površina po grlu. Ograđena površina prije svega mora pružati trajnu hranidbu i zaklon. Povoljne uvijete za uzgoj jelena lopatara pružaju šumske zajednice hrasta lužnjaka i običnog graba, lužnjakovo – grabova šuma s cerom i lužnjakovo – grabova šuma s lipom. Površine prirodnih livada i pašnjaka moraju odgovarati brojnosti divljači i za 100 grla potrebno je osigurati 10 ha. Intenzivan uzgoj zahtjeva posebno uređene lovno – gospodarske objekte unutar lovišta. Raspored i veličina hranilišta treba biti takav da jedno hranilište može zadovoljiti potrebe za 10 do 15 grla. Hranilišta su izgrađena za zrnatu hranu i hranu obogaćenu mineralima, vitaminima i mikroelementima (Bajović i sur., 1987.).

## 1.2. Teški metali

Teški metali definirani su kao metali sa specifičnom težinom većom od  $5 \text{ g/cm}^3$ , koji nemaju blagotvoran učinak na zdravlje sisavaca, već pokazuju ozbiljne toksikološke simptome i u nižim koncentracijama. Teški metali su još uvijek jedan od najvažnijih problema u okolišu (Nordberg i sur., 2007.). Iako podaci biomonitoringa pokazuju opadanje razine teških metala u zraku (Grodzińska i Szarek-Łukaszewska, 2001.) postoje mnogi drugi izvori zagađenja koji su i dalje potencijalno opasni. S povećanjem industrijalizacije sve više teških metala ulazi u okoliš. Oni ostaju trajno zbog toga što se ne mogu degradirati u okolišu, ulaze u hranu odakle imaju slobodan put za ulazak u životinjska tkiva (Baykov i sur., 1996.). U višestaničnim organizmima neki su važni kofaktori u enzimskoj katalizi, dok drugi nemaju ključnu ulogu. Prvoj skupini pripadaju esencijalni elementi kao što su selen, cink, kalcij i željezo. Prekomjerna koncentracija slobodnih metala može imati nepovoljan učinak na zdravlje, pa je stoga njihova cirkulacija i koncentracija u tkivima strogo kontrolirana zahvaljujući vezanosti s bjelančevinama. U drugu skupinu ubrajaju se metali poput kadmija, arsena, olova i žive. Ti neesencijalni metali su otrovni i negativno djeluju na organizam (Duce i Bush, 2010). Jedan od glavnih mehanizama koji stoji iza toksičnosti teških metala je oksidativni stres. Oni su sposobni za interakcije s bjelančevinama i DNA molekulom uzrokujući propadanje bioloških makromolekula (Leonard i sur., 2004.). Istraživanja koja su provedena u posljednjih nekoliko desetljeća pokazala su da metali poput željeza, bakra, kadmija, žive, nikla, olova i arsena utječu na stvaranje reaktivnih radikala, što je rezultiralo staničnim oštećenjima, smanjenom enzimskom aktivnošću, oštećenjem lipidnog dvosloja i DNA (Stohs i Bagchi, 1995.). Reaktivne vrste radikala uključuju raznovrsne radikale kisika, ugljika, sumpora i dušika, oni ne potječu samo od superoksidnog radikala, vodikovog peroksida i lipidnih peroksidaza, nego također i od kelata aminokiselina, peptida i proteina kompleksiranih s teškim metalima. Ti metali stvaraju reaktivne vrste koje mogu uzrokovati neurotoksičnost, nefrotoksičnost i hepatotoksičnost kod ljudi i životinja (Stohs i Bagchi, 1995.; Chen i sur., 2001.).

Odnos između izvora izlaganja, transporta i distribucije raznim organima (koža, dišni sustav, bubrezi i jetra) i puteve izlučivanja prikazuje Slika 1. Učinci teških metala ovise o dozi i vremenu izlaganja organizma teškom metalu. Najpreciznija definicija doze je količina metala u stanicama organa koja izaziva toksikološki učinak. Rezultati zasebnih mjerenja mogu prikazati nedavnu, dužu ili raniju izloženost, ovisno o vremenu zadržavanja u određenom tkivu. Kritična odrednica zadržavanja metala je njegov biološki poluživot,

odnosno vrijeme koje je potrebno da tijelo ili organ izluči pola akumuliranog iznosa (Goyer i Clarkson, 1996.).



Slika 1. Kretanje teških metala u organizmu nakon apsorpcije preko kože, udisanjem i gutanjem. Strelice prikazuju transport i distribuciju. (Elinder i sur., 1994.).

Prepoznavanje čimbenika koji utječu na toksičnost određene razine izloženosti toksičnim metalima važni su u određivanju rizika toksičnosti. Čimbenici koji utječu na toksičnost metala su: interakcija s esencijalnim metalom, formiranje kompleksa metal-protein, starost i stupanj razvoja, kemijski oblik ili specijacija i imunološki status domaćina. Interakcija toksičnih i esencijalnih metala događa se kada je metabolizam toksičnog metala sličan metabolizmu esencijalnog metala (Goyer, 1995.). Resorpcija toksičnih metala iz pluća ili probavnog sustava može biti pod utjecajem esencijalnog metala, osobito ako su uključeni u isti homeostatski mehanizam, kao što se to događa za olovo, kalcij i željezo, te za kadmij i željezo. Postoji inverzna veza između sadržaja bjelančevina u hrani i toksičnosti kadmija i olova. Vitamin C smanjuje resorpciju kadmija i olova, zbog povećane resorpcije iona željeza.



Toksični metali mogu utjecati na ulogu esencijalnih metala kao kofaktora za enzime ili druge metaboličke procese (Goyer i Clarkson, 1996.).

Postoje brojne interakcije između metala i bjelančevina. Bjelančevine mogu imati zaštitnu ulogu, smanjujući aktivnost (toksičnost metala), za što je primjer metalotionein (bjelančevina sastavljena od šezdesetak aminokiselina). Mnoge bjelančevine imaju ulogu u raspodjeli metala u organizmu. Nespecifično vezanje na bjelančevine, kao što su serumski albumini ili hemoglobin, ima ulogu u transportu metala u krvotok i na raspodjelu metala između eritrocita i plazme.

Metalotioneini otkriveni su prije više od 40 godina, mogu imati nekoliko različitih funkcija, uključujući zaštitu od toksičnosti metala. Imaju malu molekularnu masu (oko 6000 Da) te su bogati tiolnim ligandima. Ti ligandi pružaju temelj za visoki afinitet vezanja za nekoliko esencijalnih i toksičnih metala kao što su kadmij, bakar, živa, srebro i cink. U većini slučajeva metalotioneini su inducirani brojnim metalima i drugim stimulansima. Mogu komunicirati s metalima u složenim fiziološkim i biokemijskim putovima.

Transferin je glikoprotein koji se veže na većinu feri oblika željeza u plazmi. Prijenos željeza kroz stanične membrane događa se zbog endocitoze izazvane pomoću receptora transferina. Receptor je disulfidnim vezama povezani membranski glikoprotein. Nakon ulaska u stanicu, željezo je odvojeno od transferina procesom zakiseljavanja endosomima. Ovaj protein također prenosi  $Al^{3+}$  i  $Mn^{2+}$ .

Feritin je prvenstveno protein za pohranu željeza u retikuloendotelnim stanicama jetre, slezene i kosti. On igra glavnu ulogu u prometu željeza u jetri. Kupfferove stanice otpuštaju željezo koje su dobili fagocitozom eritrocita i nalaze se u obliku feritina. Feritin može poslužiti kao opći metalni detoksikant, budući da veže niz toksičnih metala, uključujući kadmij, cink, berilij i aluminij.

Ceruloplazmin je glikoprotein oksidaza, sadrži bakar u plazmi i pretvara fero u feri željezo, koje tada veže transferin. Ovaj protein također potiče resorpciju željeza putem mehanizma neovisnog o transferinu (Goyer i Clarkson, 1996.).

Divlje životinje koje žive u prirodnim ekosustavima posebno su izložene raznim čimbenicima okoliša. Upravo je okoliš glavni čimbenik koji određuje zdravlje, stanje i populaciju divljači. Teški metali su sveprisutni u tlu, vodi i zraku. Njihov transport hranidbenim lancem važan je zbog kontaminacije mesa divljači teškim metalima, uglavnom toksičnim metalima koji se akumuliraju u tkivima, kao što su kadmij (Beilböck i sur., 2001.), olovo (Karita i sur., 2000.) i metaloid arsen (Maňkowska i Steinnes, 1995.). Neki drugi metali, kao što su cink, bakar i krom su mikroelementi u tragovima s različitim biokemijskim i

fiziološkim funkcijama u organizmu (Dosi, 2000). Olovo, živa, kadmij i arsen su među glavnim toksičnim metalima koji se nakupljaju u prehrambenim lancima i imaju kumulativan učinak (Chunningham i Saigo, 1997.). Teški metali često imaju usmjerene fiziološke toksične učinke i pohranjuju se ili ugrađuju u živa tkiva (Baykov i sur., 1996.). Dob, hranidba, interakcija toksičnih metala i kombinacija izlaganja mogu utjecati na pojavu i razinu toksičnosti u bilo kojem organizmu. S druge strane, metabolički vezani esencijalni metali, poput željeza, bakra, cinka i metaloida selena mogu utjecati na toksičnost putem interakcija na staničnoj razini (Goyer, 1996.). Koncentracije esencijalnih metala potrebno je pratiti kao i koncentracije toksičnih metala. Najvažniji putevi izlaganja za ljude i životinje su putem hrane i vode (Herber, 2004.). Glavne komponente u hranidbi divljači su kultivirane biljke, trave, stabljike, lišće i grmlje. Mineralni sastav hrane kod divljači karakterizira sezonska promjenljivost, općenito, čimbenici kao što su stanište, hrana, stanje, dob, spol životinje i sezona lova mogu utjecati na koncentraciju teških metala u tkivima životinja (Ramírez i sur., 1996.; Pokorny i Ribarić-Lasnik, 2002.; Pokorny i sur., 2004.; Sobańska, 2005.). Proširivanje područja znanja analitičkim podacima o nutritivnoj kvaliteti mesa divljači, rezultiralo je dobivanjem informacija o sadržaju minerala u mesu divljači radi popunjavanja prehrambeno-biološkog koncepta kvalitete mesa. Zbog nedostatka podataka koji se odnose na količinu teških metala u mesu divljači, s obzirom na ograničene mogućnosti kontroliranja iskoristive hrane u prirodnom okruženju, kao i čimbenike zagađenja okoliša, postoji potreba za saznanjima o tehnološkoj kvaliteti mesa divljači. Ta su saznanja potrebna za proces obrade, kako bi se povećala ekonomičnost, a uz to je važna i korelacija fizikalnih, kemijskih i tehnoloških pokazatelja sa senzorskim osobinama mesa divljači, radi što učinkovitije kulinarske pripreme (Postolache, 2011.). Koncentracija teških metala u biljkama utječe na njihovu koncentraciju kod biljojeda. Teški metali akumuliraju se samo u nekim organima, a preostali dio izlučuje se kroz probavni sustav (Friberg i sur., 1979.). Podaci o koncentraciji teških metala u organima slobodno živućih biljojeda, kao što je jelen obični (*Cervus elaphus* L.) može biti indikativno za određivanje razine onečišćenja njihovog staništa (S'Wiergosz i sur., 1993.; Tataruch, 1993.; Wolkers i sur., 1994.; Kottferová i Koréneková, 2000.; Falandysz i sur., 2005.). Srna obična (*Capreolus capreolus* L.) često je proučavana radi akumulacije teških metala. Kako je osjetljiva na promjene u okolišu, može se koristiti kao bioindikator onečišćenja okoliša (Sawicka-Kapusta, 1978.; Bobek i Perzanowski, 1984.). Kost, zubi i rogovi cervida pouzdani su pokazatelji zagađenja (Karstad, 1967.; Maňkovská, 1980.; Sileo i Beyer, 1985.) i odražavaju geografske varijacije u onečišćenju kopnenih ekosustava (Sawicka-Kapusta, 1978.). Također, pogodni bioindikator su jelen obični i divlja

svinja (*Sus scrofa* L.) s obzirom na njihovu veliku zemljopisnu distribuciju, način života, hranidbene navike i relativno dugi životni vijek (Kottferová i Koréneková, 1998.; Pokorny, 2000.; Falandsyz i sur., 2005.). Istraživanje koje su proveli John i Jeanne (1994) pokazalo je da su koncentracije As, Cd, Hg i Pb otkrivene u tkivima koza bile vrlo velike, u razinama koje su iznad dopuštenih. Slično tome, distribucija i lokalizacija teških metala otkrivena je u tkivima i organima teladi, gdje su pokazani visoki rezultati metala u jetri, bubrezima i tankom crijevu (Horky i sur., 1998.). Poznato je da su bubrezi i jetra glavni organi za akumulaciju toksičnih metala, posebno kadmija i žive, dok su kosti mjesto odlaganja olova (Goering i sur., 1995.; Bridges i Zalups, 2005.). Prema istraživanjima provedenim u Španjolskoj, olovo i kadmij dva su najčešća toksična metala koji su pronađeni u jetri i bubrezima divlje svinje i jelena običnog (Swiergosz i sur., 1993.; Falandysz, 1994.; Garcia-Fernández i sur., 1995.; Santiago i sur., 1998.; Karamarova i sur., 2005.). Studija u Španjolskoj pokazala je da se olovo akumulira u većoj stopi kod divljih svinja, a kadmij kod jelena običnog (Santiago i sur., 1998.). Veće koncentracije kadmija promatrane u starijih životinja objašnjavaju se kroničnom izloženosti ovome metalu, njegovoj tendenciji nakupljanja i niskoj stopi izlučivanja. Ova pojava proučavana je kod različitih vrsta porodice *Cervidae*, tj. kod losa (*Alces alces* L.; Frosly i sur., 1984.), sjevernog jelena (*Rangifer tarandus* L.; Frank, 1986.) i srne obične (Pompe-Gotal i Prevendar Crnić, 2002.).

### 1.2.1. Kadmij

Onečišćenje okoliša kadmijem i kontaminacija životinja, uključujući i divljač, ozbiljan je problem u većini zemalja (Hecht i sur., 1984.; Stawarz i sur., 2003.). Poznato je da je kadmij izuzetno toksičan i sveprisutan u okolišu, pojavljuje se u gotovo svim tlima, površinskim vodama i biljkama te se lako mobilizira ljudskim aktivnostima kao što je rudarstvo. Kao rezultat toga, kadmij je prepoznat kao potencijalna prijetnja za zdravlje životinjskih vrsta. Međutim, zato što najčešće postoji u okolišu kao sastavnica u tragovima, zabilježeni toksični učinci kadmija su rijetki. Toksičnost kadmija najčešće se pojavljuje među prirodnim populacijama kralješnjaka (Soylak i sur., 2002.; Larison i sur., 2003.). Jetra je organ u kojem se kadmij prvenstveno nakuplja i očituje s nekoliko štetnih učinaka (Bernard, 2004.). Većina *in vivo* i *in vitro* studija o toksičnosti kadmija na organe sisavaca pokazala je da kadmij lokaliziran u hepatocitima izaziva razne štetne posljedice, nakupljanje, patohistološke i stanične promjene, povećanje lipidne peroksidacije, a njegovo povećanje

utječe na funkciju mitohondrija i uzrokuje prijelom DNA lanca (Toman i sur., 2005.; Berzina i sur., 2007.). Kadmij ima nefrotoksični učinak, osobito prilikom izloženosti visokim koncentracijama. Izloženost kadmiju može utjecati na mineralnu gustoću kostiju i funkciju bubrega (Alfven i sur., 2002.). Metalotionein, bjelančevina koja veže kadmij, smatra se dobrim biomarkerom izloženosti kadmija. Iako kadmij djeluje na gotovo svaki organ i tkivo u organizmu, bubrezi se i dalje smatraju glavnim organima za akumulaciju i toksičnost. Trećina ukupne količine kadmija u organizmu pohranjena je u bubrezima, odnosno u dvama segmentima proksimalnih tubula (S1 i S2) u okviru bubrežnog korteksa (Satarug i sur., 2006.). Oko 70% filtrata krvne plazme resorbira se u proksimalnim tubulima, uključujući vodu, bjelančevine, glukozu, natrij, aminokiseline, bikarbonate i neke esencijalne metale. Budući da ne postoji učinkoviti mehanizam za izlučivanje kadmija iz organizma, on se pohranjuje u bubrezima i to u razdoblju od 10 i 30 godina (Jarup i sur., 1998.). Poznato je da mnogi toksični učinci kadmija nastaju zbog njegova međudjelovanja s esencijalnim elementima. Kadmij za ulazak u stanicu rabi transportne sustave esencijalnih elemenata (Himeno i sur., 2009.) i tako smanjuje njihovu resorpciju (Peraza i sur., 1998.). Kod životinja s niskim koncentracijama željeza u organizmu primjećene su povećane resorpcije kadmija iz probavnog sustava (Flanagan i sur., 1978.) i povišenje razine u tkivima (Piasek i sur., 2004.). Kippler i sur. (2009) potvrdili su snažnu negativnu korelaciju kadmija i kalcija kod ljudi, što je dokazano i kod životinja (Min i sur., 2008.). Poznavanje međudjelovanja kadmija s esencijalnim elementima može se primijeniti u zaštiti od štetnih učinaka kadmija jer dodatak esencijalnih elemenata utječe na toksodinamiku i toksokinetiku kadmija u organizmu. Lazarus i sur. (2005) promatrali su koncentracije toksičnih i esencijalnih metala u bubregu jelena običnog na području Istočne Hrvatske. Studija je pokazala veće koncentracije kadmija u bubregu starijih životinja. Pompe-Gotal i Crnić (2002) pronašli su u tkivima srneće divljači, prikupljenih u razdoblju od pet godina, u 43% uzoraka jetre i 90% uzoraka bubrega premašene maksimalne dopuštene vrijednosti za kadmij utvrđene hrvatskim propisima (NN 46/94 i NN 11/01). Karamárová i sur. (2005) utvrdili su da je koncentracija kadmija u jetri i bubrezima preživača slična koncentracijama ispitanih kod drugih životinja. To znači da su bubrezi organi u kojima je zabilježena najveća koncentracija kadmija. Najveće koncentracije kadmija u bubregu zabilježene su kod jelena običnog i jelena lopatara.

### 1.2.2. Olovo

Olovo je jedan od glavnih onečišćivača okoliša. Djeluje na središnji i periferni živčani sustav životinja te uzrokuje encefalopatiju, nemir, akutnu ili kroničnu nefropatiju, gastroenteritis i degeneraciju perifernih živaca, posebno u slučajevima dugoročne ingestije malih količina (Van Oostdam i sur., 1999.). Neurološki simptomi trovanja olovom povezani su sa sposobnosti 5-aminolevulinske kiseline da inhibira ili  $K^+$ -stimulirano otpuštanje  $\gamma$ -aminomaslačne kiseline (GABA) s moždanih sinapsa ili vezanje GABA za sinaptičke membrane (Brennan i sur., 1995.). Poznato je da olovo može imati značajne posljedice za domaće i divlje životinje kao i ljude jer se akumulira u gotovo svim tkivima (Satarug i sur., 2003.). Jedan od glavnih ciljeva toksičnosti olova je sinteza hema. Olovo utječe na ovaj sustav tako što inhibira sintezu hema i hemoglobina, te mijenja morfologiju i preživljavanje eritrocita (Flora i sur., 2008.). Oko 50% olova u tijelo ulazi udisanjem prašine, 10 do 15% oralno, od čega se 90% pohranjuje u kostima (Links i sur., 2001.). Ostali učinci uključuju skraćen vijek trajanja eritrocita, smanjenje porodne mase, smanjenje pokretljivosti i broja spermatozoida (Borja-Aburto i sur., 1999.). Toksičnost olova povećava se s manjkom kalcija, željeza ili cinka. Na primjer, samo 12 ppm olova dodanog u vodu za piće, ometa sintezu hema i bubrežnu funkciju u štakora s manjkom kalcija, dok je 200 ppm olova potrebno za izazivanje poremećaja kod štakora s normalnom koncentracijom kalcija u organizmu (Mahaffey, 1974.). Quarterman i Morrison (1975) izvijestili su da se u slučaju prisutnosti različitih koncentracija kalcija, fosfora i olova u hrani štakora, sadržaj olova u organizmu značajno povećao kada je obrok sadržavao manju koncentraciju kalcija ili fosfora od minimalne koncentracije koja je potrebna organizmu. Tako se tijekom razdoblja hranidbe hranom koja je sadržavala različite koncentracije olova i manje koncentracije kalcija ili fosfora, koncentracija kalcija u organizmu smanjila sa 2,3 g na 1,9 g, dok se razina olova povećala sa 350  $\mu$ g na 1 200  $\mu$ g. Nedostatak željeza može povećati toksičnost olova (Mahaffey, 1974.). Cerklewski i Forbes (1976) otkrili su da se razina olova kod štakora smanjivala kako se povećavala razina cinka primljenog hranom, vjerojatno zbog smanjenja crijevne apsorpcije olova. Slično kao i drugi postojeći toksični metali poput arsena, kadmija i žive i olovo oštećuje stanične komponente zahvaljujući oksidativnom stresu. Patogenetski učinak olova izravno prekida aktivnost enzima i inhibira apsorpciju važnih minerala u tragovima (Patrick, 2006.). Olovo se nakuplja u organizmu tijekom cijelog života. Resorpcija iz probavnog trakta iznosi oko 10% kod odraslih osoba. Ukupni sadržaj olova u organizmu može se podijeliti na najmanje dva kinetička bazena. Kostur je najveći bazen koji sadrži 90% olova, ali i kinetički najsporiji (Merian,

2004.), to ga čini dobrim pokazateljem sadržaja olova u organizmu. Istraživanja olova u koštanom tkivu proučavana su kod jelena običnog i divlje svinje (Reglero i sur., 2009.; Rodriguez i sur., 2009.; Ruiz i sur., 2009.). Ostatak olova, manje od 10%, nalazi se u bubrezima i jetri.

### 1.2.3. Živa

Živa je kemijski element koji pripada teškim metalima, te je jedini metal koji se na sobnoj temperaturi nalazi u tekućem stanju (Risher i Amler, 2005.). U okolišu je široko rasprostranjena, a prisutna je u elementarnom, anorganskom i organskom obliku (Pacyna i sur., 2010.). Prisutnost žive ukazuje na onečišćenje okoliša od prirodnih i antropogenih izvora. Glavni antropogeni izvori su taljenje metala, spaljivanje otpada, izgaranje ugljena i poljoprivreda (Burger i sur., 1994.). Prema tome, živa se nakuplja u različitim tkivima u različitim životinjskim organizmima, te uzrokuje kontaminaciju u hranidbenom lancu (Dietz i sur., 1996.). Živa može potaknuti odgođenu neurotoksičnost godinama nakon prestanka izloženosti ili kao rezultat izloženosti niskim koncentracijama kroz dugo vremensko razdoblje (Weiss, 2000.). Pri izlaganju živinim spojevima u akutnom trovanju, najteži su toksični učinci na bubrege s popratnom oligurijom ili kompletnom anurijom. Kronično izlaganje najčešće napada bubrege uz oštećenje tubula i funkcionalne poremećaje (Morris i sur., 2005.). Svi oblici žive i živinih spojeva su potencionalno toksični, perzistentni i bioakumulativni, a njihova toksičnost ovisi o koncentracijama u pojedinom organizmu. Organska živa se u organizam prima isključivo hranom i to kao spoj metil-živa ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ). Živa u elementarnom i anorganskom obliku rijetko se pojavljuje u namirnicama, a uglavnom zbog slučajnih kontaminacija, kada je prisutna u vrlo malim koncentracijama (5 do 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; Srebočan i sur., 2007.). Jednom primljena u organizam, živa se lako veže za  $-\text{SH}$  i  $-\text{NH}_2$  skupine, te na taj način inhibira enzimsku aktivnosti i stvara stabilne spojeve s dugim poluvremenom zadržavanja u tkivima pa se lako akumulira u organizmima. Izbor biomarkera za izloženost živi nije jednostavan zbog brojnih čimbenika koji na to mogu utjecati, kao što su koncentracija u krvi, nutritivni status organizma, moguća razlika u toksokinetici između mužjaka i ženke. Koncentracija u krvi ženki znatno je veća zbog razlike u metabolizmu glutaciona, koji je uključen u bubrežnu eliminaciju živinih spojeva. Veće su koncentracije žive utvrđene u ženki i vidljive su u koncentraciji žive u krvi, kosi, koži, mišićima i masnom tkivu. Dob i vrijeme izlaganja također imaju važnu ulogu, što je posebno vidljivo kod razvoja mozga

djece, koja su bila izložena živi prenatalno (Kakkar i Jaffer, 2004.). Živa utječe na funkciju stanica urođenog imunološkog sustava, uključujući neutrofile, monocite, makrofage, dendritične stanice, kao i stanice epitela (Jansson i Harms-Ringdahl, 1993.). Izloženost divljih životinja i ljudi živi konzumacijom kopenih organizama zanemariva je u odnosu na izloženost konzumacijom ribe. Živa iz vode, sedimenta i drugih biota metilacijom ulazi u prehrambeni lanac, ondje se biokoncentrira i bioakumulira te njezina razina raste prema vrhu hranidbenog lanca (Merian i sur., 2004.). Čovjek resorbira 1 do 7% anorganske žive iz hrane koja se nakuplja u bubregu s vremenom poluraspada od 40 dana, s druge strane organska živa se gotovo potpuno resorbira (90 do 95%) iz probavnog sustava, nakuplja se i zadržava, osobito u mozgu, s vremenom poluraspada oko 70 dana (Goyer, 1996.). Ne postoji veliki broj literaturnih podataka o koncentracijama žive u divljači. Postoje podaci o koncentracijama zabilježenim u Poljskoj (Dobrowolska i Melosik, 2002.) i Hrvatskoj (Bilandžić i sur., 2009., 2010.) gdje su utvrđene značajne razlike u koncentracijama žive u jetri i mišićima između županija.

#### 1.2.4. Arsen

Najčešći oksidacijski brojevi arsena su +5, +3 i -3, u koje je element sposoban oblikovati i organske i anorganske spojeve u okolišu i unutar organizma (Hei i Filipić, 2004.). U kombinaciji s drugim elementima kao što su kisik, sumpor i klor naziva se anorganski arsen, a u kombinaciji s vodikom i ugljikom, organski arsen. Arsen je toksičan u peterovalentnom i trovalentnom obliku. Stvara ozbiljne posljedice na zdravlje nakon udisanja ili gutanja. Udisanje arsena povezano je s rakom pluća, limfomom, leukemijom i urinarnom ekskrecijom arsenita i arsenata, već 8 sati nakon izlaganja (Jokukowski i sur., 1998.). Proizvodnju ATP arsen narušava putem nekoliko mehanizama. Na razini ciklusa limunske kiseline, arsen inhibira lipoičnu kiselinu, koja je kofaktor za piruvat dehidrogenazu. Osim toga, natječući se s fosfatom, arsenat uklanja vezu oksidativne fosforilacije, čime se sprječava energetski povezano smanjenje  $\text{NAD}^+$ , mitohondrijska respiracija i sinteza ATP-a. Proizvodnja vodikova peroksida također je povećana, što može dovesti do stvaranja reaktivnih vrsta kisika i oksidativnoga stresa. Ove metaboličke smetnje dovode do nekroze stanica, što dovodi do otkazivanja organa (Hughes, 2002.). Akumulacija arsena varira jer to ovisi o vrsti hrane koju životinje konzumiraju (John i Jeanne, 1994.). U akutnom trovanju javlja se glavobolja, mučnina i teška iritacija probavnoga sustava (Allan i sur., 1995.).

Anorganski arsen i njegovi spojevi (nakon ulaska u hranidbeni lanac) postupno se metaboliziraju procesom metilacije (Sakurai, 2003.; Reimer i sur., 2010.). Osim oksidativnoga stresa, arsen negativno djeluje na sposobnost popravka DNA (McMurray i Tainer, 2003.). Budući da se arsen brzo metabolizira i izlučuje putem urina, zbroj metabolita arsena može se koristiti kao biomarker nedavne izloženosti koncentracijama arsena (Le i sur., 1994.). S obzirom da meso i iznutrice divljači nisu označene kao namirnice s visokom razinom arsena (EFSA, 2009.) učestala konzumacija ne bi značajno utjecala na dnevni unos arsena hranom.

### 1.2.5. Željezo

Željezo se pojavljuje u oksidacijskom stanju +2 i +3. Fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ioni su topivi u biološkim tekućinama i generiraju se u prisutnosti kisikovog štetnog hidroksilnog radikala. Fero ioni su nestabilni u vodenim medijima i imaju tendenciju da reagiraju s molekularnim kisikom kako bi se dobili feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ioni i superoksid anion radikal. Oksidirani oblik željeza netopiv je u vodi pri neutralnom pH, a taloži se u obliku feri hidroksida (Jones-Lee i Lee, 2005.). Unatoč činjenici da su oba iona željeza, i fero i feri, vrlo nedostupni, željezo je ključno katalitičko mjesto mnogih enzima i kisik-transportnih proteina u stanici. Iako je željezo bitno za život, ono može biti toksično kada je prisutno u suvišku (Lee i sur., 2006.). Homeostaza željeza je složen proces, postoji mnogo različitih bjelančevina koje ne reagiraju samo na ukupnu količinu željeza u organizmu, već i na podražaje kao što su hipoksija, anemija i upala. Oko 65% željeza veže se za hemoglobin, 10% sastavni je dio mioglobina, citokroma i enzima koji sadrže željezo, a 25% je vezano za bjelančevine koje vežu željezo, feritin i hemosiderin (Cheng i Li, 2007.). Oko 0,1% željeza u organizmu cirkulira u plazmi. Postupak keliranja ne samo da olakšava transport željeza u stanicama nego također sprječava posredovanje slobodnih radikala u toksičnosti željeza. Redoks stanje stanice uglavnom ovisi o željezovim (i bakrovim) redoks parovima, a odražava se unutar strogih fizioloških granica (Park i sur., 2009.). Homeostatski mehanizmi sprečavaju prekomjernu resorpciju željeza u crijevima i reguliraju brzinu otpuštanja željeza (Ganz, 2003.). Raspored željeza reguliran je kompleksnim mehanizmom za održavanje homeostaze, uglavnom uključujući unos, pohranu i gubitak. Općenito, oko 2 do 15% resorbira se iz probavnog sustava, dok je uklanjanje resorbiranog željeza samo 0,01% po danu. Na resorpciju željeza utječe količina i bioraspoloživost željeza iz hrane, količina prostora za pohranu željeza i stopa proizvodnje eritrocita. Tijekom razdoblja



povećane potrebe za željezom (djetinjstvo, trudnoća i gubitak krvi), resorpcija željeza znatno se povećava. Resorpcija se javlja u dva koraka: resorpcija iona željeza iz crijevnog lumena u stanice sluznice i prijenos iz stanica sluznice u plazmu, gdje se veže za transferin koji obavlja prijenos i pohranu. Transferin je  $\beta_1$ -globulin, a proizvodi se u jetri (Goyer i Thomas, 1996.). Željezo, cink, bakar, mangan i selen važni su minerali koji se nalaze u mesu (Lugasi, 2006.). Iz mesa se resorbira 15 do 35% željeza, dok se samo 1 do 5% željeza resorbira iz hrane biljnog podrijetla (Rodler, 2009.). Mikroelementi poput željeza imaju značajnu ulogu u metaboličkim procesima organizma.

#### **1.2.6. Zakonodavstvo vezano za teške metale u mesu**

U Republici Hrvatskoj ne postoji nacionalna legislativa za najviše dopuštene koncentracije teških metala u tkivima i iznutricama divljih životinja koje su namjenjene za hranu ljudi. Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih konataminata u hrani (NN 154/08), donesenom prema Uredbi Europske komisije br. 1881/2006/EZ (EC, 2006.) i 629/2008/EZ (EC, 2008.), nacionalna legislativa određuje najviše dopuštene koncentracije metala u domaćim životinjama (mg/kg). Ovim Pravilnikom, odnosno Uredbom, nisu obuhvaćene vrijednosti za živu.

Pravilnikom o izmjenama i dopunama Pravilnika o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 78/2011) donesenom prema Uredbi Europske komisije br. 420/2010 (EC, 2011.) u potpunosti su izbrisane vrijednosti za arsen, željezo i nikal koje se mogu naći u hrani, što znači da koncentracije ukupnog arsena u tkivima divljači više ne podliježu zakonskim propisima.

U procjeni zdravstvene ispravnosti mesa i iznutrica divljači za procjenu koriste se vrijednosti Pravilnika pod nazivljem meso i iznutrice odnosno jetra i bubreg goveda, ovaca, svinja i peradi.

Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminata u hrani (NN 154/08) najviše dopuštene koncentracije metala (mg/kg) u pojedinim tkivima prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Najviše dopuštene koncentracije metala (mg/kg) prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 154/08).

ORGAN GOVEDA, OVACA, SVINJA I PERADI	Pb (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Hg (mg/kg)	As (mg/kg)
JETRA	0,5	0,5	-	0,5
BUBREG	0,5	1,0	-	0,5
MIŠIĆ	0,1	0,05	-	0,1

Pb = olovo; Cd = kadmij; Hg = živa; As = arsen.

### 1.3. Biljke i teški metali

Biljke nakon izloženosti teškim metalima doživljavaju oksidativni stres koji dovodi do staničnog oštećenja i poremećaja stanične ionske homeostaze. Da bi se smanjili štetni učinci izloženosti teškim metalima i njihova akumulacija, biljke su razvile detoksikacijske mehanizme koji se uglavnom temelje na keliranju i raspodjeli u različite unutarstanične odjeljke. Osnovna skupina kelatora teških metala u biljkama su fitokelatini, oni se sintetiziraju bez translacije iz reduciranog glutationa u transpeptidaznoj reakciji kataliziranoj enzimom fitokelatin sintetaze. Dakle, dostupnost glutationa vrlo je bitna za sintezu fitokelatina u biljkama tijekom izlaganja teškim metalima (Yadav, 2010.). Mahunarke (*Fabaceae*) i biljke klasificirane kao krmno bilje akumuliraju mnogo veće količine teških metala od trava (Děbska-Kalinowska i sur., 1999.). Koncentracija teških metala ovisi o vrsti bilja i njihovoj okolini.

Teški metali u tlu djeluju na rast biljaka, pokrivenost tla i imaju negativan utjecaj na mikrofloru tla (Roy i sur., 2005.). Poznato je da se teški metali ne mogu kemijski razgraditi i trebaju se fizički ukloniti ili pretvoriti u netoksične spojeve (Gaur i Adholeya, 2004.). Teški metali u tlima toksični su za biljke, životinje i ljude zbog njihove mogućnosti transporta u hranidbene lance. Ukupna koncentracija teških metala služi kao pokazatelj za odgovarajuću procjenu statusa onečišćenosti tla. Međutim, ona nisu u mogućnosti pružiti dovoljno informacija o bioraspoloživosti, mobilnosti i toksičnosti teških metala (Zhong i sur., 2011.). Mobilnost i oslobađanje teških metala u tlima ovisi o njihovoj ukupnoj koncentraciji, specifičnom kemijskom obliku, stanju vezanja, metalnim svojstvima, okolišnim čimbenicima i svojstvima tla (Hooda, 2010.).

Biljke su razvile vrlo specifične i učinkovite mehanizme za dobivanje potrebnih nutrijenata iz prirode, čak i kada su prisutni u niskim koncentracijama. Korijenje biljke, uz

pomoć biljne proizvodnje i inducirane promjene pH i redoks reakcije ima mogućnost otapanja i unosa mikronutrijenta iz tla kada su oni zastupljeni u niskim koncentracijama, a tu mogućnost imaju i kod gotovo netopivih taloga. Biljke su također razvile vrlo specifične mehanizme kako bi premjestile i pohranile mikronutrijente. Ti isti mehanizmi također su uključeni u unos, premještanje i skladištenje toksičnih elemenata. Zbog toga su mehanizmi unosa nutrijenata od velikog interesa za fitoremedijaciju. Raspon poznatih transportnih mehanizama ili specijaliziranih bjelančevina uklopljenih u membrane stanice biljke (plazmalemu, tonoplast, membrane staničnih organela) koji su uključeni u unos i premještanje iona uključuju: proton crpke (ATP-aze koje troše energiju i generiraju elektrokemijski gradijent), kotransportere i antitransportere (bjelančevine koje koriste elektrokemijski gradijent generiran putem ATP-aze za prijenos aktivnog unosa iona) i ionske kanale (bjelančevine koje olakšavaju transport iona u stanicu). Najznačajniji način transporta metalnih iona kroz biljku je ascendentno kretanje ksilemom, dok su manje poznati ostali mehanizmi kretanja metalnih iona kroz biljku (Anonymous, 1994.). Biljne vrste koje akumuliraju teške metale poput kadmija, cinka, kobalta, mangana, nikla i olova mogu preuzeti 100 ili 1000 puta više metala od neakumulirajućih biljaka. U većini slučajeva, mikroorganizmi, bakterije i gljivice, žive u rizosferama usko povezani s biljkama, mogu doprinijeti mobilizaciji metalnih iona, povećavajući bioraspoloživost frakcije. Njihova uloga u uklanjanju organskih kontaminata još je važnija nego u slučaju anorganskih spojeva (Erdei i sur., 2005.). Nekoliko čimbenika utječu na uspješnost fitoremedijacije i mehanizme usvajanja teških metala, to su: biljna vrsta i genotip, vegetativna resorpcija i dodatak kelirajućeg sredstva (Tangahu i sur., 2011.). Usvajanje metala putem biljaka ovisi o bioraspoloživosti metala u vodenoj fazi, što opet ovisi o vremenu zadržavanja metala, kao i interakciji s ostalim elementima i tvarima u vodi. Nadalje, kada su metali vezani za tlo, pH, redoks potencijal i organska tvar utjecati će na sklonost metala da postoji u ionskom i biljci dostupnom obliku. Biljke će utjecati na dostupnost metala u tlu preko njihove sposobnosti da smanje pH i razinu kisika u supstratu (Fritioff i Greger, 2003.). Tako se u postupcima fitoremedijacije povećava bioraspoloživost teških metala dodavanjem biorazgradivih fizikalno-kemijskih faktora, kao što su kelirajući agensi i mikronutrijenti (Van Ginneken i sur., 2007.).

#### 1.4. Selen i biološka uloga u višestaničnim organizmima

Selen je važan mikronutrijent kod svih životinja. Potreban je za najosnovnije fiziološke funkcije kao komponenta 21. aminokiseline, selenocisteina. Adekvatna koncentracija selena važna je za reprodukciju, metabolizam kostiju, funkciju imunološkog sustava i metabolizam joda. Ipak, selen je relativno rijedak element i često je prisutan u niskim koncentracijama u tlu i vegetaciji. Nedostaci selena zabilježeni su kod domaćih i nekih populacija divljih životinja. Na koncentraciju selena u organizmu može utjecati povećana razina oksidativnog stresa. Koncentracija selena kod biljojeda, koji svoju koncentraciju selena dobivaju prvenstveno iz biljaka, ovisi o geološkim i klimatskim čimbenicima okoliša (Flueck i sur., 2012.). S obzirom da nije esencijalan za biljke, tlo siromašno selenom ne osigurava dovoljnu količinu za prijenos u biljke. Stoga se dodaje kao dodatak hrani, jer je neophodnim sastojkom selenoproteina koji igraju važnu ulogu u reprodukciji, regulaciji djelovanja hormona štitnjače, djelotvornosti imunog sustava, sintezi DNA i zaštiti od oksidativnog oštećenja i infekcije (Sunde, 2012.).

U posljednjih nekoliko godina selen je privukao veliku pozornost zbog svog antioksidativnog i imunostimulirajućeg djelovanja. Ukupan iznos selena u ljudskom organizmu varira od 10 do 20 mg. Polovica količine selena u organizmu nalazi se u skeletnim mišićima, iako organi poput bubrega, testisa i jetre imaju najveću relativnu koncentraciju selena. S druge strane, stanice koje imaju najveću potrošnju selena su one imunskog sustava, eritrociti i trombociti. Selen se uglavnom iz organizma izlučuje mokraćom, a značajni su i gubici putem fecesa (Burk i Levander, 2002.).

Nedostatak Se povezuje se s mnoštvom bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, upalne procese i tumorozna bujanja. Selen iz biljnog izvora ima najveću bioraspoloživost (više od 60%), dok je bioraspoloživost selena iz životinjskog podrijetla manja od 25%. Selen se nalazi u svim stanicama i tkivima tijela u različitim koncentracijama. Bubrezi svinja, goveda i ovaca imaju najveću koncentraciju (1 do 3 mg/kg), zatim jetra (0,2 do 0,9 mg/kg), srce (0,1 do 0,7 mg/kg) i skeletni mišić (0,1 do 0,2 mg/kg; Ullrey, 1987.). Životinjska mast sadrži malo selena, jer se on veže s bjelančevinama. Mišići sadrže 40% količine cjelokupnog selena, probavni sustav 12%, kosti 10%, bubreg 7% i jetra 6%. Mehanizam toksičnosti selena nije u potpunosti izražen, ali smatra se da prevelika koncentracija selena u organizmu inhibira enzime dehidrogenaze i uklanja sulfhidrilne skupine važne za stanične oksidativne procese. Kod suficita selena dolazi do pojave akutne ili kronične selenoze. Akutna selenoza nastaje kada se u kratkom vremenskom intervalu primi visoka koncentracija selena. Kronična

selenoza nastaje kada se u dužem vremenskom razdoblju primi hrana koja sadrži više od 5, a manje od 40 mg selena po kg (Todorović i sur., 2001.). Selen je prisutan u mnogim namirnicama, a dostupan je i kao dodatak hrani.

Sadržaj selena u tlu procjenjuje se na temelju odnosa fizioloških potreba čovjeka i fizioloških potreba životinja temeljeno na prosječnom sadržaju selena u tlu pojedinih promatranih područja. Gupta i Gupta (2000) smatraju da je nedovoljan ukupan sadržaj selena u tlu manji od 0,6 mg/kg. Proizvodnja usjeva na tlima s manjom koncentracijom od spomenute uzrokuje manjak selena kod životinja. Kabata-Pendias i Pendias (2001) navode da sadržaj selena u tlu i biološkom materijalu varira u širokom opsegu. Prosječni sadržaj selena u tlu iznosi 0,33 mg/kg, a varira ovisno o tipu tla i lokalitetu od 0,25 do 0,37 mg/kg.

Usvajanje selena putem biljaka i ukupan iznos u biljnim tkivima pod utjecajem je mnogih čimbenika, uključujući sadržaj selena u tlu, njegov oblik, reakciju tla, redoks potencijal tla, mineralnu strukturu tla, mineralna gnojiva i oborine. Još jedan čimbenik koji sudjeluje u ukupnom primanju selena je atmosfera. S aspekta fiziologije bilja, selen pripada skupini korisnih ili beneficianalnih elemenata. U smislu raspoloživosti, oblik selena je važniji čimbenik od ukupnog iznosa selena u tlu (Surai, 2006.). Biljka može resorbirati selen u anorganskom obliku kao selenat ili selenit ili u organskom obliku kao selenometionin (Kopsell i Kopsell, 2007.). Prema opisu različitih autora selenat je dobro topljiv i za biljku lako dostupan oblik selena.

Hrana kao i biološki sustavi, mogu sadržavati anorganske (selenit i selenat) i organske (Se-aminokiseline, metilirane oblike i selenoproteine) oblike selena (Pedrero i sur., 2009.). Dominantni oblik selena u hrani utječe na prihvatljivost selena za organizam i njegovu dostupnost u sintezi bjelančevina i proizvodnji metiliranih spojeva selena (Rayman, 2008.). U usporedbi sa anorganskim oblicima selena, organski su dostupniji za organizam i mogu se lako resorbirati. Oni se metaboliziraju u strukturama selenoproteina i ostalih specifičnih bjelančevina, a u manjoj mjeri izlučuju se bubrezima (Daniels, 1996.). Na primjer, selenometionin koji se nalazi u biljnim proizvodima, ulazi izravno u metabolizam bjelančevina zamijenivši esencijalni metionin ili postaje dio metabolizma selena (Combs, 2001.). S druge strane, anorganski selen resorbira se u mineralnom obliku i pohranjuju se u manjoj mjeri u tkiva, a znatan dio izlučuje se mokraćom. Se-aminokiseline i selenometionin pretvaraju se u strukture bjelančevina (Finley, 2006.; Rayman i sur., 2008.). U selenoproteinima selen je u obliku sintetiziranog selenocisteina (Brown i Arthur, 2001.). Najvažniji selenoprotein u organizmu je glutation peroksidaza. Njezina aktivnost u organizmu smatra se pokazateljem opskrbe selenom (Tapiero i sur., 2003.).

### 1.4.1. Biološka funkcija selenoproteina

Ukupno 35 selenoproteina identificirano je kod životinja i ljudi, svi oni sadrže selenocisteine u svojim aktivnim mjestima (Arthur, 2000.; Kryukov i sur., 2003.; Raymond i Ralston, 2004.). Najvažnija poznata funkcija selenoproteina je antioksidacijska obrana, uključujući uklanjanje aktivne vrste kiska kao što je vodikov peroksid, hidroperoksidi i slobodni radikali koji sadrže kisik, odnosno toksični produkti aerobnog disanja (Schedrina i sur., 2010.). Te reaktivne vrste kisika reagiraju sa nezasićenim spojevima lipida, uzrokujući degradaciju stanične membrane. Četiri glutation peroksidaze, kao i tioredoksin reduktaze i drugi selenoproteini djeluju kao antioksidirani hvatači u različitim tkivima. Serdaru i sur. (2004) pokazali su da je sinteza selenoproteina važna za rani razvoj sisavaca, zabilježeno je da je čak i tijekom razdoblja nedostatka selena kod odrasle životinje, nastavljena opskrba teladi selenom preko kolostruma iscrpljivanjem vlastitih rezervi majke. Genomske studije identificirale su bjelančevinu koja je homologna selenoproteinu N koji je jedinstven za kralješnjake (Rederstorff i sur., 2006.). Selen se nalazi u ljudskim i životinjskim tkivima kao L-selenometionin i L-selenocistein. Samo male frakcije L-metionina u bjelančevinama prisutno je kao L-selenometionin. S druge strane, ugradnja L-cisteina u selenoproteine nije slučajna. Naime, za razliku od L-selenometionina, koji se nasumično zamjenjuje za L-metionin, L-selenocistein se ne zamjenjuje slučajno za L-cistein (Brown i Arthur, 2001.). Selenoproteini obavljaju razne fiziološke uloge. Oni su sastavljeni od četiri selen-ovisne glutation peroksidaze (GSHPx-1, GSHPx-2, GSHPx-3 i GSHPx-4), tri selen ovisne iodtironin dejodinaze, tri tioredoksin reduktaze (selen je na aktivnom mjestu enzima), selenoproteina P, selenoproteina W i selenofosfat sintetaze. Glutacion peroksidaze, a možda i selenoprotein P i selenoprotein W su antioksidativne bjelančevine koje smanjuju potencijalna oštećenja reaktivnih vrsta kisika (ROS), kao što su vodikov peroksid i lipid hidroperoksidi (Čepelak i Dodig, 2003.). Druga velika skupina selenoproteina su enzimi iodtironin dejodinaze (tipa 1, 2 i 3) koje kataliziraju 5'-mono-dejodiranje prohormona tiroksina (T4) i aktivni tiroidni hormon 3, 3', 5-trijodtironin (T3) čime se regulira metabolizam hormona štitnjače. Sve tri različite selen ovisne iodtironin dejodinaze mogu i aktivirati i onesposobiti hormone štitnjače, tako da je selen esencijalni element za normalan razvoj, rast i metabolizam kroz regulaciju hormona štitnjače (Larsen i sur., 1998.). Selenoprotein P je izvanstanični protein koji sadrži 10 atoma selena po molekuli, može poslužiti kao transportni protein za selen. Oko 60% selena u plazmi ugrađeno je u selenoprotein P. Funkcija selenoproteina P nije potpuno razjašnjena, smatra se da on djeluje kao transportna bjelančevina, te antioksidans koji je sposoban zaštititi endotelne

stanice od oštećenja reaktivnih skupina dušika (RNS) zvanih peroksinitrit. Povezuje se s endotelnim stanicama, vjerojatno putem heparin-vezanih osobina (Saito i Takahashi, 2002.; Burk i sur., 2003.). Selenoprotein W nalazi se u mišićima i smatra se da igra ulogu u metabolizmu mišića (Whanger, 2000.).

#### **1.4.2. Prirodni izvori selena i metabolički put u organizmu sisavaca**

Postoji nekoliko spojeva selena u tkivima biljaka, životinja i morskim plodovima. Različite koncentracije selena mogu se naći u hrani iz različitih zemljopisnih područja, uglavnom zbog razlike u ukupnom sadržaju selena u tlu, kao i zbog razlike u njegovoj raspoloživosti u biljkama (Goldfarb, 1999.). Životinjski proizvodi, posebno iznutrice, bogatiji su selenom od biljnih proizvoda (Whanger, 2000.; Jameson i Diamond, 2004.). Postoji velika razlika u sadržaju selena u biljkama. To je zbog toga što za biljke nije neophodan. Komponente selena koje se pronalaze u hrani su: selenat (glavna anorganska komponenta pronađena i u životinjskim i u biljnim tkivima), selenocistein, selenometionin i selen-metil selenocistein (glavni spoj selena kod biljaka koje su obogaćene selenom, kao što su češnjak, luk i divlji poriluk). Selenometionin je glavni spoj selena u žitaricama, mahunarkama i soji (Whanger, 2002.). Meso, pileтина, riba i jaja su namirnice koje sadrže velike koncentracije selena (Klapec i sur., 2004.; Sirichakwal i sur., 2005.). S druge strane, voće sadrži male koncentracije selena, ta činjenica se može objasniti manjom frakcijom bjelančevina i stoga velikim sadržajem vode. Isto tako i svježe povrće se pokazalo kao siromašan izvor selena (Sirichakwal i sur. 2005.). Zbog količine prirodnog selena u namirnicama koja je izrazito varijabilna, došlo je do razvoja komercijalne uporabe organskog selena i to u obliku selenometionina kao izvora dodatne količine selena u organizmu životinje. Koncentracije selena u stočnoj hrani od 0,1 do 0,5 mg/kg u suhoj tvari prihvaćene su kao sigurne u smislu moguće toksičnosti selena. Simptomi kroničnih i akutnih trovanja opisani su kod koncentracija od 2 do 5 mg/kg (Edmondson i sur., 1993.).

Nekoliko oblika selena ulazi u organizam, kao dio aminokiselina u bjelančevinama. Dva najčešća oblika elementa koji ulaze u organizam su selenometionin i selenocistein koji se uglavnom nalaze u biljkama, odnosno životinjama (Burk i Levander, 1999.). Bioraspoloživost selena ovisi o njegovom kemijskom obliku, što također utječe na raspodjelu selena u organizmu. Selenometionin se zadržava u bjelančevinama tkiva u većoj mjeri nego selenocistein i anorganski oblici, selen nije nužno odmah na raspolaganju funkcionalnim

selenoproteinima. Brojni drugi čimbenici, osim kemijskog oblika, mogu utjecati na bioraspoloživost i distribuciju selena, kao što su: ostale prehrambene komponente, status selena, fiziološko stanje i lijekovi (Thomson, 1998.). Primarno mjesto resorpcije je dvanaesnik, resorpcije u želucu gotovo da i nema, a vrlo mali dio resorbira se u dvama segmentima tankog crijeva. Resorpcija selena usko je povezana s više nutritivnih čimbenika koji inhibiraju ili potiču resorpciju. Vitamini A, C i E zajedno s reduciranim glutationom povećavaju resorpciju elementa. Nasuprot tome, teški metali (poput Hg) smanjuju resorpciju putem taloženja i keliranja (Groff i sur., 1995.). Selenoproteini se enzimski razgrade u tankom crijevu, čime se dobiju aminokiseline, oligopeptidi, L-selenometionin i L-selenocistein (Swanson i sur., 1991.; Schrauzer, 2000.). Nakon resorpcije iz tankog crijeva, putem mehanizma sličnom onom u L-metioninu, L-selenometionin transportira se u jetru gdje je ekstrahiran putem hepatocita. Preostali dio prenosi se cirkulacijom u razna tkiva u organizmu. L-selenometionin ulazi u L-metionin u hepatocitima i ostale tjelesne stanice i ima istu metaboličku sudbinu kao L-metionin, dok se ne metabolizira. Naime, L-selenometionin sudjeluje u sintezi bjelančevina i formiranju seleno-adenozilmetionina, homoselenocisteina i L-selenocisteina. Metabolizam L-selenocisteina nešto je drugačiji od onoga L-cisteina. L-selenocistein prevodi se u vodikov selenid putem enzima selenocistein  $\beta$ -liaze. Vodik selenid može se metabolizirati do selenofosfata (prekursora L-selenocisteina u bjelančevinama ili selen nukleozida u prijenosu RNA) preko selenofosfat sintetaze ili se može metilirati. Metilirani metaboliti izlučuju se u mokraći (Schrauzer, 2000.).

### **1.5. Implikacija selena i teških metala**

Postoji mnoštvo podataka o zaštitnom učinku selena protiv djelovanja teških metala u organizmu. S druge strane, na resorpciju, distribuciju i eliminaciju selena kod životinja mogu značajno utjecati okolišni i hranidbeni čimbenici kao što su teški metali (McKinney, 1993.). Selen može štititi od toksičnog učinka teških metala, dima cigareta, alkohola, oksidacije masti, a posebno oštećenja živom i kadmijem (Lazarus i sur., 2010.). Selen dolazi u aminokiselini selenocisteinu koja je sastavni dio brojnih enzima i neenzimskih molekula koje se zbog svoje građe nazivaju selenoproteini. Pri tome najvažniji su enzim glutation peroksidaza, tireodoksin reduktaza, selenoprotein P, jodotironin dejodinaze, seleno-fosfat sintetaza i selenoprotein W (Surai, 2006.). Poznato je da se olovo, kadmij i živa javljaju u okolišu i prisutni su kao kontaminanti u hrani, te imaju brojne interakcije s metabolizmom



selena (Oishi i sur., 2000.). Selen također tvori netopljive komplekse sa srebrom, bakrom, kadmijem i živom. Može spriječiti toksične učinke kadmija, a može smanjiti i toksični učinak metil-žive (WHO, 1996.). Wangher (2001) je izvjestio da selen suzbija neurotoksičnost žive, kadmija, olova i vanadija. Jedan od glavnih mehanizama koji stoji iza toksičnosti teških metala je oksidativni stres. Antioksidansi, kao što su selen i vitamin E, djeluju u zaštiti stanice protiv djelovanja slobodnih radikala koji su štetni nusproizvodi metabolizma. Slobodni radikali mogu oštetiti stanice i pridonijeti razvoju bolesti (Van Gaal i sur., 2006.). Poznato je da kod životinja selen može suzbiti toksičnost različitih elemenata, posebno dvovalentne žive i metil-žive (Ganther i sur., 1972.; El-Begearmi i sur., 1982.; Satoh i sur., 1985.; Fredriksson i sur., 1993.; Beyrouy i Chan, 2006.). Selen je prisutan u riba i morskih sisavaca zajedno sa metil-živom (Cabanero i sur., 2005.; Burger i Gochfeld, 2007.), što upućuje da selen može imati ulogu u zaštiti od toksičnosti metil-žive. Selen djeluje na sve komponente imunog odgovora, uključujući razvoj i ekspresiju kako nespecifičnog, tako humoralnog i staničnog imunog odgovora. Deficit selena uzrokuje imunosupresiju, a dodavanje već manjih koncentracija selena obnavlja funkcije imunog sustava. Poznato je da nedostatak selena snižava otpornost na bakterijske i virusne infekcije, smanjuje funkciju neutrofila, proizvodnju protutijela, proliferaciju T i B limfocita u odgovoru na mitogene i stanično propadanje T limfocita i NK stanica (Kiremidjian-Schumacher i Stotzky, 1987.).

### 1.5.1. Međudjelovanje kadmija i selena

Mnogi toksični učinci kadmija nastaju zbog njegova međudjelovanja s esencijalnim elementima. Pretpostavlja se da kadmij za ulazak u stanicu koristi transportne sustave esencijalnih elemenata (Himeno i sur., 2009.) i tako smanjuje njihovu resorpciju (Peraza i sur., 1998.). Kod životinja i ljudi sa niskim koncentracijama željeza u organizmu povećana je resorpcija kadmija iz probavnog sustava (Flanagan i sur., 1978.; Bárányi i sur., 2005.) i povišenje koncentracije kadmija u tkivima (Tandon i sur., 1994.; Piasek i sur., 2004.). Selen štiti od toksičnosti kadmija. Gasiewicz i Smith (1976) istraživali su prirodu vezanja kadmija i selena u pokusima s radioaktivnim izotopima na štakorima u uvjetima *in vivo* i *in vitro* te pokazali da primijenjeni selen ne ulazi u izravnu reakciju s ionima kadmija i bjelančevinama plazme, već se prvo reducira u eritrocitima uz prisutnost glutaciona. Detalje vezanja i stvaranja proteinskog kompleksa otkrili su japanski istraživači dvadeset godina kasnije. Oni su pokazali da se selen, primljen u organizam pokusnih životinja u obliku selenita, vrlo brzo

selektivno transportira u eritrocite putem anion-transportnog proteina (AE1; Galanter i sur., 1993.), tamo se reducira te izbacuje u plazmu u obliku selenida. Selenid se u molarnom omjeru 1:1 spaja s ionima kadmija ili žive. Nastali kompleks veže se selektivno za kationski centar specifičnoga plazmatskog proteina prepoznatog kao selenoprotein P te nastaje tercijarni kompleks (Sasakura i Suzuki, 1998.). Kao najvjerojatniji mehanizam detoksifikacije organizma selenom predložen je onaj gdje selen utječe na pojačano vezanje kadmija u kompleks s bjelančevinama velike molekularne mase čime se mijenja njegov metabolički put u organizmu. Ako se organizam izlaže samo kadmiju, on dospijeva u krv gdje se transportira plazmom, većinom vezan za albumin i druge bjelančevine te odlazi u jetru gdje potiče stvaranje kadmij-cink metalotioneina (Cd, Zn-MT). Kadmij se zatim veže za te novosintetizirane molekule MT-a, sporo otpušta iz jetre te zbog male molekularne mase (oko 7 kDa) učinkovito filtrira kroz membranu glomerula i reapsorbira u stanice proksimalnih bubrežnih kanalića. Nakon što Cd-MT uđe pinocitozom u stanice, katabolizira se u lizosomima te se u stanici oslobađaju ioni kadmija koji stimuliraju *de novo* sintezu endogenoga bubrežnog MT-a koji sadržava kadmij, cink i bakar. Vezanje za MT mehanizam kojim se organizam štiti od kadmija, a kada njegova količina u jetri ili bubregu premaši kapacitet vezanja MT-a, slobodni ioni kadmija mogu izazvati hepatotoksičnost i nefrotoksičnost (Chen i sur., 1975). Neke studije također su pokazale da selen stimulira antioksidativne enzime u nezrelom bubregu kod štakora izloženih kadmiju i da može zaštititi od oksidativnog oštećenja (Lazarus i sur., 2010.). Hepatotoksični učinci kadmija opsežno su proučavani kod različitih životinjskih vrsta (Sheweita, 1998.; Grawe i sur., 2004.; Shimada i sur., 2004.). Osim toga, toksičnost kadmija može se pripisati promjenama u antioksidativnom obrambenom sustavu (Ognlanović i sur., 1995.). Malo je informacija dostupno o zaštitnom učinku selena protiv kadmij-inducirane hepatotoksičnosti.

### 1.5.2. Međudjelovanje olova i selena

Olovo je okolišni i industrijski zagađivač koji je otkriven u gotovo svim biološkim sustavima. Mnoga istraživanja provedena su na utjecajima olova na ponašanje, fiziološke i biokemijske učinke kod životinja, uključujući poremećaje centralnog i perifernog živčanog sustava, krvožilnog sustava, bubrega, jetre i spolnog sustava. Toksični učinak olova povezan je s vezanjem na metalotionein koji je bogat sulfhidrilnim skupinama impliciranim u homeostazi cinka i bakra (Ping-chi i Yueliang, 2002.). Pokazano je da primjena olova

reducira probavnu resorpciju kalcija, željeza, cinka i selena. Ta interakcija s metabolizmom dvovalentnih kationa molekularna je osnova toksičnosti olova (Gottipalu i sur., 2006.). U posljednjih nekoliko godina mnoga istraživanja posvećena su utjecaju između toksičnih i esencijalnih metala. Tako da jedan metal služi kao koristan ili manje štetan element za borbu protiv oštećenja koja su potaknuta drugim toksičnim metalom. U tom pogledu, selen i cink pokazali su obrat u toksičnosti olova kod pokusnih životinja (Nehru i sur., 1997.; Patricia i sur., 2005.). Selen i cink dva su elementa koja su esencijalna za normalne metaboličke reakcije. Selen reducira toksičnost nekoliko metala vjerojatno putem formiranja inertnoga selenid kompleksa. Također je poznato da selen osigurava zaštitu od reaktivnih skupina kisika (ROS), koje izazivaju oštećenja stanica (Santamaria i sur., 2003.). Visoke koncentracije selena u plazmi smanjuju toksičnost olova (Nehru i Dua, 1997.; Xie i sur., 1998.). Iako temeljni mehanizam toga utjecaja nije jasan, neka istraživanja ukazuju da se selen veže s otrovnim metalima i smanjuje ili uklanja njihov učinak (Peraza i sur. 1998.; Xie i sur., 1998.). Antioksidativni učinak također može biti važan čimbenik koji smanjuje toksičnost olova (Holben i Smith, 1999.; Stadtman 2002.).

### 1.5.3. Međudjelovanje žive i selena

Selen je esencijalni element i dobar antioksidans za sva tkiva životinja i ljudi. Osim toga, postoji u različitim oblicima kao što su selenit i selenat, a važan je za više biokemijskih i fizioloških procesa (Su i sur., 2008.; Jihen i sur., 2009.; Sakr i sur., 2011.). Natrijev selenit, prehrambeni oblik selena, bitan je u životinjskoj i ljudskoj prehrani (Shilo i sur., 2003.). Geyikolu i Turkez (2005) izvjestili su da natrijev selenit ima antikancerogena i antimutagena svojstva. Mnoga istraživanja pokazala su zaštitni učinak natrijevog selenita kod toksičnosti žive (Perotoni i sur., 2004.). Interakcija između žive i selena u organizmu uglavnom ovisi o kemijskom obliku i koncentraciji oba elementa (uključujući i hranidbu), trajanju izlaganja, kao i vrsti organizma (riba, ptica ili sisavac; Cuvin-Aralar i Furness, 1991.; Bjerregard i sur., 2011.). Stvaranje netopivih spojeva žive i selena jedan je od procesa kojima selen može spriječiti toksičnost žive (Watanabe, 2002.; Carvalho i sur., 2011.). Spojevi žive, zbog svoje sveprisutnosti, nedostatka bioloških funkcija i toksičnosti predstavljaju opasnost za zdravlje, posebno metil-živa, koja ulaskom u organizam prelazi krvno-moždanu barijeru i djeluje neurotoksično (Clarkson i Magos, 2006.). Ako se udiše u obliku pare, ne akumulira se u mozgu (Magos, 1997.) već se većinom nakuplja u bubrezima gdje može dovesti do toksičnosti

(Goering i sur., 2000.). Živini spojevi većinom se metaboliziraju u jetri gdje se mogu demetilirati (Mottet i sur., 1997.) ili konjugirati s glutationom (Rana, 2008.) i selenom (Khan i Wang, 2009.). Studije su pokazale vezanje kompleksa živa-selen, srebro-selen i kadmij-selen putem selenoproteina P koji se nalazi u plazmi (Yoneda i Suzuki, 1997.; Sasakura i Suzuki, 1998.), što znači da ta bjelančevina može utjecati na kelate teških metala, smanjujući njihovu toksičnost.

#### **1.5.4. Međudjelovanje arsena i selen**

Selen može imati važnu ulogu u smanjenju znakova toksičnosti arsena (Gailer i sur., 2000.; Sah i Smith, 2012.). Selen je antagonist arsena (Gailer i sur., 2000.) i stoga ima mogućnost smanjiti toksične učinke arsena. Nakon resorpcije, a u odsutnosti drugog elementa, arsen i selen pojedinačno se distribuiraju kroz cirkulaciju do različitih tkiva. Oba elementa vežu se za glutation u jetri formirajući arsen-selen konjugate (Gailer i sur., 2000.) što rezultira eliminacijom putem fecesa kroz hepatobilijarnu rutu ili mokraćnom eliminacijom kada su konjugati izdvojeni u bubregu. Ti procesi olakšavaju uklanjanje viška toksičnih elemenata, kao što je arsen, iz organizma (Sah i Smith, 2012.). Iako su oba elementi u tragovima, arsen i selen imaju različite resorpcijske puteve u stanicama. Primanje arsenata u stanice je putem fosfatnih transportera, a primanje selenata je putem sulfatnih transportera. Selenit i arsenit ne natječu se međusobno prilikom primanja u stanice, ali mogu biti međusobno toksični (Rosen i Liu, 2009.). Neka istraživanja su potvrdila da selen ublažava toksičnost arsena (Biswas i sur., 1999.; Selvaraj, 2012.), dok su druga otkrila da selen povećava toksičnost arsena (Stybło i Tomas, 2001.; Spallholz, 2004.; Huang i sur., 2008.).

#### **1.6. Hematološki i biokemijski pokazatelji**

Hematologija je postala važan dijagnostički alat u veterinarskoj medicini na globalnoj razini. Krvna slika životinja pruža mogućnost kliničkog istraživanja prisutnosti različitih metabolita i drugih sastojaka u organizmu životinje i ima važnu ulogu u procjeni fiziološkog, nutritivnog i patološkog stanja organizma (Doyle, 2006.). Također pomaže u razlikovanju normalnog stanja od stanja stresa, koje može biti nutritivnog, okolišnog ili fizičkog uzroka (Aderemi, 2004.). Dobiveni rezultati moraju se usporediti s normalnim referentnim vrijednostima klinički zdrave životinje, koje služe kao mjerilo. Hematološke vrijednosti kao

što su broj eritrocita (RBC), hematokrit (HCT), prosječni volumen eritrocita (MCV), prosječna masa hemoglobina po eritrocitu (MCH), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC), koncentracija hemoglobina (HGB; Kumar i Pachaura, 2000.) i leukociti (WBC; Gutierrez-De Lar i sur., 1971.), tj. limfociti i monociti su pokazatelji prilagodljivosti na nepovoljne stanišne uvjete, štoviše hematološke vrijednosti koriste se za označavanje stresa i dobrobiti (Anderson i sur., 1999.). Omjer neutrofila/limfocita prihvaćen je kao pokazatelj stresa kod životinja (Puppe i sur., 1997.; Gibb i sur., 2000.; Bueno i sur., 2003.). Studije na jelenima lopatarima u Velikoj Britaniji (Chapman i Chapman, 1980.), Hrvatskoj (Slavica i sur., 2000.; Poljičak-Milas i sur., 2004.) i Sloveniji (Vengušt i sur., 2002.), temelje se na uzorcima koji su dobiveni odmah nakon odstrijela.

Istraživanje biokemijskih pokazatelja u krvi ljudi i životinja omogućavaju razumijevanje fizioloških i metaboličkih procesa, odnosno statusa ravnoteže u organizmu. Najčešći ciljevi istraživanja kod biokemijskih pokazatelja su koncentracije metabolita u serumu (glukoza, kreatinin, urea, trigliceridi i kolesterol). Poznavanje vrijednosti ovih pokazatelja kod ljudi i životinja od važnosti je prvenstveno u veterinarskoj medicini (Boyd, 1988; Cabadaj i sur., 1993.). Uspostavljanje referentnih vrijednosti za razne enzime i metabolite važan je preduvjet za prepoznavanje i dijagnozu bolesti i zdravstvenih problema koji mogu utjecati na uzgoj jelena lopatara.

### **1.6.1. Metaboliti**

Metaboliti su produkti metabolizma. Obilježje im je brza kemijska promjena, oni se ne akumuliraju i imaju ograničeno postojanje u stanici. Metaboliti su proizvodi enzimom katalizirane reakcije koja se javlja u stanici. Budući da su posrednici, imaju tendenciju da budu prisutni u malim koncentracijama.

Čimbenici koji određuju metabolite su: nalaze se unutar stanice, enzimi ih prepoznaju i razgrađuju, proizvod metabolita mora biti u stanju učiti u kasnije reakcije, mnogi metaboliti su regulatori koji kontroliraju brzinu metabolizma, metabolit mora biti koristan za određene biološke funkcije u stanici (Harris, 2003.).

### 1.6.1.1. Glukoza

Metabolizam ugljikohidrata osigurava glukozu, glavni izvor energije za životinjski organizam. Koncentracija glukoze u krvi važan je metabolički pokazatelj funkcioniranja organizma.

U domaćih životinja, hranidba ugljikohidratima daje više od polovine energije potrebne za održavanje, rast i proizvodnju. Glukoza je glavni izvor energije za određena životinjska tkiva i prekursor za sintezu laktoze u mliječnim žlijezdama (Nafikov i Beitz, 2007.). U tankom crijevu, glukoza se apsorbira u krv i putuje u jetru kroz portalnu venu. Jetrene stanice (hepatociti), apsorbiraju veliki dio glukoze i pretvaraju je u glikogen, netopljivi polimer glukoze. Glikogen se pohranjuje u jetri, a može se ponovno pretvoriti u glukozu kada je razina glukoze u krvi smanjena (James i McFadden, 2004.). Većini tkiva i organa, kao što je mozak, glukoza je stalno potrebna kao važan izvor energije. Mala koncentracija glukoze u krvi može izazvati konvulzije, gubitak svijesti i smrt. S druge strane, dugotrajna velika koncentracija glukoze u krvi može dovesti do sljepoće, zatajenja bubrega, vaskularnih bolesti i neuropatija. Prema tome, koncentracija glukoze u krvi mora biti zadržana u uskim granicama. Proces održavanja stabilne koncentracije glukoze u krvi naziva se homeostaza glukoze. Glukoza se brzo metabolizira za proizvodnju adenozin trifosfata (ATP), visokoenergetskih krajnjih produkata. Glukoza se oksidira kroz veliki niz reakcija koje izvuku najveću moguću količinu energije. Ako se glukoza metabolizira u prisutnosti kisika (aerobno), neto produkcija je 36 molekula ATP-a od jedne molekule glukoze, a ako se metabolizam glukoze odvija u odsutnosti kisika (anaerobno), nastaju 2 molekule ATP-a (Szablewski, 2011.).

### 1.6.1.2. Urea

Koncentracija ureje u krvi ovisi o ishrani, a dijagnostički je važna kod bolesti bubrega (Jazbec, 1990.; Kraft i Dür, 1999.). Nastaje oksidativnom deaminacijom aminokiselina u ciklusu ureje u jetri. Urea ulazi u organizam sekrecijom gušterače, a sekundarno prometom vode u crijeva. Sinteza ureje je mehanizam za ekskreciju amonijaka jer većina  $\text{NH}_4^+$  nastala deaminacijom aminokiselina biva pretvorena u ureju. Kako su bjelančevine glavni izvor amonijaka za sintezu ureje, tako količinu ureje u krvi povećava hrana bogata bjelančevinama ili pojačan metabolizam bjelančevina, blaga dehidracija, porast katabolizma bjelančevina i gubitak mišićne mase (Burtis i Ashwood, 1994.). Urea prelazi stanične membrane putem

specijaliziranih membranskih transportera ili putem nespecifičnih vodenih pora (Marsh i Knepper, 1992.). Jednom kad je formirana, urea je nošena vaskularnim sustavom jetre i pasivnom difuzijom kroz tjelesne tekućine. Većina se izluči bubrezima, a oko 25% ureje bude degradirano crijevnim bakterijama. Bakterijska ureaza katalizira razgradnju ureje do amonijaka i ugljičnog dioksida. Tako nastali amonijak koristi se ponovno u jetri za sintezu ureje. Na taj način gubitak ureje je minimalan.

### 1.6.1.3. Ukupni proteini

Ukupni proteini u serumu su zbroj svih proteina u krvotoku i najveća su komponenta krvi. Mjerenje ukupnih proteina koristi se u dijagnostici raznih bolesti jetre i bubrega.

Albumini čine oko 35 do 50% od ukupnih serumskih proteina u većini domaćih životinja. Sintetiziraju se u jetri, a funkcija im je pohrana proteina i transport amino kiselina. Osim toga, albumini djeluju kao opće obvezujući i transportni proteini koji mogu spriječiti gubitak sastavnica putem bubrega. Albumini čine otprilike 75% osmotske aktivnosti plazme jer su mali i brojni. Globulinski proteini čine većinu ne albuminskih proteina mjerenih u krvi. Kada su razdvojeni elektroforezom,  $\alpha$  globulini uključuju lipoproteine i neke reaktante akutne faze,  $\beta$  globulini uključuju druge akutne faze reaktanata i neke imunoglobuline, dok su  $\gamma$  globulini uglavnom imunoglobulini. Elektroforeza proteinskih seruma odvaja različite klase proteina prema veličini i naboju (Sharkley i Radin, 2010.). Proteini plazme imaju ulogu u održavanju koloidnog osmotskog tlaka, kao brza zamjena za neophodne aminokiseline, osiguravaju glukozu kroz glukoneogenezu, u transportu minerala i hormona, u izgradnji enzima i imunološkom sustavu organizma. Dakle, proteini plazme imaju izuzetan značaj u održavanju homeostaze. Ukupna koncentracija proteina plazme u sisavaca iznosi od 50 do 70 g/L (Kaneko, 1997.).

### 1.6.1.4. Globulini

Globulini su imunosne (zaštitne) molekule koje proizvodi imunološki sustav kao odgovor na prodor antigena. Mikroorganizmi koji stimuliraju proizvodnju globulina su bakterije, virusi, plijesni i paraziti. Kroz niz događaja, imunološki sustav reagira na prisutnost antigena proizvodnjom odgovarajućih globulina (Lerner i Lerner, 2003.). Globulinska frakcija uključuje stotine serumskih proteina, nosače proteina, enzime, komplemente i

imunoglobuline. Mnoge komponente imunog sustava sintetiziraju se u jetri, dok se imunoglobulini sintetiziraju putem plazma stanica (Busher, 1990.). Postoje tri podjele globulina na temelju kretanja molekula kroz gel pod utjecajem električne struje (na temelju njihove veličine i napona). To su  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  globulini,  $\alpha$  globulini proizvode se uglavnom u jetri. Postoji veliki broj tzv.  $\alpha$ -1 i  $\alpha$ -2 globulina. Funkcija tih globulina uključuje inhibiciju enzima koji razgrađuju proteine, inhibitora dvaju spojeva bitnih u grušanju krvi i protein koji može transportirati bakar.  $\alpha$  i  $\beta$  globulini djeluju kao enzimi i proteini koji transportiraju spojeve u organizmu.  $\gamma$  globulini djeluju kao obrambena protutitijela protiv antigena.  $\beta$  globulini također se proizvode uglavnom u jetri. Srodan tip  $\alpha$  globulina su  $\beta$ -1 i  $\beta$ -2 globulini. Primjer  $\beta$  globulina uključuje protein koji veže željezo u organizmu.  $\gamma$  globulini proizvode se u stanicama imunološkog sustava poznatim kao plazma stanice. Ovi globulini, poznati kao IgM, IgA i IgG, IgE i IgD predstavljaju protutitijela (Lerner i Lerner, 2003.).

#### 1.6.1.5. Imunoglobulini

Imunoglobulini imaju važnu ulogu u stečenom imunološkom sustavu osiguravajući obranu protiv različitih antigena. Kao i većina eukariotskih proteina (Haltiwanger i Lowe, 2004.; Walt i sur., 2012.), svih pet klasa (IgG, IgM, IgA, IgD i IgE) su glikoproteini. Imunoglobulini pokazuju veliku raznolikost u položaju i broju očuvanih N-vezanih glikolizacijskih mjesta na Fc-kristalizirajućim fragmentima i Fab-fragmentima koji vežu antigen (Arnold i sur., 2007.).

Imunoglobulini G (IgG) proizvode se kao odgovor na bakterijske i virusne infekcije te prisutnost toksina. Pronađeni su u mnogim tkivima i plazmi koja cirkulira organizmom (Lerner i Lerner, 2003.). Imunoglobulin G klase najzastupljenija je klasa imunoglobulina u serumu, čini oko 80% ukupnih imunoglobulina seruma. Vrijeme poluživota je 23 dana, najduže od svih klasa imunoglobulina. Postoje četiri subklase IgG-a: IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4. Imunoglobulin G1, IgG3 i IgG4 jedini su imunoglobulini sa sposobnosti prelaska placentarne barijere. Oni imaju važnu ulogu u zaštiti fetusa od infekcije tijekom njegova razvoja. Imunoglobulin G3, IgG1 i IgG2, tim redom po efikasnosti, učinkoviti su u aktivaciji komplementa. Imunoglobulin G1 i IgG3 vežu se visokim afinitetom za receptore željeza na fagocitirajućim stanicama (Parija, 2009.).



### 1.6.1.6. Trigliceridi

Trigliceridi u krvi jedan su od izvora masnih kiselina za sintezu mliječne masti u sekretornim stanicama mliječne žlijezde (Vernon, 2005.). Oni se sintetiziraju u stanicama sluznice crijeva iz masnih kiselina i monoglicerida nastalih probavom masti, te se resorbiraju u limfu kao sastavni dio hilomikrona. U jetri se trigliceridi sintetiziraju iz slobodnih masnih kiselina, suviška glukoze, acetata i propionata te se oslobađaju u krvotok u sastavu lipoproteina vrlo male gustoće (Bruss, 1997.). Trigliceridi se transportiraju u krvi najvećim dijelom u sastavu hilomikrona i lipoproteina vrlo male gustoće. Sposobnost jetre preživača za otpuštanje lipoproteina vrlo male gustoće u krvotok je ograničena, pa se u suvišku slobodnih masnih kiselina sintetizira velika količina triglicerida u jetri, koja se ne može u potpunosti otpustiti u krvotok. Posljedica toga zastoja je nakupljanje triglicerida u stanicama jetre (Grummer, 1993., Vernon, 2005.). Porast triglicerida u plazmi rezultat je njihove povećane resorpcije u crijevima i povećane sinteze u jetri, dok je pad triglicerida u plazmi odraz smanjenje resorpcije, smanjene sinteze u jetri i povećanog opsega razgradnje triglicerida.

### 1.6.1.7. Kolesterol

Kolesterol ima brojne uloge u organizmu. On se nalazi u sastavu većine staničnih membrana gdje je važan čimbenik stabilnosti. Kolesterol omogućuje prijenos tvari u stanicu i iz nje. Osnovni je dio serumskih lipoproteina gdje ima važnu ulogu u transportu triglicerida. Perkursor je steroidnih hormona nadbubrežne žlijezde (kortizola i aldosterona), spolnih hormona (estrogena i androgena) i žučnih kiselina koje se sintetiziraju u jetri i prijeko su potrebne za apsorpciju masti u tankom crijevu (Brown i Goldstein, 1986.; Grundy, 1990.). Kolesterol sintetiziran u jetri može se izlučiti putem žuči, poslužiti za sintezu žučnih kiselina ili esterificirati s višim masnim kiselinama i izlučiti u krv kao dio lipoproteina vrlo male gustoće. Osim u sastavu lipoproteina vrlo male gustoće, kolesterol se u krvi prenosi u sastavu lipoproteina velike gustoće, čija je uloga prijenos kolesterola iz perifernih tkiva u jetru (Tall i Lange, 1978.). Endogeni kolesterol prelazi u krv limfom, zatim u žučne kiseline i steroidne hormone, a dio se ugrađuje u stanične membrane i živčano tkivo, dok se egzogeni kolesterol u sluznici crijeva emulgira žučnim kiselinama, resorbira se i uključuje u metaboličke procese. Neiskorištene frakcije kolesterola izlučuju se žučnim kiselinama, fecesom, mokraćom i kroz kožu.

### 1.6.1.8. LDL i HDL kolesterol

Kolesterol i ostali lipidi topivi su samo u mastima. Kolesterol zajedno s posebnim bjelančevinama tvori čestice (lipoproteine) koje služe za prijenos kolesterola i drugih masnoća putem krvi iz probavnog sustava i jetre do svih stanica u organizmu. Najvažnije su dvije frakcije lipoproteina: LDL-čestice (lipoproteini male gustoće) i HDL-čestice (lipoproteini velike gustoće).

Lipoproteini male gustoće (LDL) sadrže oko 70% cjelokupnog kolesterola prisutnog u krvi i smatraju se glavnim prenosiocem kolesterola do različitih tkiva. Imaju dugi život, oko 2,5 dana. Najveći dio LDL plazme preuzima jetra, a ostatak se prenosi do perifernih tkiva, uključujući nuzbubrežne žlijezde i gonade gdje se kolesterol koristi kao perkursor u sintezi steroidnih hormona. U normalnom metabolizmu, oko 70 do 80% LDL čestica uklanja se iz cirkulacije posredovanjem LDL receptora. Preostali dio (oko 20%) odstranjuje se iz cirkulacije alternativnim putem pomoću receptora čistača. Za takav put ne postoje autoregulacijski mehanizmi pa stanice koje ga koriste nisu zaštićene od nagomilavanja kolesterola. U takve stanice ubrajaju se stanice glatkih mišića, monociti i makrofagi (Đerić, 2003.; Berneis i Rizzo, 2004.).

Lipoproteini velike gustoće (HDL) sintetiziraju se u hepatocitima i tankom crijevu, a nastaju i u samoj cirkulaciji razgradnjom lipoproteinskih čestica bogatih triacilglicerolima. U odnose na druge lipoproteinske čestice sadrže najviše proteina, 50% apoproteina, 20% slobodnog i esterificiranog kolesterola, 15% fosfolipida i 5% triglicerida (Lewis i Rader, 2005.). Osnovna uloga HDL čestica je u otklanjanju viška kolesterola iz perifernih stanica i njegov reverzni transport u jetru, vjerojatno posredovanjem specifičnih HDL receptora, gdje se dalje metaboliziraju ili ponovno ugrađuju u druge lipoproteinske čestice (Movva i Rader, 2008.).

### 1.6.1.9. Željezo

Željezo je najzastupljeniji mineral u tragovima u organizmu sisavaca i esencijalni je element u većini bioloških sustava (Greentree i Hall 1995.; Goyer, 1996.). Oko 70% željeza u sisavaca pronađeno je u hemoglobinu, te oko 5% do 10% se nalazi u mioglobinu. Kada je vezano na normalan hemoglobin i mioglobin, željezo je u fero obliku (Oswailer i sur., 1985.; Greentree i Hall 1995.; Goyer, 1996.). Do 25% željeza u organizmu je u feri obliku i pohranjeno je u hemosiderinu, feritinu i transferinu u jetri, slezeni i koštanoj srži (Greentree i

Hall 1995.; Hillmas, 1995.; Goyer, 1996.). Resorpcija željeza događa se u dva koraka. U prvom, ioni željeza se resorbiraju iz intestinalnog lumena u mukozne stanice. Fero željezo bolje se resorbira nego feri željezo zato što se feri željezo taloži izvan otopine na oko pH 7 ili ispod normalnih fizioloških uvjeta (Ponka i sur., 1990.). Međutim, oba oblika se mogu resorbirati ako su ionizirana (Greentree i Hall 1995.; Hillmas, 1995.; Goyer, 1996.). U drugom koraku, željezo se prenosi na feritin ili u cirkulaciju vezano na proteine transferina. Transferin je alfa-1-globulin proizveden u jetri (Ponka i sur., 1990.; Greentree i Hall 1995.; Goyer, 1996.). Zajedno s transferinom, željezo se distribuira u druge dijelove za pohranu željeza u organizmu. Vrlo mali dio željeza gubi se putem urina i fecesa, gubitak željeza nije naročito povećan ni nakon predoziranja željezom (Osweiler i sur., 1985.; Greentree i Hall, 1995.). Većina gubitka je kroz odljuštenje gastrointestinalnih mukoznih stanica u svih sisavaca (Osweiler i sur., 1985.; Greentree i Hall, 1995.). Oko 2% do 15% unesenog željeza se resorbira, a samo se 0,01% željeza eliminira iz organizma svaki dan (Hillman, 1995.; Goyer, 1996.).

### **1.7. Enzimi antioksidativnog statusa**

Oksidativni stres je stanje oštećenja uzrokovanog reaktivnim skupinama kisika (Jenkins, 2000.). Reaktivne skupine kisika (ROS) imaju visok potencijal raktivnosti, pa su otrovni i mogu dovesti do oštećenja staničnih makromolekula kao što su bjelančevine, lipidi i DNA (Araujo i sur., 2006.). Stanice sadrže različite tvari koje su sposobne ukloniti slobodne radikale, štiteći ih od štetnih učinka. Među enzimskim antioksidansima su glutation reduktaza (GR), glutation peroksidaza (GPx), katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD), dok su neenzimatski antioksidansi glutation (GSH), vitamin E, vitamin C,  $\beta$  karoten i flavonoidi (Messarach i sur., 2007.). Kada ROS prelazi antioksidativni kapacitet stanice, razvija se oksidativni stres (Sies, 1991.). Aerobni organizmi imaju antioksidativni obrambeni sustav koji se bavi ROS koje nastaju kao posljedica aerobnog disanja i oksidacije supstrata. Male količine ROS-a, uključujući hidroksilne radikale ( $\cdot\text{OH}$ ), superoksidne anione ( $\text{O}_2^-$ ) i vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), stalno se stvaraju u aerobnim organizmima kao odgovor na vanjske i unutarnje podražaje (Hurst i sur., 1997.; Jornot i sur., 1998.; Mills i sur., 1998.). Mala koncentracija ROS-a neizostavna je u mnogim biokemijskim procesima uključujući i unutarstanično slanje poruke u diferencijaciji stanica, staničnom napredovanju i apoptozi (Gosh i Myers, 1998.), imunosti (Yin i sur., 1995.) i obrani od mikroorganizama (Bae i sur., 1997.; Lee i sur., 1998.).

Nasuprot tome, velike doze i/ili neadekvatno uklanjanje ROS-a rezultira oksidativnim stresom, koji može izazvati ozbiljne metaboličke neispravnosti i oštećenja bioloških makromolekula (Czene i sur., 1997.; Wojtaszek 1997.; Chopra i Wallace, 1998.). Stanice mogu podnijeti umjereno oksidacijsko opterećenje povećanjem ekspresije gena u svrhu regulacije njihova reduktivnog obrambenog sustava i vratiti oksidacijsku/antioksidacijsku ravnotežu. No, kada ta povećana sinteza ne može biti postignuta zbog oštećenja enzima ili supstrata ili kada je oksidativno opterećenje veliko, neravnoteža i dalje postoji, a rezultat je oksidativni stres (Halliwell, 2005.). Antioksidativni enzimi mogu slobodne radikale pretvoriti u manje štetne molekule (Sies, 1993.). Superoksid dismutaza katalizira radikal superoksidnog aniona u peroksid i molekularni kisik. Katalaza, protein hema koji sadrži željezo, pretvara vodikov peroksid u vodu i kisik (Kurasaki i sur., 1986.). Glutation peroksidaza je enzim koji sadrži ion selena kao kofaktor (Rotruck i sur., 1973.), a za katalizirane reakcije zahtjeva reducirani glutacion, koji je osiguran putem glutacion reduktaze. Glutation peroksidaza jedan je od najučinkovitijih antioksidanasa u eritrocitima. Smanjenje GPx aktivnosti rezultira povećanjem aktivnosti vodikova peroksida i teškim oštećenjem stanice (Cheeseman i Slater, 1993.). Neenzimatski antioksidansi, kao što su glutacion, tokoferoli, retinoidi i askorbat imaju značajnu ulogu u vezanju ROS-a. Vitamin E i hidrofilni flavonoidi imaju svojstvo vezanja slobodnih radikala. Interakcija ovih prirodnih antioksidanasa s ROS-om koji su dio upala, potaknuli su niz studija o njihovim učincima na upalne procese (O' Leary i sur., 2004.; Singh i sur., 2005.). Vitamin E i njegovi analozi ne samo da mogu štititi stanice od slobodnih radikala već izazivaju smrt apoptoznih stanica u malignim stanicama i inhibiraju tumorogenezu *in vivo* (Birringer i sur., 2003.; Stapelberg i sur., 2004.). Ioni teških metala kao što su željezo, bakar, kadmij, živa, nikal, olovo i arsen mogu izazvati nastajanje reaktivnih radikala i uzrokovati stanična oštećenja preko osiromašenja enzimске aktivnosti kroz lipidnu peroksidaciju i reakcijom sa nuklearnim proteinima i DNA (Stohs i Bagchi, 1995.).

### 1.7.1. Glutation peroksidaza (GPx)

Glutation peroksidaze (GPx) su skupine enzima koje se mogu podijeliti na dvije skupine: enzimi ovisni o selenu i neovisni. Enzimi ovisni o selenu mogu razgraditi vodikov peroksid i razne hidro i lipidne peroksidaze (Kinnula i sur., 1995.). One kataliziraju redukciju različitih hidroperoksida (ROOH i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pomoću glutaciona, štiteći stanice sisavaca od oksidativnog oštećenja. Postoji barem pet izoenzima GPx pronađenih u sisavaca. Iako su

sveprisutni, razina svake izoforme razlikuje se ovisno o vrsti tkiva. Citosolna (cGPx) i mitohondrijska (GPx1) glutation peroksidaza reduciraju hidroperokside masnih kiselina i  $H_2O_2$  na račun glutationa. Mitohondrijska i fosfolipid hidroksiperoksid glutation peroksidaza (GPx4) nalazi se u većini tkiva. Fosfolipid hidroksiperoksid glutation peroksidaza lokalizirana je i u citosolu i u membranskim frakcijama. Ona može direktno reducirati fosfolipid hidroperokside, hidroperokside masnih kiselina i hidroperokside kolesterola koji su proizvedeni u peroksidiranim membranama i oksidirati lipoproteine (Imai i sur., 1998.). Mitohondrijska prisutna je pretežno u eritrocitima, bubrezima i jetri, a GPx4 vrlo je izražena u bubrežnim eptelnim stanicama i testisima. Citosolna GPx2 i izvanstanična GPx3 slabo je otkrivena u većini tkiva, osim u probavnom sustavu i bubrezima. GPx5 koja je otkrivena u nuzsjemeniku miša je glutation peroksidaza neovisna o selenu (De Hann i sur., 1998.).

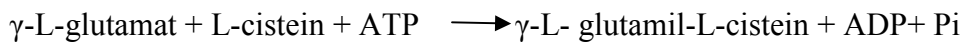
### 1.7.2. Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaza (SOD) dobro je poznat antioksidativni enzim koji pretvara superoksid u vodikov peroksid. Jedna od otkrivenih SOD je mitohondrijska (MnSOD), a druga citosolna (Cu/Zn SOD) superoksid dismutaza. Aktivnost MnSOD je smanjena u različitim tumorskim stanicama, te je predložena kao nova vrsta tumor supresorskog gena (Kiningham i Clair, 1997.; Mates i Sanchez-Jimenez, 2000.). Citosolna superoksid dismutaza pronađena je u citosolu većine eukariotskih stanica. Različiti oblici Cu/Zn SOD pronađeni su u izvanstaničnim tekućinama gdje je nazvana EcSOD (Marklund i sur., 1982.). Superoksid dismutaza je detektirana u mnogim tkivima i organizmima gdje štiti stanice od oštećenja superoksidnim anionima (Fridovich, 1972.).

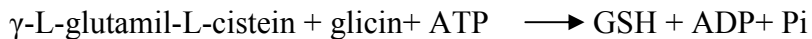
### 1.7.3. Glutation (GSH)

Glutation (GSH) je tripeptid koji sadrži cistein. Sintetizira se iz glutamata, cisteina i glicina, najzastupljeniji je endogeni neprotein tiol u stanicama (Parcell, 2002.; Fang i sur., 2002.). Glutation, glavna komponenta staničnog antioksidativnog sustava, ima važnu ulogu u detoksikaciji ksenobiotskih komponenti i antioksidaciji ROS-a i slobodnih radikala (Kormarnisky i sur., 2003.). Glutation je supstrat za GSH-transferazu i peroksidazu, enzim koji katalizira reakciju detoksikacije ksenobiotika i ROS-a (Parcell, 2002.; Fang i sur., 2002.). Glutation je kofaktor nekoliko detoksikacijskih enzima, kao što su transferaze. On ima ulogu

u pretvorbi vitamina C i E natrag u njihove aktivne oblike. Štiti stanice protiv apoptoze interakcijom s proapoptotskim i antiapoptotskim signalizacijskim putevima (Masella i sur., 2005.). U normalnim staničnim redoks uvjetima, glavni dio ovog regulatora u reduciranom je obliku u jezgri i endoplazmatskom retikulumu. Osim toga, GSH može biti kovalentno vezan na bjelačevine i djelovati kao koenzim brojnih enzima uključenih u staničnu obranu (Pompella i sur., 2003.). Glutation se sintetizira u dva koraka. Kataliziran je L-glutamatom, L-cistein  $\gamma$ -ligazom i glutacion sintazom. Glutation se može koristiti u oksidaciji, konjugaciji i hidrolizi (Halliwell i Gutteridge, 1989.). Unutarstanične i izvanstanične razine GSH određuju ravnotežu između proizvodnje, potrošnje i prijenosa. Zbog važnih fizioloških funkcija ti procesi su strogo regulirani. Aktivnost enzima uključenih u metabolizam GSH kontroliraju se na transkripcijskoj, translacijskoj i posttranslacijskoj razini (Halliwell i Gutteridge, 1989.; Pócsi i sur., 2004.). Glutation ima nekoliko dodatnih funkcija u stanicama: rezervni je oblik cisteina, pohranjuje i prenosi dušikov oksid, sudjeluje u metabolizmu estrogena, leukotriena i prostaglandina, reducira ribonukleotide u deoksiribonukleotide, uključen je u rad određenih transkripcijskih faktora (osobito onih koji sudjeluju u redoks signalizaciji) i uključen je u detoksikaciju mnogih endogenih spojeva i ksenobiotika (Halliwell i Gutteridge, 1989.). Unutarstanične koncentracije GSH obično su u rasponu od 0,5 do 10 mM, a izvanstanične vrijednosti kod životinja su jedan do tri puta manje (Maher, 2005.). Glutation je formiran od glutamata, cisteina i glicina, a posjeduje neobičnu peptidnu vezu. N-terminalni glutamat i cisteinski ostaci povezani su  $\gamma$ -karboksilnom grupom glutamata, umjesto uobičajenom  $\alpha$ -karboksilnom peptidnom vezom u bjelačevinama. Ova specifična peptidna veza sprječava hidrolizu GSH od većine peptidaza koje se odcijepuju na  $\alpha$ -karboksilnim peptidnim vezama u N-terminalnim aminokiselinama. Ta konfiguracija također ograničava cijepanje GSH putem glutamil transferaze (GGT) koja je smještena na vanjskoj površini određenih tipova stanica. Kao rezultat, GSH je stabilan u stanicama i cijepa GGT samo na vanjskim stranama određenih tipova stanica. Prisutnost ostatka C-terminalnog glicina štiti GSH molekulu od cijepanja unutarstanične  $\gamma$ -glutamil ciklotransferaze. Glavni oksidirani oblik GSH, glutation disulfid (GSSG), sastoji se od dva GSH ostatka koji su oksidirani na takav način da su povezani pomoću unutarmolekularne disulfidne veze. Stabilno stanje razine staničnog GSH pružaju ravnoteža između proizvodnje i potrošnje, kao i način reduciranja, oksidiranja ili vezanja od strane stanice. Glutation se proizvodi u dva koraka. U prvom koraku, enzim  $\gamma$  GLCL tvori peptidnu vezu između karboksilnog  $\gamma$ -glutamata i amino skupine cisteina korištenjem energije dobivene hidrolizom ATP-a:



U sljedećem koraku, dipeptid se pomiješa sa glicinom putem glutation sintetaze (GLS), ponovnim pokretanjem hidrolize ATP-a:



U nekim slučajevima opskrba ATP-om za sintezu GSH može biti ograničavajući faktor za metabolizam GSH (Makarov i sur., 2006.). Glutation se može izravno oksidirati hidroksilnim radikalima (Gardner i Aust, 2009.) ili peroksinitritima (Chang i sur., 2008.; Calabrese i sur., 2009.). Koristi se kao kosupstrat GPX-a, reducirajući  $\text{H}_2\text{O}_2$  ili organske perokside proizvodnjom GSSG, vode ili alkohola.

#### 1.7.4. Vitamin E

Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) topljiv je u lipidima i poznati je neenzimatski antioksidans (Uzun i sur., 2009.; Patra i sur., 2001.; Al-Attar, 2011.). Vitamin E sprječava peroksidaciju lipidne membrane hvatanjem lipid peroksil radikala (El-Demerdash i sur., 2004.; Uzunhisarcikli i Kalender, 2011.). Vitamin E važan je za rast, poboljšanje imunološkog sustava, integritet tkiva, reprodukciju, prevenciju bolesti i antioksidativnu funkciju u biološkim sustavima (Rooke i sur., 2004.; Dalle Zotte i Szendrő, 2011.). Lokaliziran je u hidrofobnom mjestu stanične membrane i glavna je obrana protiv izazvane ozljede membrane. Vitamin E donira elektron peroksilnom radikal, koji je proizveden tijekom lipidne peroksidacije.  $\alpha$ -tokoferol najjaktivnije oblik vitamina E i glavni membranski antioksidans u stanici. Vitamin E izaziva apoptozu stanica raka i inhibira formacije slobodnih radikala (White i sur., 1997.). Vitamin E privukao je veliku pozornost zbog hepatoprotektivnog učinka u životinja, što je prvenstveno zbog njegove sposobnosti da smanji inducirani oksidativni stres u različitim tkivima smanjenjem razine malondialdehida (MDA), vraćanjem razine GSH, SOD i CAT i oporavkom oštećenih jetrenih stanica (Bharrhan i sur., 2010.). U prirodi vitamin E pojavljuje se u 8 lipofilnih molekula, koje uključuju  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - tokoferol ( $\alpha\text{T}$ ,  $\beta\text{T}$ ,  $\delta\text{T}$  i  $\delta\text{T}$ ) i  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokotrienol ( $\alpha\text{TE}$ ,  $\beta\text{TE}$ ,  $\gamma\text{TE}$  i  $\delta\text{TE}$ ). U crijevima, tokoferoli i tokotrienoli apsorbiraju se kao i masti i izlučuju u hilomikrone zajedno sa triacilglicerolom, fosfolipidima i kolesterolom. Vitamin E vezan za hilomikron prenosi se putem limfnog sustava do perifernog tkiva, uključujući mišiće, koštanu srž, masno tkivo i kožu (Traber i sur., 1992.; Jiang i sur., 2001.; Traber, 2007.). U jetri se  $\alpha\text{T}$  prvenstveno veže na  $\alpha$ -tokoferol transfer

protein ( $\alpha$ -TTP).  $\alpha$ -TTP, zajedno sa ATP-vezanim transporterom A1 (ABCA1; Manor i Morley, 2007.), uključuje  $\alpha$ T u lipoproteine koji prenose vitamin E u druga tkiva putem cirkulacije (Brigelius-Flohe i Traber, 1999.; Jiang i sur., 2001.; Traber, 2007.). Mnoge studije su izvijestile antioksidativni zaštitni učinak vitamina E protiv nekoliko metala koji izazivaju hepatotoksičnost, uključujući bakar, olovo, kadmij, natrijev fluorid, živu i željezov sulfat (Chinoy i sur., 2004.; Gaurav i sur., 2010.; Osfor i sur., 2010.; Al-Attar, 2011.). Učinak vitamina E protiv Cr-inducirane hepatotoksičnosti zabilježeno je u studiji gdje su autori istraživali izravan zaštitni učinak vitamina E na Cr (VI)-izazvanu citotoksičnost i lipidnu peroksidaciju u primarnim kulturama hepaocita štakora. Rezultati su pokazali da predtretman vitaminom E 20 sati prije izlaganja Cr rezultira značajnim smanjenjem Cr (VI) inducirane citotoksičnosti. Predtretman vitaminom E normalizira razine neenzimskih antioksidansa, kao što su glutation i vitamin C, te uzrokuje nakupljanje vitamina E u hepatocitima. (Susa i sur., 1996.).

## 1.8. Cilj istraživanja

Ciljevi istraživanja su:

- utvrditi koncentraciju teških metala (Cd, Pb, As i Hg) i esencijalnih elemenata (Fe i Se) u tlu, komponentama biljne zajednice šume (listinac i prizemna flora) u uvjetima staništa.
- utvrditi koncentraciju teških metala (Cd, Pb, As i Hg) i esencijalnih elemenata (Fe i Se) u dopunskoj krmnoj smjesi s preporučenim sastavom mikroelemenata i u smjesi s povišenom koncentracijom esencijalnog elementa selena.
- utvrditi koncentraciju teških metala (Cd, Pb, As i Hg) i esencijalnih elemenata (Fe i Se) u tkivima jelena lopatara (mišić, bubreg, jetra, masno tkivo i slezena) prije dodavanja selena u hranu i nakon toga, kako bi utvrdili međudjelovanje selena s teškim metalima u tkivima.
- utvrditi utjecaj dodatka selena na hematološku sliku, biokemijske pokazatelje, imunosni i antioksidativni status jelena lopatara.



## 2. MATERIJAL I METODE RADA

### 2.1. MATERIJAL

#### 2.1.1. Područje određivanja rasprostranjenosti teških metala u jelena lopatara

Državno otvoreno lovište "Krndija II" XIV/23 smješteno je na sjevernim i sjeverozapadnim obroncima Papuka i Krndije. Namijenjeno je prirodnom uzgoju normalno razvijene i zdrave divljači, za zaštitu divljači i životinjskih vrsta koje u njemu obitavaju ili kroz njega prolaze i za korištenje divljači u cilju postizanja gospodarskog učinka. Također je namijenjeno uzgoju trofejne divljači u svrhu prodaje.



Slika 2. Karta lovišta (Lovnogospodarska osnova, 2006.)

Površina lovišta iznosi 6 850 hektara. Lovište je brdskog tipa, nadmorske visine od 170 do 700 metara. Prema geološkoj karti, kao dio Panonske nizine, lovište pripada formaciji kvartara, a geološku podlogu čine naslage aluvija u najnižim dijelovima lovišta, zatim naslage močvarnog prapora koji se nadovezuje na aluvijalne nanose i zauzima nešto povišenije predjele. Još se nalaze i laporovito – glinovite naslage, kontinentalni prapor, metamorfno sedimentne stijene, dolomiti, gnajsi i amfiboliti. Različiti tipovi terestričnih tala nastali su

međusobnim djelovanjem podloge, biljnog pokrivača i klimatskih čimbenika. Tla su zbijena i plitka, slabo kisela i neutralna.

Vegetacija u lovištu, osim izvora hrane, pruža i zaklon, utječe na mikroklimu i reguliranje količine svjetla. U šumskoj vegetaciji lovišta prevladavaju šume sa 5 877 ha, što čini oko 85% od ukupne površine lovišta. U lovištu se nalaze sljedeće šumske biljne zajednice:

- **Brdska bukova šuma s mrtvom koprivom** (*Lamio orvale – Fagetum sylvaticae* Ht. 1938.) – u sloju drveća dominira bukva. U nižim područjima su hrast kitnjak i obični grab. Sloj grmlja je bogat, osim drveća nalaze se i likovci, crvena bazga, božikovina, širokolisna kurika i druge vrste.
- **Šuma hrasta kitnjaka i običnog graba** (*Epimedio – Carpinetum betuli* Ht. 1938 / Bohr 1963.) – u sloju drveća pojavljuje se obični grab, trešnja, klen, gorski javor i bukva. U sloju grmlja prevladavaju glogovi, kurika, ruže i druge vrste.
- **Bukova šuma s bekicom** (*Luzulo luzuloidis – Fagetum sylvaticae* Mausel 1937.) – zajednica siromašna vrstama, u sloju drveća dominira bukva, sloj grmlja je nerazvijen, a u prizemnim slojevima prevladavaju vrste koje su indikatori kiselosti.
- **Šuma hrasta kitnjaka s bekicom** (*Luzulo – Quercetum petraeae* / Hill. 1932. / Pass. 1963.) – siromašnija je vrstama, u sloju drveća dominira hrast kitnjak, u sloju grmlja različite acidofilne vrste.

Od ne-šumskih zajednica nalaze se pašnjaci, livade i oranice koje zauzimaju oko 10% ukupne površine lovišta. Pašnjaci i livade su obrasli travno – djetelinskom vegetacijom i zauzimaju površinu oko 240 ha. Oranice zauzimaju površinu oko 410 hektara i na oranicama se siju pšenica, kukuruz i ostale sorte.

### 2.1.2. Topografija kretanja i prihrane lovne divljači na području otvorenog lovišta "KRNDIJA II"

Radi lakše sistematizacije podataka, područje lovišta podijeljeno je na četiri zasebna područja, a svako područje na lokacije prema kartografskim nazivima. Područja praćenja su:

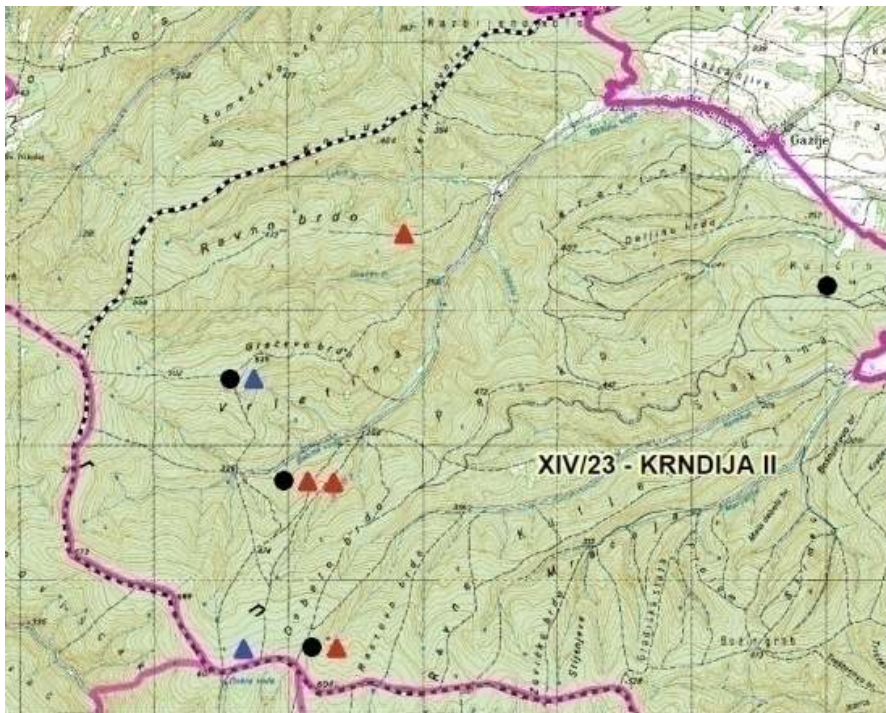
- Gazije s lokacijama Sječe, Sankovac, Žicara, Kojičin gaj, Dobra voda i Ravno brdo.
- Orahovica s lokacijama Manastir, Topolik i Petrov vrh.
- Gornja Motičina s lokacijama Kerekuš, Kutjev put, Strmac i Pjeskovi.

- Seona s lokacijama Štengerov vinograd, Požar, Milakovac, Krančevo brdo, Slatinski jarak, Gradina i Stari drum.

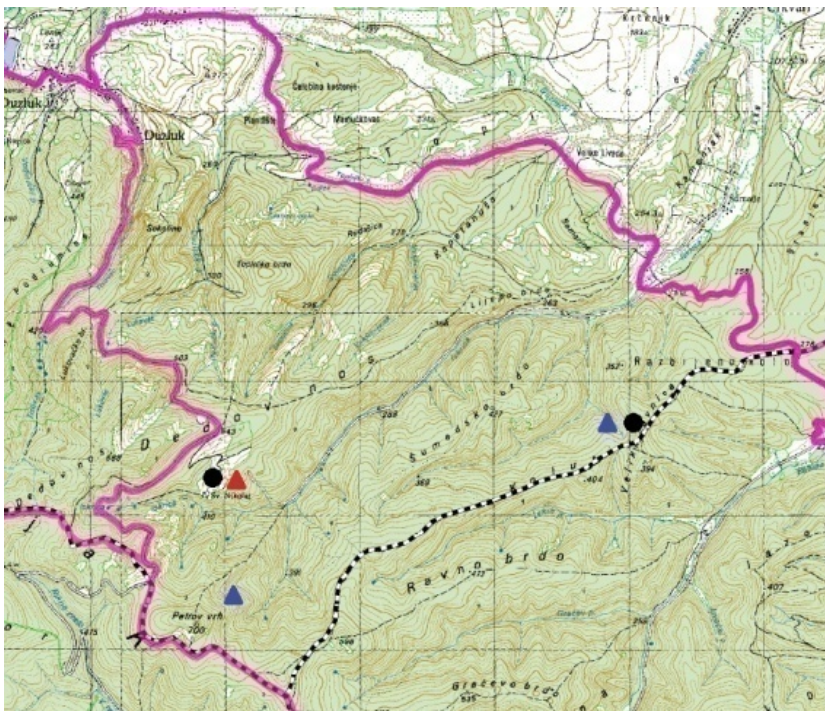
### **2.1.3. Kartografski prikaz mjesta odstrjela jelena lopatara tijekom dviju godina istraživanja**

Slike 3. do 6. prikazuju četiri područja lovišta s lokacijama na kojima su uzorkovani jeleni lopatari prve i druge godine, odnosno nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena. Crni kružići označavaju hranilišta za jelensku divljač gdje je divljač prihranjivana. Plavi trokutići označavaju jelene lopatare koji su odstrijeljeni tijekom prve godine istraživanja, a crveni trokutići označavaju jelene lopatare odstrijeljene nakon dopunske hranidbe s dodatkom selena.

Na području lovišta Gazije postavljena su četiri jelenska hranilišta gdje su prihranjivani jeleni lopatari tijekom dvije godine istraživanja. Na tom području odstrijeljeno je ukupno 6 grla, 2 tijekom prve godine i 4 tijekom druge godine istraživanja (Slika 3.). Na području lovišta Orahovica jeleni su prihranjivani u dva hranilišta. Na tom području odstrijeljeno je ukupno 3 grla, 2 tijekom prve godine i 1 tijekom druge godine istraživanja (Slika 4.). Na području lovišta Gornja Motičina postavljena su četiri jelenska hranilišta. Na tom području odstrijeljeno je ukupno 7 grla, 3 tijekom prve godine i 4 tijekom druge godine istraživanja (Slika 5.). Na području lovišta Seona postavljena su četiri jelenska hranilišta. Na tom području odstrijeljeno je ukupno 24 grla, 13 tijekom prve godine i 11 tijekom druge godine istraživanja (Slika 6.).



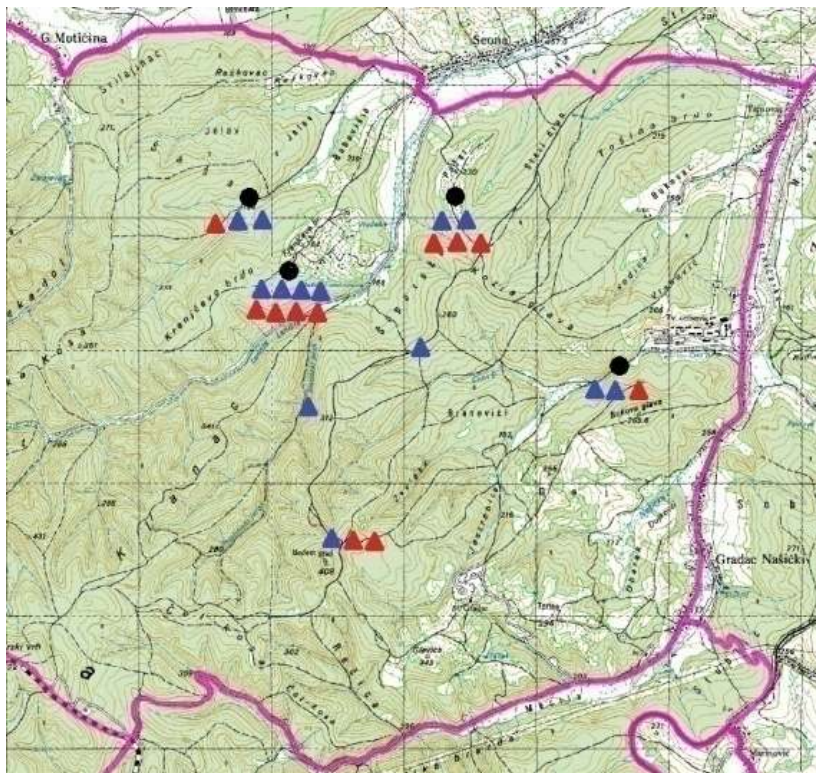
Slika 3. Kartografski prikaz lovnog područja Gazije (Lovnogospodarska osnova, 2006.)



Slika 4. Kartografski prikaz lovnog područja Orahovica (Lovnogospodarska osnova, 2006.)



Slika 5. Kartografski prikaz lovnog područja Gornja Motičina (Lovnogospodarska osnova, 2006.)



Slika 6. Kartografski prikaz lovnog područja Seona (Lovnogospodarska osnova, 2006.)

●	Hranilišta sa selenom
▲	Odstrijeljeni jeleni lopatari tijekom prve godine pokusa
▲	Odstrijeljeni jeleni lopatari tijekom druge godine pokusa

#### **2.1.4. Dopunska hranidba jelena lopatara**

Tijekom dvije godine istraživanja jeleni lopatari prihranjivani su gotovom krmnom smjesom za jelensku divljač. Prve godine istraživanja životinje su hranjene smjesom bez dodatka selena, a druge godine s dodatkom organskog selena (0,5 mg/kg). Dopunska hranidba s dodatkom selena provodila se 60 dana; od 01. 07. do 01. 09. 2014. godine krmnom smjesom prema određenoj recepturi na 14 hranilišta za jelensku divljač. Sastav krvne smjese prikazuje Tablica 2.

Tablica 2. Kemijski sastav gotove krmne smjese za jelensku divljač.

Naziv uzorka (%)	
Sirove bjelančevine	11,95
Sirove masti	4
Sirova vlaknina	10
Sirovi pepeo	8,5
Lizin	1
Metionin	0,3
Ca	2
P	1,5
Na	0,2
Mg	0,25
Elementi u tragovima (mg)	
Željezo (željezo sulfat monohidrat)	50
Jod (kalij jodid)	0,2
Kobalt (kobalt sulfat pentahidrat)	0,2
Bakar (bakar sulfat pentahidrat)	10
Mangan (mangan oksid)	40
Cink (cink sulfat monohidrat)	30
Organski selen	0,5
Vitamini (IJ)	
Vitamin A	15 000
Vitamin D3	1 500
Tehnološki dodaci (mg)	
Antioksidans BHT	100
Sastav: kukuruz, brašno lucerne, pšenično krmno brašno, suncokretova pogača, suncokretova sačma, melasa šećerne repe, monokalcij fosfat, kalcij karbonat, soja ekstrudirana, zeolit pigozen 801, premiks za jelene, natrij klorid, vezivo.	

### 2.1.5. Biljne zajednice na području otvorenog lovišta "KRNDIJA II"

Biljne zajednice osnovni su izvor hrane jelena lopatara. Stoga je biljni materijal, listinac i prizemna flora, uzorkovan tijekom dvije godine istraživanja sa četiriju različitih područja lovišta. Također, za analizu kemijskog sastava, teških metala i esencijalnih elemenata, uzeta je i krmna smjesa kojom su se jeleni lopatari prihranjivali. Za kemijsku analizu i analizu teških metala i esencijalnih elemenata uzeto je tlo s 14 lokacija, odnosno područja gdje se provodila dopunska hranidba jelena lopatara tijekom dvije godine istraživanja. Sastav listinca, odnosno prizemne flore, uzorkovanih tijekom dvije godine istraživanja prikazan je u Tablicama 3 i 4.

Tablica 3. Sastav listinca s četiriju područja uzorkovanih tijekom 1. i 2. godine istraživanja.

PODRUČJE	LIŠĆE (prva godina istraživanja)	LIŠĆE (druga godina istraživanja)
GAZIJE	Bukva obična - <i>Fagus sylvatica</i> L.	Bukva obična - <i>Fagus sylvatica</i> L.
	Kupina divlja - <i>Rubus fruticosus</i> L.	Kupina divlja - <i>Rubus fruticosus</i> L.
	Grab obični - <i>Carpinus betulus</i> L.	Gorski javor - <i>Acer pseudoplatanus</i> L.
ORAHOVICA	Bukva obična - <i>Fagus sylvatica</i> L.	Lijeska - <i>Corylus avellana</i> L.
	Kupina divlja - <i>Rubus fruticosus</i> L.	Velikolisna lipa - <i>Tilia grandifolia</i> L.
	Grab obični - <i>Carpinus betulus</i> L.	Obična breza - <i>Betula pendula</i> L.
	Srebrna lipa - <i>Tilia tomentosa</i> Mch.	Bukva obična - <i>Fagus sylvatica</i> L.
	Hrast medunac - <i>Quercus pubescens</i> Willd.	Hrast medunac - <i>Quercus pubescens</i> Willd.
	Gorski javor - <i>Acer pseudoplatanus</i> L.	Kupina divlja - <i>Rubus fruticosus</i> L.
GORNJA MOTIČINA	Kupina divlja - <i>Rubus fruticosus</i> L.	Lijeska - <i>Corylus avellana</i> L.
	Grab obični - <i>Carpinus betulus</i> L.	Velikolisna lipa - <i>Tilia grandifolia</i> L.
	Bukva obična - <i>Fagus sylvatica</i> L.	Obična breza - <i>Betula pendula</i> L.
	Gorski javor - <i>Acer pseudoplatanus</i> L.	Kupina divlja - <i>Rubus fruticosus</i> L.
	Sitnolisna lipa - <i>Tilia parvifolia</i> Ehrh.	Grab obični - <i>Carpinus betulus</i> L.
	Hrast medunac - <i>Quercus pubescens</i> Willd.	Bukva obična - <i>Fagus sylvatica</i> L.
SEONA	Bukva obična - <i>Fagus sylvatica</i> L.	Lijeska - <i>Corylus avellana</i> L.
	Gorski javor - <i>Acer pseudoplatanus</i> L.	Poljski jasen - <i>Fraxinus angustifolia</i> L.
	Lijeska - <i>Corylus avellana</i> L.	Bazga - <i>Sambucus nigra</i> L.
	Divlji šipak - <i>Rosa canina</i> L.	Divlja jabuka - <i>Malus sylvestris</i> L.
	Divlja trešnja - <i>Prunus avium</i> L.	Bagrem - <i>Robinia pseudoacacia</i> L.
	Divlja kruška - <i>Pirus piraster</i> (L.) Borkh.	Hrast medunac - <i>Quercus pubescens</i> Willd.
		Kupina divlja - <i>Rubus fruticosus</i> L.
		Klen - <i>Acer campestre</i> L.
		Lijeska - <i>Corylus avellana</i> L.
		Divlji šipak - <i>Rosa canina</i> L.
		Divlja kruška - <i>Pirus piraster</i> (L.) Borkh.
	Divlja trešnja - <i>Prunus avium</i> L.	



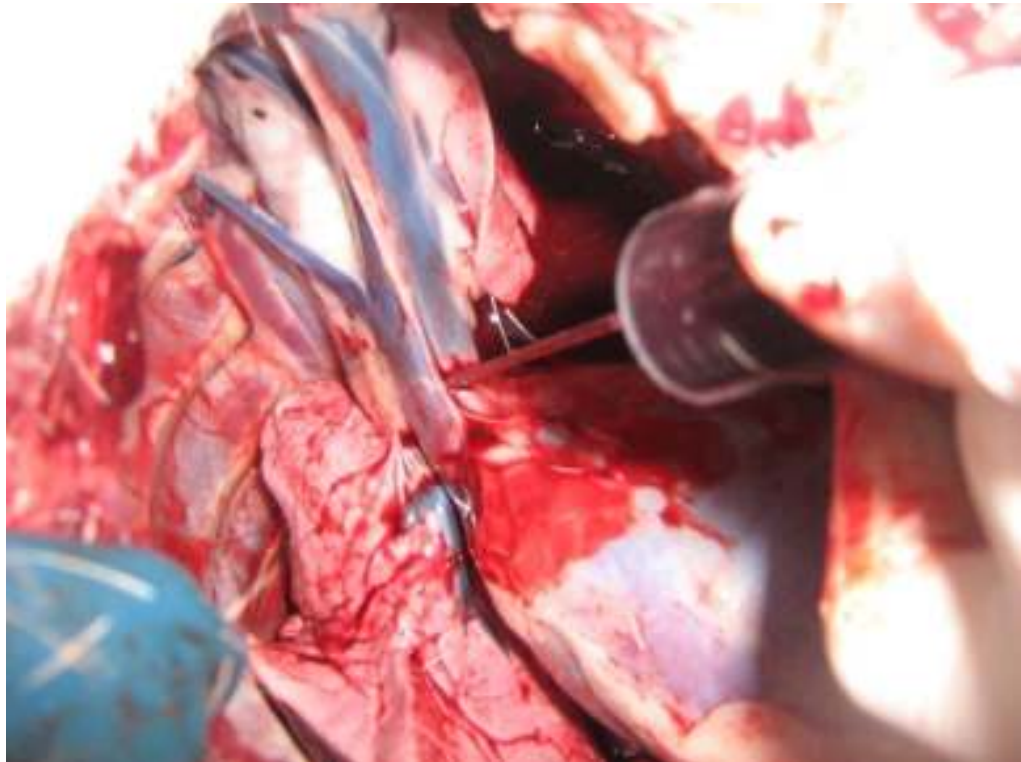
Tablica 4. Sastav prizemne flore s četiriju područja uzorkovanih tijekom 1. i 2. godine istraživanja.

PODRUČJE	BILJNE VRSTE (prva godina istraživanja)	BILJNE VRSTE (druga godina istraživanja)
GAZIJE	Cikorija - <i>Cichorium intybus L.</i>	Dvodomna kopriva - <i>Urtica dioica L.</i>
	Dvodomna kopriva - <i>Urtica dioica L.</i>	Prava rusomača - <i>Capsella bursa pastoris (L.) Med.</i>
	Prava rusomača - <i>Capsella bursa pastoris (L.) Med.</i>	Čičak - <i>Arctium lappa L.</i>
	Puzajuća ivica - <i>Ajuga reptans L.</i>	Mrkva divlja - <i>Daucus carota L.</i>
	Dugolisna metvica - <i>Mentha longifolia (L.) Huds.</i>	Obični sit - <i>Juncus effusus L.</i>
	Obični sit - <i>Juncus effusus L.</i>	Livadna vlasulja - <i>Festuca pratensis Huds.</i>
	Livadna vlasulja - <i>Festuca pratensis Huds.</i>	Abdovina - <i>Sambucus ebulus L.</i>
	Sedmolist - <i>Aegopodium podagraria L.</i>	Jednogodišnja krasolika - <i>Erigeron annuus (L.) Pers.</i>
	Jednogodišnja krasolika - <i>Erigeron annuus (L.) Pers.</i>	Šumska paprat - <i>Dryopteris filix mas (L.) Schott.</i>
Šumska paprat - <i>Dryopteris filix mas (L.) Schott.</i>	Livadna vlasulja - <i>Festuca pratensis Huds.</i>	
ORAHOVICA	Obični stolisnik - <i>Achillea millefolium L.</i>	Travnjačka busika - <i>Deschampsia caespitosa L.</i>
	Livadna vlasnjača - <i>Poa pratensis L.</i>	Dugolisna metvica - <i>Mentha longifolia (L.) Huds.</i>
	Obični sit - <i>Juncus effusus L.</i>	Mrazovac - <i>Colchium autumnale L.</i>
	Mrkva divlja - <i>Daucus carota L.</i>	Širokolisni trputac - <i>Plantago major L.</i>
	Livadna broćika - <i>Galium mollugo L.</i>	Dvodomna kopriva - <i>Urtica dioica L.</i>
GORNJA MOTIČINA	Dvodomna kopriva - <i>Urtica dioica L.</i>	Šumska paprat - <i>Dryopteris filix mas (L.) Schott.</i>
	Cikorija - <i>Cichorium intybus L.</i>	Travnjačka busika - <i>Deschampsia caespitosa L.</i>
	Crvena djetelina - <i>Trifolium pratense L.</i>	Obični sit - <i>Juncus effusus L.</i>
	Obični sit - <i>Juncus effusus L.</i>	Obični lanilist - <i>Linaria vulgaris Mill.</i>
	Obični lanilist - <i>Linaria vulgaris Mill.</i>	Crvena djetelina - <i>Trifolium pratense L.</i>
	Obični stolisnik - <i>Achillea millefolium L.</i>	Dugolisna metvica - <i>Mentha longifolia (L.) Huds.</i>
	Livadna mačica - <i>Phleum pratense L.</i>	Mrkva divlja - <i>Daucus carota L.</i>
	Šumska paprat - <i>Dryopteris filix mas (L.) Schott.</i>	Obični sit - <i>Juncus effusus L.</i>
	Travnjačka busika - <i>Deschampsia caespitosa L.</i>	Dvodomna kopriva - <i>Urtica dioica L.</i>
Puzava pirika - <i>Agropyron repens L.</i>	Livadna vlasulja - <i>Festuca pratensis Huds.</i>	
SEONA	Obični lanilist - <i>Linaria vulgaris Mill.</i>	Maslačak - <i>Tarxacum officinale L.</i>
	Obični sit - <i>Juncus effusus L.</i>	Abdovina - <i>Sambucus ebulus L.</i>
	Dvodomna kopriva - <i>Urtica dioica L.</i>	Šumska jagoda - <i>Fragaria vesca L.</i>
	Cikorija - <i>Cichorium intybus L.</i>	
	Jednogodišnja krasolika - <i>Erigeron annuus (L.) Pers.</i>	
	Šumska paprat - <i>Dryopteris filix mas (L.) Schott.</i>	
	Divlji ječam - <i>Hordeum spontaneum L.</i>	

### 2.1.6. Uzorkovanje životinjskog materijala

Uzorci tkiva (mišić, bubreg, jetra, masno tkivo i slezena) 40 jelena lopatara (20 jelena lopatara prije dopunske hranidbe uz dodatkom selena i 20 jelena lopatara nakon provedenog dodatka selena u hranu) uzimana su nakon odstrijela prilikom evisceracije. Životinje su bile u dobi od 1 do 9 godina, tjelesne mase od 20 do 110 kilograma. Prve godine istraživanja odstrijeljeno je 7 mladih i 13 odraslih grla, kao i tijekom druge godine istraživanja.

Krv za biokemijske analize uzimana je iz lijeve pretklijetke srca životinje u roku od 1 do 2 minute nakon odstrijela, za hematološku analizu s dodatkom EDTA, za plazmu s dodatkom Li-heparina i za biokemijske pretrage bez antikoagulansa. Krv je centrifugirana (15 minuta na 3 000 okretaja) kako bi smo odvojili plazmu i serum. Krv i tkiva smrznuta su na -80°C do analiza.



Slika 7. Vađenje krvi (autor N. Vukšić, 2014.)

## 2.2. METODE

### 2.2.1. Kemijska analiza krmiva za prihranu, listinca i prizemne flore

Od uzoraka listinca i prizemne flore odvagalo se 100 g na tehničkoj vagi, zdrobilo, podijelilo i sušilo na 60°C tijekom 12 h. Uzorci su izvađeni i hlađeni 1 h na sobnoj temperaturi, vagani i usitnjeni u mlinu za usitnjavanje (Microtron® MB 550) snage 220-240V / 50-60 Hz. Nakon toga uradila se kemijska analiza (suha tvar, sirove bjelančevine, sirove masti, sirova vlaknina, ukupni pepeo i NET) krmiva za prihranu i uzoraka listinca i prizemne flore s četiriju područja lovišta.

Udio sirovih bjelančevina određivan je metodom po Kjeldahl-u (HRN ISO 937:1999) uz uporabu bloka za razaranje (Unit, 8 Basic Foss) i neutralizatora para, te automatiziranog uređaja za destilaciju i titraciju (Kjeltec 8400, Foss). Sirove masti određivane su metodom po Soxhlet-u (HRN ISO 1443:1999) uz ekstrakciju masti eterom na uređaju za ekstrakciju (Soxterm 2000, Gerhardt). Gravimetrijski je određen udio vode (ISO 1442:1997) uz uporabu termostata (Epsa 2000, Ba-Ri) i sušenja pri 103°C. Peroksidni broj određen je prvotnom ekstrakcijom masti eterom, na uređaju za ekstrakciju (Soxtherm 2000, Gerhardt), te daljnjom titracijom sa Na-tiosulfatom. Sirova vlaknina određena je kuhanjem uzorka u otopini kiseline i lužine metodom po Hennerberg-u i Stochman-u (HRN EN ISO 6865:2011). Ukupni pepeo određen je razaranjem uzorka žarenjem na 550°C i vaganjem ostatka u lončiću za žarenje.

### 2.2.2. Kemijska analiza tla

Kompozitni uzorak za kemijsku analizu tla, kojeg čine 20 do 25 pojedinačnih uzoraka ravnomjerno raspoređenih po površini tla, uzorkovan je iz sloja od 0 do 30 cm. Svi pojedinačni uzorci s jedne analitičke površine su dobro izmješani, a četvrtanjem je masa pojedinačnog uzorka svedena na 0,5 do 1 kg.

Nakon dopremanja u laboratorij; uzorci tla su očišćeni od svježih organskih ostataka i ostalih primjesa i u tankom sloju osušeni na sobnoj temperaturi. Zrakosuhi uzorci tla usitnjeni su posebnim mlinom za meljavu bez ostataka teških metala (Retsch RM 200), prosijani kroz sito promjera 2 mm, te homogenizirani i pripremljeni za analizu; sukladnom standardnom propisanom postupku (ISO 11464: 1994).

### 2.2.3. Agrokemijski pokazatelji svojstava tla

U svim uzorcima tla, dopremljenim s 14 lokaliteta lovišta, utvrdili smo pH reakciju tla, sadržaj humusa, koncentraciju lakopristupačnog fosfora i kalija, hidrolitičku kiselost i sadržaj  $\text{CaCO}_3$ .

Reakcija tla izražena kao pH vrijednost pokazatelj je niza agrokemijskih svojstava tla, važnih za ishranu bilja, a izražava se u pH jedinicama. Trenutna ili aktualna kiselost ( $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})$ ) određena je u suspenziji tla s destiliranom vodom, a supstitucijska ili izmjenjiva kiselost ( $\text{pH}(\text{KCl})$ ) u suspenziji tla (1:5) s otopinom 1M KCl ( $c=1 \text{ mol/dm}^3$ ; ISO 10390: 1994).

Humus u tlu utječe na niz kemijskih i fizikalnih svojstava, u prvom redu vrlo povoljno utječe na strukturu tla. Utječe dobro i na biološka svojstva tla time što je izvor ugljika potrebnog za život i razmnožavanje mikroorganizama. Bikromatna metoda (ISO 14235, 1994) predstavlja mokro spaljivanje organske tvari tla kalij-bikromatom. Sadržaj humusa mjerio se spektrofotometrijski kod 585 nm uz prethodno dekantiranje otopine u kivetu za mjerenje. Rezultat ove metode je količina organske tvari (ili humusa u tlu), a izražava se u postocima (%).

Najčešći postupak ispitivanja biljkama pristupačnog fosfora i kalija u tlu u Republici Hrvatskoj je AL metoda (Egner i sur., 1960.). Ekstrakcija lakopristupačnog P i K obavila se pufernom otopinom amonij-laktata čiji je pH 3,75.

Pristupačnost fosfora određen je kolorimetrijski tzv. plavom metodom. Mjerenje koncentracije  $\text{P}_2\text{O}_5$  u uzorcima i standardima vršilo se na UV spektrofotometru Cary 50 na valnoj duljini 680 nm.

Pristupačnost kalija utvrdila se direktno iz ekstrakta tla emisijskom tehnikom na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru (AAS-u) i izražena je u mg  $\text{K}_2\text{O}$  na 100 grama tla.

Rezultati AL metode su koncentracije biljkama pristupačnog fosfora i kalija u analiziranom uzorku tla, a izražavaju se u mg  $\text{P}_2\text{O}_5/100 \text{ g tla}$  i mg  $\text{K}_2\text{O}/100 \text{ g tla}$ . Prema rezultatima AL metode, tla se dijele u različite klase opskrbljenosti fosforom i kalijem (klase A do E).

Najčešća primjena rezultata hidrolitičke kiselosti je za utvrđivanja potreba za kalcizacijom kiselog tla. Hidrolitička kiselost izražena je u  $\text{mmol}(+)100\text{g}^{-1}$  ili  $\text{cmol}(+)\text{kg}^{-1}$  i koristi se za izračunavanje nezasićenosti adsorpcijskog kompleksa lužnatim ionima.

Sadržaj karbonata u tlu određen je volumetrijskom metodom (ISO 10693: 1995). Princip ove metode je da se pri određenom tlaku i temperaturi zraka izmjeri volumen razvijenog CO<sub>2</sub> koji je podrijetlom iz karbonata analiziranog uzorka tla. Za volumetrijsko određivanje CaCO<sub>3</sub> koristi se Scheiblerov kalcimetar. Količina oslobođenog CO<sub>2</sub> množi se s koeficijentom 2,274 da dobijemo masu CaCO<sub>3</sub> u uzorku. Dobivena se vrijednost izražava u postotcima (%).

#### **2.2.4. Određivanje koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u tlu, listincu, prizemnoj flori, krmivima za prihranu i tkivima jelena lopatara**

Koncentracija teških metala (Cd, Pb, Hg i As) i esencijalnih elemenata (Fe i Se) u tlu, listincu, prizemnoj flori, krmivima za prihranu i tkivima jelena lopatara određena je, nakon pripreme matične otopine, induktivno spregnutom plazmom optičkom spektrofotometrijom (ICPOES-“Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry”). Koncentracije Cd, Pb, Hg, Fe (ISO 11466:1995), As i Se izmjerene su na uređaju PerkinElmer Optima 2100 DV.

Matične otopine uzoraka pripremljene su na sljedeći način: na analitičkoj vagi vagano je u kivete za razaranje (MARS Xpress plus ili MARS press) 0,5 grama tla, listinca, prizemne flore i krmiva za prihranu i do 1 grama uzorka animalnog tkiva (mišić, bubreg, jetra, masno tkivo i slezena). Uzorci tla su zatim standariziranom metodom (ISO 11466:1995) prelivevi sa zlatotopkom (3 ml konc. HNO<sub>3</sub> i 9 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), uzorci listinca, prizemne flore i krmiva za prihranu prelivevi su s 5 ml konc. HNO<sub>3</sub> i 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a uzorci animalnih tkiva prelivevi su s 9 ml konc. HNO<sub>3</sub> i 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, homogenizirani i podvrgnuti digestiji u mikrovalnom uređaju (MARS 6, CEM). Nakon digestije uzorci su kvantitativno preneseni u odmjerne tikvice od 50 ml i nadopunjeni deioniziranom vodom do oznake. U tako pripremljenim matičnim otopinama uzoraka određene su koncentracije teških metala (Cd, Pb, Hg i As) i esencijalnih elemenata (Fe i Se).

#### **2.2.5. Određivanje hematoloških pokazatelja**

##### **2.2.5.1. Kompletna krvna slika i diferencijalna krvna slika**

Vrijednosti kompletne krvne slike (broj leukocita, broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit, prosječni volumen eritrocita, prosječna masa hemoglobina po

eritrocitu, prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima i broj trombocita) određene su pomoću veterinarskog hematološkog analizatora 100 PochVef Sismex<sup>®</sup>, Japan. Razmazi krvi nakon fiksacije na zraku obojeni su May-Grünwald Giemza postupkom, a diferencijalna krvna slika učinjena je brojenjem udjela stanica pomoću mikroskopa Olympus Bx-51<sup>®</sup>, Japan.

## **2.2.6. Određivanje biokemijskih pokazatelja**

### **2.2.6.1. Određivanje koncentracije metabolita u serumu**

U krvnom serumu jelena lopatara određene su koncentracije metabolita i supstrata (glukoza, urea, ukupni proteini, albumini, globulini, trigliceridi, kolesterol, HDL i LDL kolesterol i koncentracije željeza). Analize su provedene na automatskom multikanalnom biokemijskom analizatoru Beckman Coulter AU 400 (Beckman Coulter, Germany).

### **2.2.6.2. Određivanje koncentracije imunoglobulina G u serumu ELISA metodom**

Koncentracija imunoglobulina G (IgG) u uzorcima seruma jelena lopatara određena je pomoću komercijalno dostupnog kita Bovine (Cattle) Imunoglobulin G (IgG) za ELISA metodu (Cloud-Clone Corp., Houston, USA). Mikrotitarska pločica prethodno je prevučena antitijelima specifičnim za IgG. Standardi i uzorci su zatim dodani u jažice mikrotitarske pločice s biotin konjugiranim protutijelom specifičnim za IgG. Avidin, konjugiran za peroksidazu iz hrena (HRP) dodan je u svaku jažicu i mikrotitarska pločica je inkubirana. Nakon što je dodana TMB otopina supstrata, samo one jažice koje su sadržavale IgG, biotin-konjugirano protutijelo i enzim-konjugiranog avidina pokazale su promjene boje. Enzim-supstrat reakcija prekinuta je dodatkom sumporne kiseline, a promjena boje mjerena je spektrofotometrijski u čitaču (iMark<sup>™</sup> Microplate Absorbance Reader, Biorad, Engleska) na 450 nm. Koncentracija IgG u uzorcima određena je uspoređivanjem optičke gustoće uzoraka sa standardnom krivuljom i izražavane u g/L.

## 2.2.7. Određivanje enzima antioksidativnog statusa

### 2.2.7.1. Određivanje koncentracije glutation peroksidaze i superoksid dismutaze u plazmi

Antioksidacijski status je praćen određivanjem aktivnosti dva antioksidacijska enzima, glutation peroksidaze (GPx) i superoksid dismutaze (SOD) u krvnoj plazmi.

Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) određena je gotovim kompletima RANSEL<sup>®</sup> (Randox, Velika Britanija) na automatskom analizatoru Beckman Coulter AU 400 (Beckman Coulter, Germany). Princip reakcije temelji se na oksidaciji glutationa s kumena peroksidom uz katalitičko djelovanje GPx. Nastali oksidirani oblik glutationa odmah se dalje prevodi u reducirani oblik uz prisustvo glutation reduktaze i NADPH kao akceptora kisika. Pri tome NADPH, primivši kisik, prelazi u oksidirani oblik, NADP. Smanjena apsorpcija NADPH koristi se kao mjera aktivnosti GPx, a izražena je u internacionalnim jedinicama U/L.

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) određena je gotovim kompletima RANSOD<sup>®</sup> (Randox, Velika Britanija) na automatskom analizatoru Beckman Coulter AU 400 (Beckman Coulter, Germany). Metoda se zasniva na stvaranju superoksidnih radikala iz ksantina pomoću ksantin oksidaze koji reagiraju s 2-(4-jodfenil) 3-(4-nitrofenil) 5-feniltetrazol kloridom i tvore formazan crveno obojenje. Aktivnost SOD mjeri se kao stupanj inhibicije ove reakcije i izražena je u internacionalnim jedinicama U/L.

### 2.2.7.2. Određivanje koncentracije glutationa u plazmi

Koncentracija glutationa (GSH) u uzorcima plazme određena je pomoću komercijalno dostupnog Glutathione Assay Kit-a (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) prema uputama proizvođača.

Cayman GSH Assay koristi pažljivo optimiziranu enzimsku metodu recikliranja, pomoću glutation reduktaze, za kvantificiranje GSH. Sulfhidrilna skupina GSH reagira sa 5,5'-ditio-*bis*-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB), Ellmanov reagens, te daje žuto obojenu 5-tio-2-nitrobenzojevu kiselinu (TNB). Mješoviti disulfid, GSTNB (između GSH i TNB) koji se istodobno proizvodi, reduciran je putem glutation reduktaze tako da reciklira GSH i proizvodi više TNB. Stopa proizvodnje TNB izravno je proporcionalna koncentraciji GSH u uzorku. Mjerenje TNB apsorpcije na 405-414 nm pruža točnu procjenu GSH u uzorku.

### 2.2.7.3. Određivanje koncentracije vitamina E u serumu ELISA metodom

Koncentracija vitamina E u uzorcima seruma jelena lopatara određena je pomoću komercijalno dostupnog Bovine Vitamin E (VE) ELISA kit-a (BlueGene Biotech, Shanghai, China). Vitamin E ELISA kit primjenjuje kompetitivnu imunoenzimsku tehniku koja koristi anti-vitamin E protutijela i vitamin E-HRP (horseradish peroxidase) konjugate. Uzorci i pufer inkubirani su zajedno s vitamin E-HRP konjugatima u prethodno obloženoj pločici tijekom jednog sata. Nakon inkubacije, jažice su dekantirane i isprane pet puta. Jažice su zatim inkubirane sa supstratom za HRP enzim. Produkt enzim-supstrat reakcije stvorio je plavo obojeni kompleks. Na kraju, dodana je STOP otopina kako bi se zaustavila reakcija, koja je promijenila boju otopine u žuto. Intenzitet boje mjeren je spektrofotometrijski u čitaču (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Biorad, Engleska) na 450 nm. Intenzitet boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji vitamina E budući da se vitamin E iz uzorka i vitamin E-HRP konjugata natječu za anti-vitamin E vezna mjesta protutijela, obzirom da je broj mjesta ograničen, što je više mjesta zauzeto vitaminom E iz uzorka, manje mjesta je slobodno za vezanje vitamin E-HRP konjugata. Standardna krivulja grafički je prikazana u odnosu na intenzitet boje i koncentraciju standarda. Koncentracija vitamina E u svakom uzorku izračunata je iz te standardne krivulje.

### 2.2.8. Statističke metode

Statistička obrada podataka obrađena je računalnim programom Statistica 12 (StatSoft, Inc. 2014.). Podatci su obrađeni deskriptivnom statistikom i prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška aritmetičke sredine. Standardnim t-testom utvrđene su značajnosti razlika između dobnih skupina i između skupina prije i nakon hranjenja uz dodatak selena. Značajnosti razlika označena je na razini od 95 i 99%.



### 3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

#### 3.1. Tlo, listinac, prizemna flora i krmna smjesa za jelensku divljač

S područja lovišta uzeti su uzorci tla, listinca i prizemne flore za kemijsku analizu. Kemijska analiza tla napravljena je u 14 uzoraka s područja na kojima su se prihranjivali jeleni lopatari tijekom dviju godina istraživanja, a uzorci listinca i prizemne flore s četiriju područja lovišta tijekom prve i druge godine istraživanja. Za kemijsku analizu uzeta su krmiva za prihranu kojima su se jeleni lopatari prihranjivali tijekom dvije godine istraživanja.

##### 3.1.1. Kemijska analiza tla i koncentracija teških metala i esencijalnih elemenata u tlu

Rezultati kemijske analize tla prikazani su u Tablici 5. Uzorkovano je 14 uzoraka tla do dubine 30 cm te su utvrđena osnovna agrokemijska svojstva. Utvrđeno je da 13 uzoraka pripada skupini jako kiselih i kiselih tala s rasponom vrijednosti  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  od 3,37 do 4,94, te srednje humoznim i humoznim tlima sa sadržajem humusa od 1,98 do 3,75%. Koncentracije fosfora u 13 uzoraka bile su izrazito niske od 1,90 do 11,34 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$   $100\text{g}^{-1}$  te tlo pripada A i B klasama tala jako siromašnih i siromašnih fosforom. Što se tiče kalija, veći broj uzoraka, također, pripada A klasi tala jako siromašnih kalijem s rasponom utvrđenih koncentracija od 6,80 do 13,14 mg  $\text{K}_2\text{O}$   $100\text{g}^{-1}$  tla. Nadalje, dio uzoraka pripada u B klasu siromašnih tala i C klasu tala dobro opskrbljenih kalijem od 16,96 do 29,68 mg  $\text{K}_2\text{O}$   $100\text{g}^{-1}$ . Isto tako, u 13 uzoraka utvrđena je hidrolitička kiselost od 2,84 do 13,08  $\text{cmol}(+)100\text{g}^{-1}$  tla.

Od svih analiziranih uzoraka jedan se izdvaja po svojim agrokemijskim svojstvima i pripada skupini neutralnih tala s  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  7,04 i sadržajem karbonata od 3,36%, te vrlo humoznih s 4,16% humusa. Isto tako, u spomenutom uzorku utvrđena je visoka koncentracija biljci pristupačnog fosfora (D-klasa visoka opskrbljenost) i kalija (C-klasa dobro opskrbljeno tlo) od 33,77 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$   $100\text{g}^{-1}$ , te 28,05 mg  $\text{K}_2\text{O}$   $100\text{g}^{-1}$ .

Tablica 5. Prosječna kemijska analiza tla lovišta na kojima su se prihranjivali jeleni lopatari.

Parametar	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
pH (H <sub>2</sub> O)	5,56	4,76	7,99	0,22
pH (KCl)	4,23	3,37	7,04	0,26
HUMUS, %	2,76	1,98	4,16	0,17
Hy, cmol kg <sup>-1</sup>	8,05	2,84	13,08	0,96
CaCO <sub>3</sub> , %	3,36	3,36	3,36	-
Al-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , mg na 100 g tla	6,78	1,71	33,77	2,22
Al-K <sub>2</sub> O, mg na 100 g tla	14,48	6,80	29,68	2,02

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost, minimum; maksimum; standardna pogreška srednje vrijednosti; pH (H<sub>2</sub>O) = trenutna ili aktualna kiselost, pH (KCl) = supstitucijska ili izmjenjiva kiselost, Hy = hidrolitička kiselost, CaCO<sub>3</sub> = karbonati u tlu, AL-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = pristupačni fosfor u tlu, AL-K<sub>2</sub>O = pristupačni kalij u tlu.

U Tablici 6. prikazane su koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u tlu. Rezultati koncentracija teških metala i esencijalnih elemenata od kojih su analizirani Pb, Cd, As, Hg, Fe i Se ukazuju na priličnu heterogenost uzoraka sa širokim raponom minimalnih i maksimalnih vrijednosti.

Tablica 6. Koncentracija teških metala i esencijalnih elemenata u uzorcima tla.

Pokazatelj	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	24,75	13,67	63,08	3,15
Cd, mg/kg	0,51	0,11	2,14	0,14
As, mg/kg	13,67	4,43	29,45	2,11
Hg, mg/kg	0,05	0,03	0,09	0,01
Fe, mg/kg	31195,71	21640,00	38780,00	1328,16
Se, mg/kg	0,28	0,19	0,48	0,02

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max = maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

Najveća odstupanja utvrđena su u koncentracijama Pb i As u tlu; kretale su se od 13,67 do 63,08 mg/kg za Pb i od 4,43 do 29,45 mg/kg za As. Od svih analiziranih uzoraka utvrđene koncentracije bile su unutar dopuštenih maksimalnih koncentracija propisanih Pravilnikom o onečišćenju tala (NN 39/2013). Koncentracija Cd u jednom uzorku iznosila je 2,13 mg/kg što je 7% više od dopuštenih Pravilnikom (2 mg/kg). U istom uzorku u kojem su utvrđene velike koncentracije kadmija utvrđene su i posebnosti što se tiče ostalih agrokemijskih svojstava

(velika pH vrijednost, velika humoznost i koncentracija fosfora i kalija) te to upućuje na različitost porijekla u odnosu na ostale uzorke. Naime, ovaj uzorak porijeklom je s dijela šume na kojem se divljač hrani, proplanka gdje se kontinuirano siju uljarice što za posljedicu ima obogaćivanje tala osnovnim nutrijentima. Na istom uzorku utvrđena je i najveća koncentracija Se od 0,48 mg/kg.

Prosječno je raspoloživog Pb u analiziranom tlu 24,75 mg/kg. To su još uvijek male koncentracije jer su Pravilnikom (NN 9/2014) o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja propisane maksimalno dopuštene količine (MDK) za glinasta poljoprivredna tla 100 mg/kg, a za praškasto-ilovasta tla 150 mg/kg. Ukupne koncentracije Pb u našem istraživanju su male pa nema realne opasnosti akumulacije Pb u nadzemnim jestivim dijelovima biljaka.

Kadmij je prema prosječnim ukupnim koncentracijama uz Hg najmanje zastupljen teški metal u našem tlu, što je vrlo povoljno jer Cd nema nikakvu pozitivnu niti fiziološku niti ekološku ulogu, već je isključivo štetan teški metal. Pravilnikom (NN 9/2014) o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja propisane su MDK za glinasta poljoprivredna tla 2 mg/kg, a za praškasto-ilovasta tla 1 mg/kg. U jednom uzorku tla Cd je tek nešto iznad MDK, što može biti posljedica geogenih procesa, ali i antropogenog unosa u tlo.

Arsen je polumetal bez korisne uloge u fiziologiji organizama, ali Pravilnikom (NN 9/2014) o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja nisu propisane MDK za poljoprivredna tla. Stoga, iako ove vrijednosti više nisu zakonski propisane, za interpretaciju koncentracija As u može poslužiti stari Pravilnik (NN 15/1992) o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja gdje je MDK za teška i teška tla 30 mg/kg, a za laka i skeletna tla 20 mg/kg. Izmjerene ukupne koncentracije As u svim analiziranim tlima s prosjekom 13,67 mg/kg u ispod su MDK, a As u analiziranim tlima vjerovatno je geogenog podrijetla.

Živa je teški metal s uvjerljivo najnižim koncentracijama u analiziranim tlima. To je vrlo povoljno jer je Hg u istoj skupini s Pb i Cd kao isključivo štetan teški metal. Pravilnikom (NN 9/2014) o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja propisane su MDK za glinasta poljoprivredna tla 1,5 mg/kg, a za praškasto-ilovasta 1 mg/kg. Izmjerene ukupne koncentracije Hg u svim analiziranim tlima bile su višestruko ispod vrijednosti MDK, s prosjekom 0,05 mg/kg. Maksimalna izmjerena ukupna koncentracija Hg je 0,09 mg/kg, to znači da su koncentracije Hg u analiziranim tlima vrlo male i da nema nikakve realne vjerojatnosti transfera Hg u jestivim dijelovima biljaka kojima se hrane jeleni lopatari.

### 3.1.2. Kemijski sastav listinca, prizemne flore i krmne smjese za jelensku divljač tijekom prve i druge godine istraživanja

U Tablicama 7. i 8. prikazan je kemijski sastav listinca i prizemne flore s četiriju područja lovišta tijekom prve godine istraživanja.

Tablica 7. Kemijski sastav listinca tijekom prve godine istraživanja.

Hranjiva tvar	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Suha tvar, %	35,87	31,16	38,13	1,59
Sirove bjelančevine, %	4,96	4,44	5,31	0,18
Sirova mast, %	0,73	0,69	0,76	0,01
Sirova vlaknina, %	11,22	9,62	12,75	0,69
Ukupni pepeo, %	2,44	2,41	2,48	0,01
NET	16,53	12,38	20,26	1,61

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti.

Tablica 8. Kemijski sastav prizemne flore tijekom prve godine istraživanja.

Hranjiva tvar	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Suha tvar, %	36,01	30,49	42,26	2,56
Sirove bjelančevine, %	5,40	4,52	6,32	0,46
Sirova mast, %	0,70	0,57	0,78	0,05
Sirova vlaknina, %	11,70	8,77	14,53	1,36
Ukupni pepeo, %	2,42	2,32	2,49	0,04
NET	15,80	12,83	18,51	1,25

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti.

U kemijskom sastavu prizemne flore tijekom prve godine istraživanja zabilježene su veće srednje vrijednosti suhe tvari (36,01:35,87%), sirovih bjelančevina (5,40:4,96%) i sirove vlaknine (11,70:11,22%) i manje srednje vrijednosti sirovih masti (0,70:0,73%) i ukupnog pepela (2,42:2,44%) u odnosu na kemijski sastav listinca.

Druge godine istraživanja utvrđena je prosječno 43,52% suhe tvari u listincu, a 37,47% u prizemnoj flori. Sirovih bjelančevina u listincu je bilo 5,32%, a u prizemnoj flori 5,36%.

Tablica 9. Kemijski sastav listinca tijekom druge godine istraživanja.

Hranjiva tvar	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Suha tvar, %	43,52	42,37	45,01	0,55
Sirove bjelančevine, %	5,32	4,96	5,98	0,23
Sirova mast, %	0,82	0,75	0,92	0,03
Sirova vlaknina, %	8,86	8,35	9,28	0,20
Ukupni pepeo, %	3,29	2,87	3,53	0,15
NET	25,23	23,42	26,49	0,70

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti.

Tablica 10. Kemijski sastav prizemne flore tijekom druge godine istraživanja.

Hranjiva tvar	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Suha tvar, %	37,47	30,58	44,16	3,18
Sirove bjelančevine, %	5,36	4,67	5,99	0,35
Sirova mast, %	0,77	0,58	0,90	0,07
Sirova vlaknina, %	9,79	8,71	12,35	0,87
Ukupni pepeo, %	2,37	2,33	2,40	0,01
NET	19,20	13,03	24,07	2,78

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti.

Sirovih masti u listincu bilo je 0,82%, a u prizemnoj flori 0,77%. Veće vrijednosti sirove vlaknine utvrđene su u sastavu prizemne flore u odnosu na sastav listinca (9,79:8,86%), dok su veće vrijednosti ukupnog pepela utvrđene u sastavu listinca (3,29:2,37%).

Tijekom prve godine istraživanja jeleni lopatari prihranjivani su krmnom smjesom za jelensku divljač. Kemijska analiza krmne smjese za prihranu jelena lopatara prikazana je u Tablici 11.

Tablica 11. Kemijski sastav krmne smjese za prihranu jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Hranjiva tvar	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Suha tvar, %	89,75	88,90	90,61	0,85
Sirove bjelančevine, %	10,37	10,02	10,73	0,35
Sirova mast, %	4,36	1,66	7,05	2,70
Sirova vlaknina, %	5,51	4,80	6,23	0,71
Ukupni pepeo, %	2,17	1,65	2,69	0,52
NET	67,34	65,66	69,02	1,68

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti.

Srednja vrijednost suhe tvari bila je 89,75%, sirovih bjelančevina 10,37%, a ukupnog pepela 2,17%. Količina sirove masti kretala se od 1,66 do 7,05%, a količina sirove vlaknine od 4,80 do 6,23%.

Tablica 12. prikazuje kemijski sastav krmne smjese za prihranu jelena lopatara tijekom druge godine istraživanja. Tijekom druge godine istraživanja jeleni lopatari prihranjivali su se gotovom krmnom smjesom s pojačanim udjelom selena (0,5 mg/kg) tijekom 60 dana.

Tablica 12. Kemijski sastav krmne smjese za prihranu jelena lopatara tijekom druge godine istraživanja.

Hranjiva tvar	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Suha tvar, %	88,85	88,45	89,26	0,40
Sirove bjelančevine, %	12,98	12,91	13,06	0,07
Sirova mast, %	3,45	3,09	3,82	0,36
Sirova vlaknina, %	7,74	7,16	8,32	0,58
Ukupni pepeo, %	5,18	2,57	7,79	49,21
NET	59,50	57,17	61,84	19,58

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti.

Srednja vrijednost suhe tvari iznosila je 88,85%, sirovih bjelančevina 12,98%, sirovih masti 3,45%, a sirove vlaknine 7,74%. Ukupni pepeo kretao se od 57,17 do 61,84%.

### 3.1.3. Teški metali i esencijalni elementi u listincu, prizemnoj flori i krmnoj smjesi za jelensku divljač tijekom prve i druge godine istraživanja

U listincu, prizemnoj flori i krmnoj smjesi za jelensku divljač određena je koncentracija teških metala (Pb, Cd, As i Hg) i esencijalnih elemenata (Fe i Se).

Tablice 13. i 14. prikazuju koncentraciju Pb, Cd, As i Hg, te Fe i Se u listincu i prizemnoj flori tijekom prve godine istraživanja.

Tablica 13. Koncentracija teških metala u uzorcima listinca tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,54	0,44	0,64	0,04
Cd, mg/kg	0,20	0,11	0,33	0,05
As, mg/kg	0,05	0,02	0,09	0,02
Hg, mg/kg	0,05	0,04	0,05	0,01
Fe, mg/kg	149,52	130,80	183,00	11,50
Se, mg/kg	0,06	0,04	0,13	0,02

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

Tablica 14. Koncentracija teških metala u uzorcima prizemne flore tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,28	0,20	0,44	0,06
Cd, mg/kg	0,10	0,03	0,22	0,04
As, mg/kg	0,08	0,06	0,12	0,01
Hg, mg/kg	0,02	0,02	0,03	0,01
Fe, mg/kg	168,75	104,90	212,60	25,87
Se, mg/kg	0,17	0,03	0,45	0,10

$\bar{x}$ . = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

U uzorcima listinca utvrđene su veće prosječne koncentracije Pb u odnosu na prosječnu koncentraciju u uzorcima prizemne flore (0,54:0,20 mg/kg), kao i srednje

vrijednosti Cd (0,28:0,10 mg/kg). Kretanje koncentracije As u uzorcima prizemne flore od 0,06 do 0,12 mg/kg bilo je veće nego u uzorcima listinca. Srednje vrijednosti Fe i Se u uzorcima prizemne flore bile su veće nego u uzorcima listinca.

Tablice 15. i 16. prikazuju koncentracije teških metala (Pb, Cd, As i Hg) i esencijalnih elemenata (Fe i Se) u uzorcima listinca i prizemne flore tijekom druge godine istraživanja.

Tablica 15. Koncentracije teških metala u uzorcima listinca tijekom druge godine istraživanja.

Pokazatelj	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,37	0,20	0,49	0,07
Cd, mg/kg	0,38	0,10	0,85	0,18
As, mg/kg	0,03	0,01	0,05	0,01
Hg, mg/kg	0,03	0,02	0,03	0,01
Fe, mg/kg	144,80	118,60	168,10	10,56
Se, mg/kg	0,04	0,03	0,06	0,01

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

Tablica 16. Koncentracije teških metala u uzorcima prizemne flore tijekom druge godine istraživanja.

Pokazatelj	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,31	0,21	0,39	0,04
Cd, mg/kg	0,31	0,20	0,49	0,06
As, mg/kg	0,03	0,01	0,07	0,01
Hg, mg/kg	0,01	0,01	0,02	0,01
Fe, mg/kg	190,72	157,80	231,30	15,17
Se, mg/kg	0,02	0,02	0,03	0,01

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

Najveća koncentracija teških metala u sastavu listinca utvrđena je za Pb (0,37 mg/kg) i Cd (0,38 mg/kg). Razina Fe kretala se od 118,60 do 168,10 mg/kg, a Se od 0,03 do 0,06 mg/kg (Tablica 15.). Iz Tablice 16. razvidno je da je koncentracija Pb i Cd u sastavu prizemne flore iznosila 0,31 mg/kg. Koncentracija Se kretala se od 0,02 do 0,03 mg/kg.



Tablice 17. i 18. prikazuju koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u krmnoj smjesi za prihranu jelena lopatara tijekom prve i druge godine istraživanja.

Tablica 17. Koncentracije teških metala u uzorcima krmne smjese za prihranu jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,10	0,10	0,11	0,01
Cd, mg/kg	0,07	0,05	0,08	0,02
As, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01
Hg, mg/kg	0,02	0,01	0,02	0,01
Fe, mg/kg	50,36	29,45	71,28	20,91
Se, mg/kg	0,09	0,04	0,15	0,06

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

Srednja vrijednost Pb u krmnoj smjesi iznosila je 0,10 mg/kg, Cd 0,07 mg/kg, As 0,01 mg/kg, a Hg 0,02 mg/kg. Koncentracija Fe kretala se od 29,45 do 71,28 mg/kg, a koncentracija Se od 0,04 do 0,15 mg/kg.

Tablica 18. Koncentracije teških metala u uzorcima krmne smjese za prihranu jelena lopatara tijekom druge godine istraživanja.

Pokazatelj	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,18	0,10	0,26	0,08
Cd, mg/kg	0,07	0,05	0,10	0,02
As, mg/kg	0,11	0,01	0,20	0,09
Hg, mg/kg	<LD	<LD	<LD	<LD
Fe, mg/kg	415,13	73,47	756,80	341,66
Se, mg/kg	3,11	2,16	4,05	0,94

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen, <LD = ispod limita detekcije.

U drugoj godini istraživanja jeleni lopatari prihranjivani su smjesom obogaćenom sa selenom. U toj hrani utvrđena je najveća koncentracija Pb (0,18 mg/kg). Koncentracija Hg

bila je ispod limita detekcije. Kod esencijalnih elementa, koncentracija Fe kretala se od 73,47 do 756,80 mg/kg, a koncentracija Se od 2,16 do 4,05 mg/kg.

### 3.2. Koncentracija teških metala i esencijalnih elemenata u tkivima jelena lopatara tijekom prve i druge godine istraživanja

Nakon odstrijela uzimani su uzorci tkiva (mišića, bubrega, jetre, masnog tkiva i slezene) radi određivanja koncentracije teških metala (Pb, Cd, As i Hg) i esencijalnih elemenata (Fe i Se). Rezultati su prikazani prema dobnim kategorijama (mladi i odrasli).

Tablica 19. Koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u mišiću mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,56	0,04	3,08	0,42	0,37	0,04	3,06	0,22
Cd, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
As, mg/kg	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01
Hg, mg/kg	<LD	<LD	<LD	<LD	0,01	0,01	0,01	0,01
Fe, mg/kg	49,46	27,13	78,65	6,51	54,38	36,59	139,40	7,36
Se, mg/kg	0,02	0,01	0,04	0,01	0,05*	0,02	0,09	0,01

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max = maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen, <LD = ispod limita detekcije, \* =  $p < 0,05$ .

U prvoj godini istraživanja utvrđena je u mišiću mladih životinja veća koncentracija Pb nego u odraslih jelena lopatara. Koncentracija ostalih teških metala bila je izrazito niska u mišićju obiju promatranih kategorija. Promatrajući esencijalne elemente, veće koncentracije i Fe i Se utvrđene su u odraslih jelena lopatara. Koncentracija Se bila je statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) u odraslih nego, u mladih jelena lopatara (0,05:0,02 mg/kg).

Tablica 20. Koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u mišiću mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,05	0,01	0,09	0,01	0,08	0,01	0,18	0,01
Cd, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
As, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Hg, mg/kg	<LD	<LD	<LD	<LD	0,01	0,01	0,01	0,01
Fe, mg/kg	47,27	33,56	97,47	8,44	45,71	38,08	54,95	1,58
Se, mg/kg	0,07	0,02	0,18	0,02	0,07	0,02	0,19	0,01

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen, <LD = ispod limita detekcije.

U Tablici 20. prikazane su koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u mišićima mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena. Koncentracija Pb u odraslih bila je veća u odnosu na mlade jelene lopatare (0,08:0,05 mg/kg). Koncentracija Hg u mladih jelena lopatara bila je ispod limita detekcije. Kod esencijalnih elemenata, koncentracija Fe od 47,27 mg/kg bila je veća u mišićima mladih u odnosu na odrasle jelene lopatare. Koncentracija Se od 0,07 mg/kg bila je podjednaka u obje dobne skupine.

Tablica 21. Koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u bubregu mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,31	0,16	0,47	0,03	0,25	0,09	0,45	0,03
Cd, mg/kg	0,41	0,16	0,52	0,04	3,82*	0,81	16,13	1,08
As, mg/kg	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01
Hg, mg/kg	0,02	0,01	0,03	0,01	0,08	0,02	0,37	0,02
Fe, mg/kg	69,85	43,44	123,40	9,60	77,30	51,23	133,00	7,41
Se, mg/kg	0,49	0,30	0,71	0,05	0,79**	0,55	1,11	0,06

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen, \*\* =  $p < 0,01$ .

U bubregu mladih jelena lopatara od analiziranih teških metala utvrđena je najveća koncentracija Cd, ali je u odraslih ona bila statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ; 3,82:0,41 mg/kg). Kod odraslih jelena lopatara razina Pb u bubregu iznosila je 0,25 mg/kg, dok je kod mladih bila veća ali bez statističke značajnosti. Kod esencijalnih elemenata, koncentracija Se u odraslih bila je statistički značajno veća ( $p < 0,01$ ) u odnosu na mlade jelene lopatare.

Tablica 22. Koncentracija teških metala i esencijalnih elemenata u bubregu mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,21**	0,09	0,32	0,03	0,01	0,05	0,21	0,01
Cd, mg/kg	0,60	0,14	1,05	0,11	2,54	0,64	10,99	0,75
As, mg/kg	0,02	0,01	0,05	0,01	0,03	0,01	0,05	0,01
Hg, mg/kg	0,01	0,01	0,02	0,00	0,07	0,01	0,44	0,03
Fe, mg/kg	72,39	52,01	119,80	8,63	66,12	39,19	104,60	5,08
Se, mg/kg	0,86	0,64	1,18	0,07	1,00	0,59	1,35	0,06

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max = maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen, \*\* =  $p < 0,01$ .

Od toksičnih metala u bubregu jelena lopatara najveće koncentracije utvrđene su za Pb kod mladih (0,21 mg/kg) i Cd kod odraslih jelena lopatara (2,54 mg/kg). Statistički značajno veća ( $p < 0,01$ ) bila je koncentracija Pb u bubregu mladih jelena lopatara. Koncentracija Fe od 72,39 mg/kg bila je veća u bubregu mladih, a koncentracija Se od 1,00 mg/kg u bubregu odraslih jelena lopatara.

Tablica 23. Koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u jetri mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,22	0,15	0,38	0,03	0,18	0,06	0,56	0,04
Cd, mg/kg	0,06	0,03	0,07	0,01	0,12*	0,06	0,33	0,02
As, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01
Hg, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02*	0,01	0,03	0,01
Fe, mg/kg	74,20	50,43	96,56	5,58	100,41	41,27	344,30	21,37
Se, mg/kg	0,07	0,05	0,11	0,01	0,15*	0,06	0,33	0,02

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen, \* =  $p < 0,05$ .

U Tablici 23. prikazane su koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u jetri mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja. Statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) koncentracija Cd (0,12:0,06 mg/kg) i Hg (0,02:0,01 mg/kg) utvrđena je u jetri odraslih jelena lopatara. Koncentracija Fe bila je veća u jetri odraslih nego u jetri mladih jelena lopatara (100,41:74,20 mg/kg). Statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) bila je koncentracija Se u jetri odraslih jelena lopatara (0,15:0,07 mg/kg).

Tablica 24. Koncentracija teških metala i esencijalnih elemenata u jetri mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,12	0,06	0,17	0,02	0,20	0,05	0,31	0,02
Cd, mg/kg	0,05	0,03	0,07	0,01	0,12	0,05	0,41	0,03
As, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	<LD	<LD	<LD	<LD
Hg, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
Fe, mg/kg	64,79	46,28	83,79	4,96	87,98	49,38	213,20	14,34
Se, mg/kg	0,12	0,07	0,23	0,02	0,15	0,04	0,45	0,03

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen, <LD = ispod limita detekcije.

Najveća koncentracija utvrđena je za Pb u odraslih jelena lopatara (0,20 mg/kg), dok je razina As bila ispod limita detekcije. Koncentracije Fe (87,98 mg/kg) i Se (0,15 mg/kg) bile su veće u jetri odraslih jelena lopatara (Tablica 24.).

Tablica 25. Koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u masnom tkivu mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,69	0,48	1,03	0,07	0,68	0,52	0,81	0,02
Cd, mg/kg	0,04	0,01	0,05	0,01	0,04	0,02	0,05	0,01
As, mg/kg	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01
Hg, mg/kg	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
Fe, mg/kg	45,37	25,57	64,89	5,63	40,43	24,71	66,23	3,84
Se, mg/kg	0,03	0,02	0,04	0,01	0,04	0,02	0,08	0,01

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

Tablica 25. prikazuje koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u masnom tkivu mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja. U obje dobne skupine, u masnom tkivu zabilježena je najveća koncentracija Pb čija je srednja vrijednost iznosila 0,69 mg/kg kod mladih i 0,68 mg/kg kod odraslih jelena lopatara. Srednja vrijednost Fe u masnom tkivu bila je veća kod mladih jelena lopatara (45,37:40,43 mg/kg), a Se kod odraslih jelena lopatara (0,04:0,03 mg/kg), ali bez statistički značajnih razlika.

Tablica 26. Koncentracija teških metala i esencijalnih elemenata u masnom tkivu mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,16	0,10	0,27	0,02	0,17	0,07	0,27	0,02
Cd, mg/kg	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01
As, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Hg, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
Fe, mg/kg	27,04	15,59	54,66	4,96	22,28	15,63	37,44	2,02
Se, mg/kg	0,02	0,01	0,04	0,01	0,02	0,01	0,04	0,01

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

Od toksičnih metala utvrđena je najveća koncentracija Pb u masnom tkivu mladih i odraslih jelena lopatara (0,16:0,17 mg/kg). Koncentracija Fe bila je veća u masnom tkivu mladih jelena lopatara u odnosu na odrasle (27,04:22,28 mg/kg). Koncentracija Se bila podjednaka u obje dobne skupine (0,02 mg/kg).

Tablica 27. Koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u slezeni mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,25	0,10	0,35	0,03	3,24	0,06	31,57	2,60
Cd, mg/kg	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01
As, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01
Hg, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Fe, mg/kg	145,32	69,13	253,90	23,26	573,75**	138,80	1379,00	129,15
Se, mg/kg	0,07	0,04	0,12	0,01	0,14	0,04	0,23	0,02

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen, \*\* =  $p < 0,01$ .

U slezeni odraslih jelena lopatara zabilježena je najveća koncentracija Pb čija je srednja vrijednost iznosila 3,24 mg/kg, ali zbog vrlo velikog odstupanja (od 0,06 do 31,57

mg/kg) razlike nisu statistički značajne. Statistički značajno veća ( $p < 0,01$ ) bila je koncentracija Fe u slezeni odraslih jelena lopatara, dok je koncentracija Se bila veća u odraslih jelena lopatara ali bez statističke značajnosti.

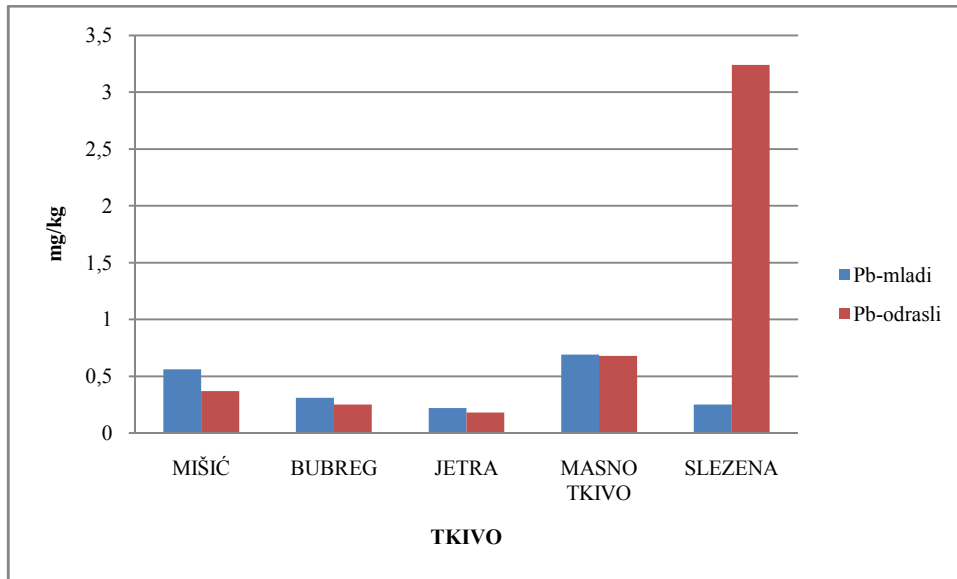
Tablica 28. Koncentracija teških metala i esencijalnih elemenata u slezeni mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Pb, mg/kg	0,05	0,03	0,07	0,01	0,07	0,04	0,13	0,01
Cd, mg/kg	<LD	<LD	<LD	<LD	0,01	0,01	0,02	0,01
As, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Hg, mg/kg	<LD	<LD	<LD	>LD	0,01	0,01	0,01	0,01
Fe, mg/kg	164,73	109,80	320,60	27,69	378,62	139,80	1065,00	79,56
Se, mg/kg	0,14	0,09	0,27	0,02	0,15	0,04	0,28	0,02

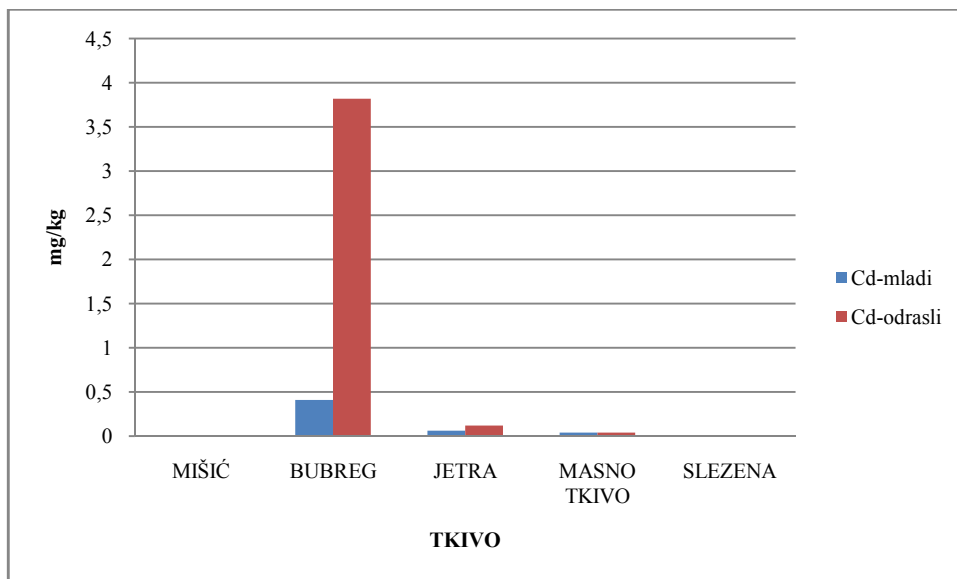
$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max =maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen, <LD = ispod limita detekcije.

Koncentracija Pb u slezeni bila je veća u odraslih jelena lopatara (0,07:0,05 mg/kg). Koncentracija Cd i Hg u mladim jelena lopatara bila je ispod limita detekcije. Koncentracija Fe bila je veća u slezeni odraslih jelena lopatara (378,62:164,73 mg/kg). Koncentracija Se kretala se od 0,09 do 0,27 mg/kg u mladim i od 0,04 do 0,28 mg/kg u odraslih jelena lopatara.



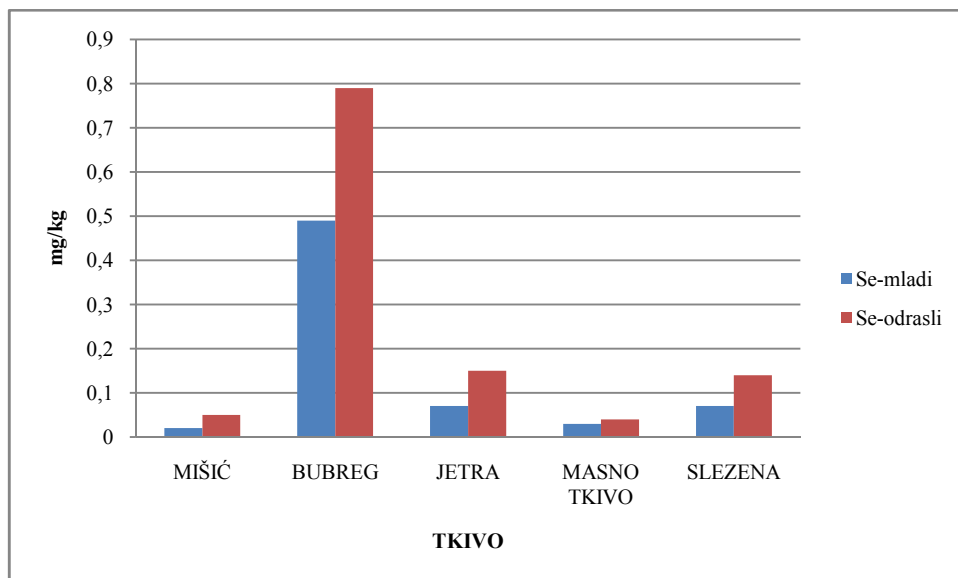


Slika 8. Koncentracija Pb u tkivima mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

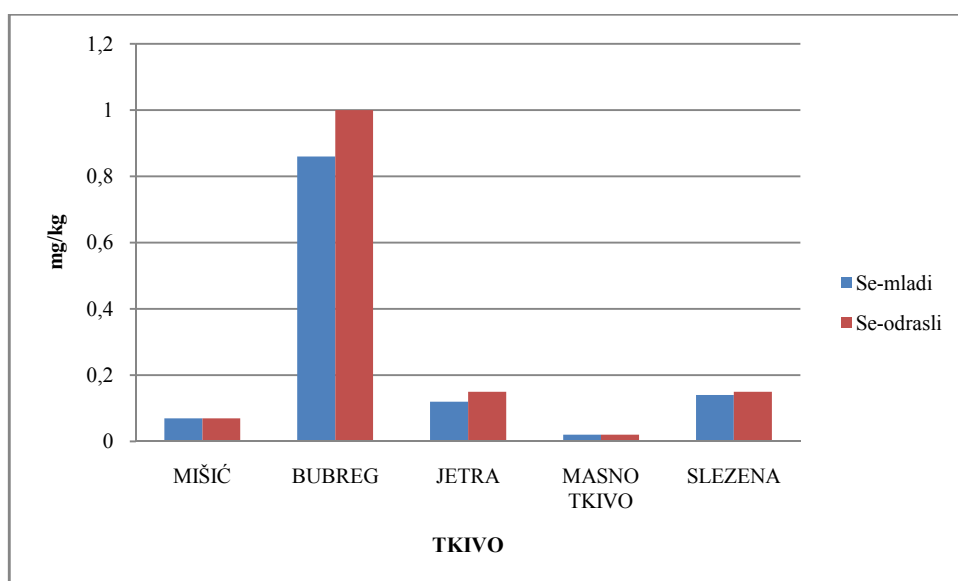


Slika 9. Koncentracija Cd u tkivima mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Najveća koncentracija Pb tijekom prve godine istraživanja utvrđena je u slezeni, a najmanja koncentracija u jetri odraslih jelena lopatara. (Slika 8.). Najveća koncentracija Cd utvrđena je u bubregu odraslih jelena lopatra, dok je najmanja koncentracija Cd utvrđena u mišiću i slezeni kod obje skupine (Slika 9.).



Slika 10. Koncentracija Se u tkivima mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.



Slika 11. Koncentracija Se u tkivima mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Tijekom prve godine istraživanja i kod mladih i kod odraslih jelena lopatara bubreg je sadržavao najveću koncentraciju Se. Najmanja koncentracija kod mladih bila je u mišiću, a kod odraslih u masnom tkivu (Slika 10.). Nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena najveća koncentracija Se također je zabilježena u bubregu mladih i odraslih, dok je najmanja koncentracija zabilježena u masnom tkivu obje skupine (Slika 11.).

### 3.3. Imunohematološki pokazatelji u jelena lopatara tijekom prve i druge godine istraživanja

Kompletna krvna slika i diferencijalna krvna slika jelena lopatara prikazana je prema dobi tijekom prve godine istraživanja. Jelena lopatari podjeljeni su u dva dobna razreda, odnosno na mlada i odrasla grla.

Tablica 29. prikazuje kompletnu krvnu sliku, odnosno broj leukocita (WBC), broj eritrocita (RBC), koncentraciju hemoglobina (HGB), hematokrit (HCT), prosječni volumen eritrocita (MCV), prosječnu masu hemoglobina po eritrocitu (MCH), prosječnu koncentraciju hemoglobina u eritrocitima (MCHC) i broj trombocita (PLT) i diferencijalnu krvnu sliku (udio neutrofila, nesegmentiranih neutrofila, eozinofila, bazofila, limfocita i monocita) kod mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Tablica 29. Imunohematološki pokazatelji u mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
WBC, $\times 10^9/L$	2,35	2,30	2,40	0,05	7,07	0,90	24,90	2,48
RBC, $\times 10^{12}/L$	15,15	14,00	16,30	1,15	12,21	5,42	21,30	1,76
HGB, g/L	160,50	157,00	164,00	3,50	163,67	77,00	301,00	25,27
HCT, L/L	0,59	0,57	0,62	0,03	0,55	0,26	0,98	0,08
MCV, fL	39,35	38,10	40,60	1,25	45,09	39,30	50,30	1,12
MCH, pg	10,65	10,10	11,20	0,55	13,32	11,40	15,80	0,44
MCHC, g/L	270,00	264,00	276,00	6,00	295,11	279,00	314,00	3,67
PLT, $\times 10^9/L$	928,00	790,00	1066,00	138,00	161,78	40,00	534,00	52,14
Neutrofil, %	40,00	32,00	48,00	8,00	42,11	36,00	49,00	39,00
Nesegmentirani neutrofil, %	7,00	3,00	11,00	4,00	5,44	2,00	12,00	4,00
Limfociti, %	49,00	38,00	60,00	11,00	50,22	43,00	56,00	49,00
Monociti, %	4,00	3,00	5,00	1,00	1,67	0,00	4,00	1,00
Eozinofili, %	0,01	0,01	0,01	0,01	0,56	0,01	3,00	0,01
Bazofili, %	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum ; standardna pogreška srednje vrijednosti; WBC = broj leukocita, RBC = broj eritrocita, HGB = koncentracija hemoglobina, HCT = hematokrit, MCV = prosječni volumen eritrocita, MCH = prosječna masa hemoglobina po eritrocitu, MCHC = prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima, PLT = broj trombocita.

U mladih jelena lopatara srednja vrijednost broja leukocita bila je  $2,35 \times 10^9/L$ , a broja eritrocita  $15,15 \times 10^{12}/L$ . Koncentracija hemoglobina kretala se od 157,00 do 164,00 g/L, a broj trombocita od 790,00 do  $1066,00 \times 10^9/L$ . Srednja vrijednost broja leukocita u odraslih ( $7,07 \times 10^9/L$ ) bila je veća u odnosu na mlade jelene lopatare, dok je srednja vrijednost broja eritrocita ( $12,21 \times 10^{12}/L$ ) bila manja u odraslih u odnosu na mlade jelene lopatare. Koncentracija hemoglobina u odraslih jelena lopatara kretala se od 77,00 do 301,00 g/L i njezina srednja vrijednost od 163,67 g/L, bila je nešto veća u odnosu na mlade jelene lopatare. Broj trombocita u odraslih jelena lopatara kretao se od 40,00 do  $534,00 \times 10^9/L$ . Udio neutrofila u mladih jelena lopatara kretao se od 32,00 do 48,00%, a u odraslih udio neutrofila bio je nešto veći. Udio nesegmentiranih neutrofila u mladih jelena lopatara kretao se od 3,00 do 11%. Udio limfocita bio je podjednak u odraslih i mladih jelena lopatara (49,00:50,22%), a udio monocita bio je veći u mladih nego u odraslih jelena lopatara (4,00:1,67%). Nesegmentiranih neutrofila bilo je više u mladih u odnosu na odrasle jelene lopatare (7,00:5,44%).

Tablica 30. Imunohematološki pokazatelji u mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
WBC, $\times 10^9/L$	4,90	2,70	6,20	1,11	3,54	2,20	5,00	0,37
RBC, $\times 10^{12}/L$	14,69	12,98	15,72	0,86	12,01	9,18	14,61	0,72
HGB, g/L	160,67	147,00	172,00	7,31	151,43	114,00	172,00	7,21
HCT, L/L	0,58	0,54	0,61	0,02	0,52	0,38	0,59	0,02
MCV, fL	39,87	38,90	41,60	0,87	43,51	39,40	49,00	1,31
MCH, pg	10,93	10,60	11,30	0,20	12,71	11,00	14,70	0,55
MCHC, g/L	275,00	272,00	280,00	2,52	291,86	278,00	315,00	5,11
PLT, $\times 10^9/L$	326,67	121,00	614,00	148,06	227,286	34,00	609,00	70,76
Neutrofili, %	35,33	26,00	41,00	4,70	35,29	27,00	47,00	2,80
Nesegmentirani neutrofili, %	4,67	2,00	7,00	1,45	3,43	2,00	8,00	0,87
Limfociti, %	57,33	46,00	72,00	7,68	56,86	45,00	64,00	2,42
Monociti, %	0,67	0,01	2,00	0,67	0,29	0,01	1,00	0,18
Eozinofili, %	2,00	0,01	6,00	2,00	4,14	0,01	14,00	1,92
Bazofili, %	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum ; standardna pogreška srednje vrijednosti; WBC = broj leukocita, RBC = broj eritrocita, HGB = koncentracija hemoglobina, HCT = hematokrit, MCV = prosječni volumen eritrocita, MCH = prosječna masa hemoglobina po eritrocitu, MCHC = prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima, PLT = broj trombocita.

U odraslih jelena lopatara srednja vrijednost broja leukocita iznosila je  $3,54 \times 10^9/L$  i bila je manja u odnosu na mlade ( $4,90 \times 10^9/L$ ), kao i broj eritrocita koji je također bio manji u odraslih u odnosu na mlade ( $12,01:14,69 \times 10^{12}/L$ ). Koncentracija hemoglobina od 160,67 g/L bila je veća u mladima u odnosu na odrasle jelene lopatare. Udio neutrofila kod mladih kretao se od 26,00 do 41,00%, a nesegmentiranih neutrofila od 2,00 do 7,00% i bio je manji u odnosu na odrasle jelene lopatare. Udio limfocita bio je podjednak u odraslih i mladima jelena lopatara (57,33:56,86%).

### 3.3.1. Biokemijski pokazatelji u jelena lopatara tijekom prve i druge godine istraživanja

U Tablici 31. prikazani su biokemijski pokazatelji u serumu (glukoza, urea, albumini, trigliceridi, kolesterol, HDL, LDL i željezo) mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Tablica 31. Biokemijski pokazatelji u serumu mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Glukoza, mmol/L	13,00	5,63	23,89	2,48	8,94	3,09	26,75	2,12
Urea, mmol/L	6,20	3,42	7,95	0,57	5,94	2,62	10,60	0,63
Albumini, g/L	30,11	26,20	33,00	0,98	29,26	18,50	34,30	1,16
Trigliceridi, mmol/L	0,68	0,16	1,79	0,20	0,45	0,14	1,39	0,10
Kolesterol, mmol/L	2,51**	1,48	3,67	0,26	1,50	0,82	2,41	0,14
HDL, mmol/L	1,83*	1,17	2,29	0,13	1,15	0,77	1,94	0,09
LDL, mmol/L	0,60*	0,24	1,12	0,15	0,21	0,02	0,68	0,07
Fe, $\mu$ mol/L	38,00	12,30	74,90	7,67	22,11	8,40	37,70	2,19

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum; standardna pogreška srednje vrijednosti; HDL = kolesterol visoke gustoće, LDL = kolesterol niske gustoće, Fe = željezo, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

U mladih jelena lopatara koncentracije glukoze kretale su se od 5,63 do 23,89 mmol/L, a srednja vrijednost je bila 13,00 mmol/L. Srednja vrijednost ureje iznosila je 6,20 mmol/L, albumina 30,11 g/L, a triglicerida 0,68 mmol/L. Koncentracije kolesterola kretale su se od 1,48 do 3,67 mmol/L. Srednje vrijednosti HDL i LDL bile su 1,83 i 0,60 mmol/L. Srednja vrijednost Fe bila je 38,00  $\mu$ mol/L. Srednje vrijednosti svih ispitanih parametara u odraslih bile su manje u odnosu na mlade jelene lopatare. Statistički značajno veća bila je koncentracija kolesterola ( $p < 0,01$ ), HDL i LDL kolesterola ( $p < 0,05$ ) u serumu mladih jelena lopatara.

Tablica 32. prikazuju biokemijske pokazatelje u serumu mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena. U drugoj godini istraživanja praćeni su isti analiti i utvrđena je prosječno veća koncentracija glukoze u mladih jelena lopatara u

odnosu na odrasle (13,29:8,69 mmol/L). Ureja se u odraslih kretala u užem rasponu od 2,40 do 7,52 mmol/L dok je u mladih odstupanje bilo veće (od 3,21 do 16,73 mmol/L).

Tablica 32. Biokemijski pokazatelji u serumu mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selen.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Glukoza, mmol/L	13,29	8,45	23,79	1,94	8,69	3,84	17,38	1,25
Urea, mmol/L	6,01	3,21	16,73	1,81	4,59	2,40	7,52	0,43
Albumini, g/L	29,08	26,50	33,70	0,99	30,51	24,10	35,00	0,95
Trigliceridi, mmol/L	0,53	0,22	1,22	0,25	0,28	0,06	0,62	0,04
Kolesterol, mmol/L	2,02**	1,45	2,40	0,12	1,49	1,02	1,99	0,09
HDL, mmol/L	1,50*	1,18	1,76	0,08	1,18	0,91	1,55	0,06
LDL, mmol/L	0,28	0,05	0,58	0,06	0,24	0,06	0,61	0,06
Fe, $\mu$ mol/L	31,05	18,60	53,90	4,19	24,74	7,80	39,10	2,47

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum; standardna pogreška srednje vrijednosti; HDL = kolesterol visoke gustoće, LDL = kolesterol niske gustoće, Fe = željezo, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

Svi parametri, osim srednje vrijednosti albumina (30,51 g/L), u odraslih jelena lopatara bili su manji u odnosu na mlade jelene lopatare. Statistički značajno veća bila je koncentracija kolesterola ( $p < 0,01$ ) i HDL kolesterola ( $p < 0,05$ ) u serumu mladih jelena lopatara.

### 3.3.2. Pokazatelji humoralne imunosti u jelena lopatara tijekom prve i druge godine istraživanja

Tablica 33. prikazuje pokazatelje humoralne imunosti (proteine, globuline i imunoglobuline G) u mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Tablica 33. Pokazatelji humoralne imunosti u serumu mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Ukupni proteini, g/L	51,10	43,50	60,50	2,05	61,13	37,00	77,80	2,71
Globulini, g/L	20,98	17,30	27,50	1,36	31,87*	18,50	46,30	2,09
Imunoglobulini G, g/L	1,98	1,53	2,40	0,11	3,19*	1,44	4,75	0,29

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum; standardna pogreška srednje vrijednosti; \* =  $p < 0,05$ .

Koncentracija ukupnih proteina bila je veća u odraslih jelena lopatara (61,13:51,10 g/L), dok je koncentracija globulina bila statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) u odraslih u odnosu na mlade jelene lopatare (31,87:20,98 g/L). Koncentracija imunoglobulina G u serumu jelena lopatara razlikovala se u odraslih na razini značajnosti ( $p < 0,05$ ) u odnosu na mlade jelene lopatare (3,19:1,98 g/L). Srednja vrijednost ukupnih proteina u mladim jelena lopatara iznosila je 51,10 g/L, a globulina 20,98 g/L. Koncentracija imunoglobulina G kretala se od 1,53 do 2,40 g/L.

S obzirom da selen utječe na imunostni sustav, pratili smo pokazatelje humoralne imunosti u mladim i odraslim jelena lopatara. U serumu odraslih jelena lopatara utvrđena je statistički značajno veća ( $p < 0,01$ ) koncentracija ukupnih proteina i globulina. Koncentracija imunoglobulina G u serumu bila je statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) u odraslim jelena lopatara (Tablica 34).



Tablica 34. Pokazatelji humoralne imunosti u serumu mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
Ukupni proteini, g/L	49,13	41,90	56,00	1,99	63,28**	55,30	74,50	1,26
Globulini, g/L	20,04	14,80	25,40	1,59	32,76**	25,60	46,30	1,58
Imunoglobulini G, g/L	2,25	1,27	5,19	0,54	4,34*	2,69	9,84	0,50

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum; standardna pogreška srednje vrijednosti; \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

### 3.4. Pokazatelji antioksidacijske zaštite i oksidacijskog stresa u jelena lopatara tijekom prve i druge godine istraživanja

Enzimi kao što su superoksid dismutaza i glutacion peoksidaza, te metabolit glutacion pokazatelji su oksidacijskog stresa. Kako bi procjenili oksidacijski status u jelena lopatara odredili smo aktivnost antioksidacijskih enzima SOD i GPx, te koncentraciju neenzimske molekule GSH kao pokazatelja antioksidativne zaštite. Odredili smo i koncentraciju vitamina E u serumu jelena lopatara kao hvatača slobodnih radikala.

Tablice 35. i 36. prikazuju aktivnost SOD, GPx i koncentraciju GSH u plazmi i vitamina E u serumu mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Tablica 35. Pokazatelji antioksidacijske zaštite i oksidacijskog stresa u plazmi i serumu mladih i odraslih jelena lopatara tijekom prve godine istraživanja.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
SOD, U/L	0,39	0,09	1,30	0,16	1,29	0,06	3,68	0,29
GPx, U/L	443,56	241,60	956,00	93,19	1081,51*	560,00	2705,60	179,02
GSH, $\mu$ M	7,41	4,56	16,56	1,58	10,69	4,65	45,86	3,34
Vitamin E, mg/L	12,31	11,20	14,52	0,43	13,20	7,74	17,27	0,78

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum; standardna pogreška srednje vrijednosti; SOD = superoksid dismutaza, GPx = glutacion peroksidaza; GSH = glutacion. \* =  $p < 0,05$ .

Srednja vrijednost aktivnosti SOD u plazmi mladih jelena lopatara iznosila je 0,39 U/L, dok je u odraslih bila veća (1,29 U/L). Koncentracija GSH u plazmi također je bila veća u odraslih nego u mladim jelena lopatara (10,69:7,41  $\mu$ M). Koncentracija vitamina E u serumu kretala se od 11,20 do 14,52 mg/L kod mladih i od 7,74 do 17,27 mg/L u odraslih jelena lopatara. Statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) bila je koncentracija GPx-a u plazmi odraslih jelena lopatara (1081,51 U/L).

Tablica 36. Pokazatelji antioksidacijske zaštite i oksidacijskog stresa u plazmi i serumu mladih i odraslih jelena lopatara nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	Mladi				Odrasli			
	$\bar{x}$	Min	Max	SEM	$\bar{x}$	Min	Max	SEM
SOD, U/L	0,58	0,06	1,32	0,16	1,13	0,03	4,64	0,37
GPx, U/L	751,77	355,10	1544,10	140,86	1118,83	262,00	3245,30	247,36
GSH, $\mu$ M	7,41	4,51	14,23	1,58	7,59	4,37	27,30	1,88
Vitamin E, mg/L	11,61	10,01	13,61	0,46	14,06*	10,93	16,85	0,59

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum; standardna pogreška srednje vrijednosti; SOD = superoksid dismuza, GPx = glutation peroksidaza; GSH = glutation, \* =  $p < 0,05$ .

U mladim jelena lopatara aktivnost SOD u plazmi iznosila je 0,58 U/L i bila je manja u odnosu na odrasle. Aktivnost GPx-a kod mladih jelena lopatara također je bila manja u odnosu na odrasle (751,77:1118,83 U/L). Koncentracija GSH u serumu bila je podjednaka u mladim i odraslim jelena lopatara (7,41:7,59  $\mu$ M). Statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) koncentracija vitamina E utvrđena je u serumu odraslih jelena lopatara.

### 3.5. Poredbeni učinak dodatka veće koncentracije selena u hrani jelena lopatara na koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata, staničnu i humoralnu imunosti i pokazatelje antioksidacije

#### 3.5.1. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u listincu, prizemnoj flori i krmnoj smjesi za jelensku divljač prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena

Za utvrđivanje cjelovitog stanja teških metala i esencijalnih elemenata tijekom istraživnog razdoblja, donosimo prikaz koncentracija teških metala i esencijalnih elemenata u svim krmivima kojima se divljač hranila.

Tablica 37. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u listincu tijekom dvije godine istraživanja.

Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
Pb, mg/kg	0,54	0,04	0,37	0,07	0,08
Cd, mg/kg	0,20	0,05	0,38	0,18	0,376
As, mg/kg	0,05	0,02	0,03	0,01	0,372
Hg, mg/kg	0,05	0,01	0,03	0,01	0,0025
Fe, mg/kg	149,52	11,50	144,80	10,56	0,774
Se, mg/kg	0,06	0,02	0,04	0,01	0,461

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max = maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

Tablica 38. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u prizemnoj flori tijekom dvije godine istraživanja.

Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
Pb, mg/kg	0,28	0,06	0,31	0,04	0,619
Cd, mg/kg	0,10	0,04	0,31	0,06	0,033
As, mg/kg	0,08	0,01	0,03	0,01	0,027
Hg, mg/kg	0,02	0,01	0,01	0,01	0,002
Fe, mg/kg	168,75	25,87	190,72	15,17	0,491
Se, mg/kg	0,17	0,10	0,02	0,00	0,179

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max = maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

Nasumičnim uzimanjem uzoraka listinca utvrđena je manja koncentracija Pb i statistički značajno manja ( $p < 0,01$ ) koncentracija Hg druge godine, ali i manja koncentracija As i veća koncentracija Cd, ali bez statističkih značajnosti (Tablica 37.). U uzorcima prizemne flore utvrđena je statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) koncentracija Cd i statistički značajno manja koncentracija ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ) As i Hg druge godine istraživanja (Tablica 38.). Kada promatramo esencijalne elemente, koncentracija Se bila je manja u uzorcima listinca i prizemne flore druge godine, dok je koncentracija Fe u uzorcima prizemne flore bila veća druge godine istraživanja ali bez statističke značajnosti.

Tablica 39. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u krmivima za prihranu tijekom dvije godine istraživanja.

Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
Pb, mg/kg	0,19	0,01	0,18	0,08	0,734
Cd, mg/kg	0,07	0,02	0,07	0,02	0,875
As, mg/kg	0,01	0,01	0,11	0,09	0,412
Hg, mg/kg	0,02	0,01	<LD	<LD	0,143
Fe, mg/kg	50,36	20,91	415,13	341,66	0,398
Se, mg/kg	0,09	0,06	3,11	0,94	0,077

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max = maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen, <LD = ispod limita detekcije.

U krmnoj smjesi druge godine utvrđena je manja koncentracija Pb i Hg, te veća koncentracija As, ali bez statističkih značajnosti. Koncentracija Cd bila je podjednaka (0,07 mg/kg) obje godine. Koncentracije esencijalnih elemenata bile su veće druge godine ali bez statističkih značajnosti.

### 3.5.2. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u tkivima jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena

U Tablicama 40. do 44. prikazan je komparativni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u tkivima jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Tablica 40. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u mišiću jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
Pb, mg/kg	0,44	0,20	0,07	0,01	0,456893
Cd, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,999603
As, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,263796
Hg, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,954605
Fe, mg/kg	52,66	5,22	46,25	2,99	0,985593
Se, mg/kg	0,04	0,00	0,07	0,01	0,689194

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max = maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

U mišiću jelena lopatara utvrđena je manja koncentracija Pb druge godine (0,07:0,44 mg/kg). Koncentracije Cd, As i Hg bile su podjednake u obje godine. Koncentracija Fe bila je manja, a koncentracija Se veća nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Tablica 41. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u bubregu jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
Pb, mg/kg	0,27	0,02	0,15	0,02	0,434771
Cd, mg/kg	2,43	0,79	1,86	0,53	0,264114
As, mg/kg	0,02	0,01	0,01	0,01	0,000446
Hg, mg/kg	0,06	0,02	0,05	0,02	0,693337
Fe, mg/kg	74,69	5,78	68,31	4,39	0,652627
Se, mg/kg	0,69	0,05	0,96	0,05	0,0000001

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max = maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

U bubregu jelena lopatara utvrđene su manje koncentracije svih teških metala. Statistički značajno manja ( $p < 0,01$ ) koncentracija As utvrđena je druge godine. Koncentracija Se nakon dopunske hranidbe bila je statistički značajno veća ( $p < 0,01$ ), dok je koncentracija Fe bila manja ali bez statističke značajnosti.

Tablica 42. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u jetri jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
Pb, mg/kg	0,19	0,03	0,17	0,02	0,980949
Cd, mg/kg	0,10	0,01	0,10	0,02	0,976588
As, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,113561
Hg, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,814272
Fe, mg/kg	91,24	14,11	79,86	9,67	0,673209
Se, mg/kg	0,13	0,02	0,14	0,02	0,930139

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max = maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

U jetri jelena lopatara utvrđena je manja koncentracija Pb druge godine, dok je koncentracija Cd, As i Hg bila podjednaka u obje godine. Utvrđena je manja koncentracija Fe i veća koncentracija Se druge godine ali bez statističkih značajnosti.

Tablica 43. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u masnom tkivu jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
Pb, mg/kg	0,69	0,03	0,17	0,01	0,001811
Cd, mg/kg	0,04	0,01	0,02	0,01	0,970884
As, mg/kg	0,02	0,01	0,01	0,01	0,002218
Hg, mg/kg	0,02	0,01	0,01	0,01	0,742937
Fe, mg/kg	42,16	3,14	23,94	2,16	0,224199
Se, mg/kg	0,03	0,01	0,02	0,01	0,727300

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max = maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

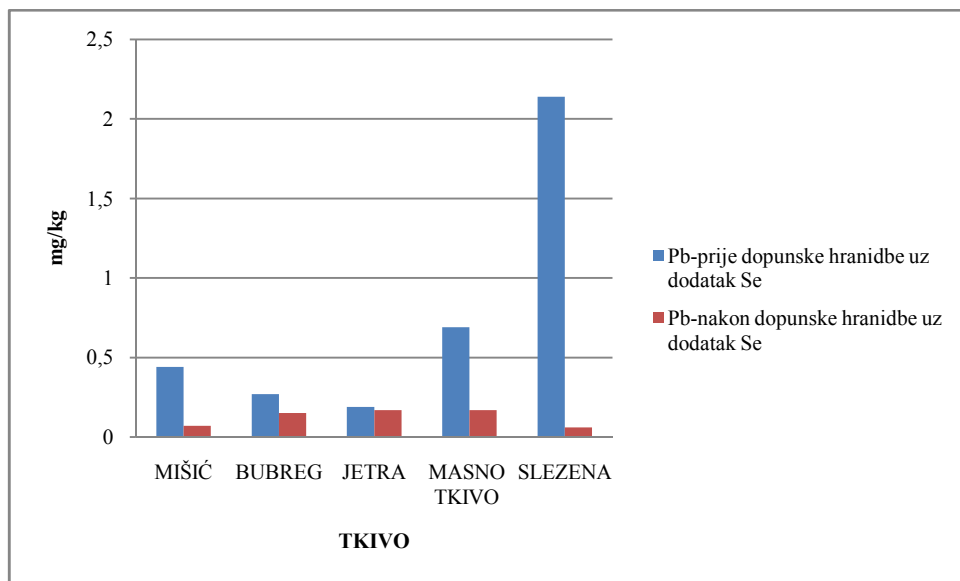
U masnom tkivu jelena lopatara utvrđena je statistički značajno manja ( $p < 0,01$ ) koncentracija Pb i As druge godine. Koncentracija Cd i Hg bila je također manja druge godine, ali ne i statistički značajna. Koncentracije esencijalnih elemenata u masnom tkivu nakon dopunske hranidbe bile su manje.

Tablica 44. Poredbeni prikaz teških metala i esencijalnih elemenata u slezeni jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

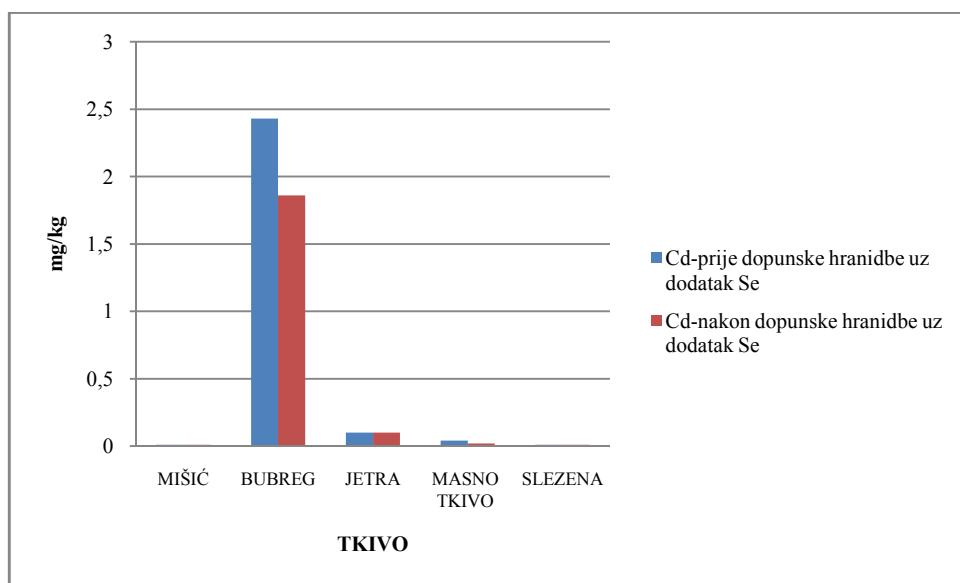
Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
Pb, mg/kg	2,14	1,65	0,06	0,01	0,0086
Cd, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,9953
As, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,021353
Hg, mg/kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,985213
Fe, mg/kg	423,80	95,42	303,76	56,84	0,076499
Se, mg/kg	0,12	0,01	0,15	0,02	0,246216

$\bar{x}$  = srednja vrijednost, min = minimum, max = maksimum, SEM = standardna pogreška srednje vrijednosti; Pb = olovo; Cd = kadmij; As = arsen; Hg = živa, Fe = željezo, Se = selen.

U slezeni jelena lopatara statistički značajno manja bila je koncentracija Pb ( $p < 0,01$ ) i As ( $p < 0,05$ ) druge godine. Koncentracije Cd i Hg bila je podjednaka nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena. Koncentracija Se bila je veća druge godine ali nije bila statistički značajna (0,15:0,12 mg/kg).



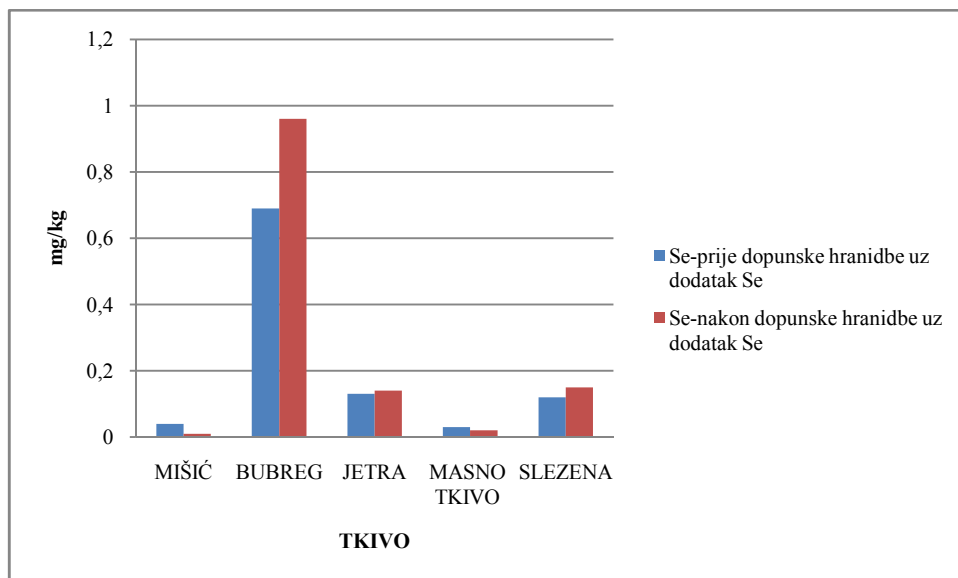
Slika 12. Koncentracija Pb u tkivima jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena



Slika 13. Koncentracija Cd u tkivima jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena

Nakon dopunske hranidbe uz dodatak Se utvrđene su manje koncentracije Pb u svim tkivima jelena lopatara, dok je najmanja koncentracija Pb utvrđena u mišiću i slezeni (Slika 12.). Koncentracija Cd bila je manja u svim tkivima osim jetre gdje je koncentracija Cd ostala nepromjenjena. Najmanje koncentracije utvrđene su u mišiću i slezeni (Slika 13.).





Slika 14. Koncentracija Se u tkivima jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena

Koncentracija Se nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena bila je veća u bubregu, jetri i slezeni, dok je u mišiću i masnom tkivu bila manja (Slika 14.).

### 3.5.3. Poredbeni prikaz imunohematoloških pokazatelja u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena

Broj eritrocita i koncentracija hemoglobina bila je veća druge godine, dok je broj leukocita, hematokrit, prosječni volumen eritrocita, prosječna masa hemoglobina po eritrocitu, prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima i broj trombocita bio manji (Tablica 45.).

Tablica 45. Poredbeni prikaz imunohematoloških pokazatelja prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
WBC, $\times 10^9/L$	6,21	2,08	3,95	0,43	0,3239
RBC, $\times 10^{12}/L$	12,74	1,47	12,81	0,67	0,9652
HGB, g/L	163,09	20,45	154,20	5,46	0,6922
HCT, L/L	0,56	0,07	0,54	0,02	0,7716
MCV, fL	44,04	1,15	42,42	1,08	0,3196
MCH, pg	12,84	0,49	12,18	0,47	0,3459
MCHC, g/L	290,54	4,34	286,80	4,39	0,5518
PLT, $\times 10^9/L$	301,09	104,21	257,10	63,47	0,7289
Neutrofili, %	41,73	1,51	35,30	2,26	0,2660
Nesegmentirani neutrofili, %	5,73	0,95	3,80	0,73	0,1302
Limfociti, %	50,00	1,90	57,00	2,59	0,0395
Monociti, %	2,09	0,46	0,40	0,22	0,0044
Eozinofili, %	0,45	0,28	3,50	1,45	0,0434
Bazofili, %	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum; standardna pogreška srednje vrijednosti; p-vrijednost; WBC = broj leukocita, RBC = broj eritrocita, HGB = koncentracija hemoglobina, HCT = hematokrit, MCV = prosječni volumen eritrocita, MCH = prosječna masa hemoglobina po eritrocitu, MCHC = prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima, PLT = broj trombocita.

Udio neutrofila i nesegmentiranih neutrofila bio je manji druge godine. Udio limfocita i eozinofila bio je statistički značajno veći ( $p < 0,05$ ), dok je udio monocita bio statistički značajno manji ( $p < 0,01$ ) nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

### 3.5.4. Poredbeni prikaz biokemijskih pokazatelja u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena

Koncentracija albumina bila je veća druge godine, dok je koncentracija glukoze, ureje, triglicerida, kolesterola, HDL-a, LDL-a i Fe bila manja. Kod biokemijskih pokazatelja nije bilo statističkih značajnosti.

Tablica 46. Poredbeni prikaz biokemijskih pokazatelja u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
Glukoza, mmol/L	10,36	1,65	10,30	1,14	0,8806
Urea, mmol/L	6,03	0,45	5,09	0,68	0,2789
Albumini, g/L	29,56	0,81	30,01	0,71	0,5455
Trigliceridi, mmol/L	0,53	0,09	0,37	0,06	0,5926
Kolesterol, mmol/L	1,85	0,17	1,68	0,09	0,322
HDL, mmol/L	1,39	0,10	1,29	0,06	0,4888
LDL, mmol/L	0,34	0,08	0,25	0,04	0,3056
Fe, $\mu$ mol/L	27,67	3,39	26,95	2,22	0,4918

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum; standardna pogreška srednje vrijednosti, p-vrijednost; HDL = kolesterol visoke gustoće, LDL = kolesterol niske gustoće, Fe = željezo.

### 3.5.5. Poredbeni prikaz pokazatelja humoralne imunosti u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena

U Tablici 47. je poredbeni prikaz pokazatelja humoralne imunosti u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Tablica 47. Poredbeni prikaz pokazatelja humoralne imunosti u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
Ukupni proteini, g/L	57,62	2,17	58,32	1,87	0,9617
Globulini, g/L	28,06	1,85	28,31	1,80	0,7624
Imunoglobulini G, g/L	2,77	0,23	3,61	0,43	0,182

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum; standardna pogreška srednje vrijednosti; p-vrijednost.

Koncentracija ukupnih proteina bila je veća druge godine (58,32:57,62 g/L). Koncentracija globulina bila je podjednaka prve i druge godine istraživanja. Koncentracija imunoglobulina G nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena bila je veća (3,61:2,77 g/L), ali bez statističke značajnosti.

### 3.5.6. Poredbeni prikaz antioksidacijske zaštite i oksidacijskog stresa u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena

Aktivnost SOD i GPx u plazmi i koncentracija GSH i vitamina E u serumu jelena lopatara tijekom dvije godine istraživanja prikazuje Tablica 48.

Tablica 48. Poredbeni prikaz antioksidacijske zaštite i oksidacijskog stresa u jelena lopatara prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena.

Pokazatelj	1. godina		2. godina		P-vrijednost
	$\bar{x}$	SEM	$\bar{x}$	SEM	
SOD, U/L	0,98	0,22	0,94	0,25	0,9180
GPx, U/L	933,23	125,91	1375,36	141,88	0,0478
GSH, $\mu$ M	9,54	2,23	7,53	1,31	0,888
Vitamin E, mg/L	12,88	0,53	13,20	0,49	0,9353

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost; minimum; maksimum; standardna pogreška srednje vrijednosti, p-vrijednost; SOD = superoksid dismuza, GPx = glutatation peroksidaza; GSH = glutatation.

Aktivnost SOD-a bila je manja druge godine, dok je statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) bila aktivnost GPx-a. Koncentracija GSH bila je manja druge u odnosu na prvu godinu istraživanja (7,53:9,54  $\mu$ M). Koncentracija vitamina E u serumu bila je veća druge godine, ali bez statističke značajnosti (13,20:12,88 mg/L).

## 4. RASPRAVA

### 4.1. Tlo, biljne zajednice i prihrana jelena lopatara

U tlu se odvijaju različiti fizikalno-kemijski i biološki procesi koji utječu na zdravlje i proizvodnost životinja. Osnovna značajka tla je da je nosilac vegetacije, tj. hrane za životinje. Šumska tla razlikuju se od poljoprivrednih tala, osobito od onih koja se obrađuju. Njih karakteriziraju manji poremećaji u tlu jer je utjecaj gnojiva, herbicida, insekticida i fungicida zanemariv. Šumske biljne zajednice oslanjaju se na svoja unutarnja hraniva kako bi osigurale potrebnu količinu hranjivih tvari. pH vrijednost tla indikator je kiselosti ili alkalnosti tla i ima značajan utjecaj na fizikalne, kemijske i biološke procese u tlu i ishranu biljaka. U našem istraživanju od 14 analiziranih uzoraka, 13 uzoraka pripada grupi jako kiselih i kiselih tala s rasponom vrijednosti  $pH_{KCl}$  od 3,37 do 4,94, dok se jedan uzorak izdvajao po svojim agrokemijskim svojstvima i pripada grupi neutralnih tala s  $pH_{KCl}$  7,04. Znamo da reakcija tla, izražena kao pH vrijednost, snažno utječe na raspoloživost hranjivih elemenata. Niska pH vrijednost utječe na povećanu pokretljivost Al u tlu, ali i većine mikroelemenata Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B) i toksičnih elemenata (Cd, Cr, Pb, Hg), dok smanjuje raspoloživost fosfora i molibdena. Također, porast pH iznad 7 izaziva višak Ca i Mg, manjak K i smanjenu raspoloživost nekih hraniva (Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, B) te manju topivost toksičnih teških metala. Stevenson je (1982) definirao pojam humusa kao zbroj organskih komponenti u tlu uz iznimku živih organizama biomase i nerazgrađenih ili djelomično razgrađenih biljnih ili životinjskih organizama. Njegova uloga u tlu je višestruka (popravljanje strukture tla, poboljšanje vodno-zračnog režima). Sa sadržajem humusa od 1,98 do 3,75% i 4,15% naša tla pripadaju grupi srednje humoznih i humoznih tala i grupi vrlo humoznih tala. U tlu stabilne šumske sastojine intenzitet nastanka i razgradnje organske tvari trebao bi biti uravnotežen, što bi rezultiralo stabilnim sadržajem humusa. Koncentracije fosfora u 13 uzoraka bile su izrazito niske od 1,90 do 11,34 mg  $P_2O_5$  100 g<sup>-1</sup> te tlo pripada klasama tala jako siromašnih (A klasa) i siromašnih (B klasa) fosforom. Što se tiče kalija veći broj uzoraka također pripada klasi tala jako siromašnih kalijem (A klasa) s rasponom utvrđenih koncentracija od 6,80 do 13,14 mg  $K_2O$  100 g<sup>-1</sup>. Manji dio uzoraka pripada u klasu siromašnih tala (B klasa) i klasu tala dobro opskrbljenih kalijem (C klasa). Fosfor je najpotrebniji kod biljaka za vrijeme intenzivnog rasta korijena, te kod prelaska iz vegetativne u generativnu fenofazu. Nedostatak je često posljedica smanjene pristupačnosti u kiselim tlima zbog kemijske fiksacije. Kalij se u tlu nakon oslobađanja iz primarnih minerala najviše izmjenjivo veže na adsorpcijski kompleks tla pa se teže gubi ispiranjem. Moguća je i njegova fiksacija u međulamelarnim prostorima

sekundarnih minerala, koja ovisi o prisustvu drugih kationa i o vrsti sekundarnih minerala gline (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Nedostatak kalija se odražava na cjelokupan rast i razvoj biljaka zbog njegove složene funkcije u biljnom metabolizmu. Hidrolitička kiselost definirana je kao sposobnost tla da svoje ione adsorpcijskog kompleksa zamjenjuje s bazama iz soli jakih baza i slabih kiselina i oslobađa ekvivalentne količine kiseline (Škorić, 1991.). U 13 uzoraka utvrđena je hidrolitička kiselost od 2,84 do 13,08 cmol 100 g<sup>-1</sup> tla. Reakcija tla iznad pH 7,2 ukazuje na moguću prisutnost karbonata u tlu. pH vrijednost iznad 8,5 ukazuje na povišenu koncentraciju Na<sup>+</sup> iona (alkalizacija tala) u vidu karbonata i hidroksida. U našim uzorcima tla samo je jedan uzorak imao pH iznad 7,2 i u njemu je sadržaj karbonata iznosio 3,36%.

Vegetacija i tlo međusobno su povezani i pokazuju međusobne učinke jedni na druge. Tlo kao supstrat je izvor vlage i hranjivih tvari, a vegetacija pruža zaštitni pokrov tlu, potiskuje eroziju i održava razinu hranjivih tvari (Eni i sur., 2011.). Biljne vrste pokazuju velike razlike u njihovom potencijalu relativne stope rasta. Biljke u područjima gdje je ishrana siromašna imaju nizak potencijal relativne stope rasta, za razliku od produktivnih staništa koja su bogata hranjivim tvarima gdje je potencijal relativne stope rasta visok. Biomasa se razlikuje između vrsta s različitih staništa. Tamo gdje je veća konkurencija za hranjivim tvarima, veća je razlika u koncentraciji hranjivih tvari između lišća i prizemne flore (Poorter i Remkes, 1990.). U našem istraživanju slične vrijednosti utvrđene su za zajedničke parametre u uzorcima listinca i prizemne flore tijekom dvije godine istraživanja. Sirove masti u listincu i prizemnoj flori iznosile su 0,73% i 0,82% (listinac); i 0,70% i 0,77% (prizemna flora). Sirove bjelančevine u listincu i prizemnoj flori iznosile su 4,96% i 5,40% tijekom prve, te 5,32% i 5,36% tijekom druge godine istraživanja što je znatno manje od rezultata u istraživanju koje su proveli Poli i sur. (1996.) gdje su sirove bjelančevine u biljkama, hrani jelena lopatara, iznosile 12%.

Većina sisavaca preživača živi u staništima koje karakteriziraju sezonske promjene (Hofmann, 1989.; Freeland, 1991.). Preživač normalno uzme između 10 000 i 40 000 zalogaja vegetacije svaki dan (Milne, 1991.), tako da je razina sekundarnih komponenti biljaka koje su dostupne ogromna. Mnogo je čimbenika koji utječu na odabir hrane kod preživača, primjerice koncentracija bjelančevina, ugljikohidrata i minerala (Forbes, 1995.), količina vlakana, prisutnost bodlji i trnja, kao i prisutnost sekundarnih biljnih komponenti (Lindroth, 1989.). Jelen lopatar je preživač koji ima široki izbor krmiva (Chapman i Chapman, 1997.) koji ovisi o godišnjem dobu (Moore i sur., 2000.). U studiji koju je proveo Jackson (1977) pregledan je sadržaj buraga 300 jelena lopatara u svim godišnjim dobima.

Otkriveno je da je obrok sadržavao više od 60% trave tijekom ljetnog razdoblja, dok su tijekom jeseni i zime jeleni lopatari konzumirali više voća, crngorice, paprati, kupine i grmlja. Tijekom jeseni konzumirali su i oko 40% žira. U našem istraživanju tijekom dvije godine istraživanja jeleni su prihranjivani gotovom smjesom temeljenom na kukuruzu, suncokretu, te pšenici i soji. Gotova krmna smjesa sadržavala je tek druge godine dodatak selena (0,5 mg/kg). Postotak hranjivih tvari koje su prihrane sadržavale bio je ujednačen tijekom dvije godine istraživanja. Mnoga su istraživanja provedena kako bi se otkrilo na koji način životinje biraju hranu, posebice preživači koji žive u područjima sezonskih promjena. Mnogo čimbenika, poput koncentracije bjelančevina i minerala utječe na odabir hrane, a osim toga značajnu ulogu imaju i sadržaj toksina i celuloze. Istraživanja o izboru hrane u okolišu, u različitim staništima, potvrdila su da jelen lopatar bira hranu za konzumaciju (Poli i sur., 1996.; Moore i sur., 2000.). Prihrana kod jelena je dosta bitna. Pogotovo u stresnim razdobljima s kojima se jeleni susreću kada je sadržaj bjelančevina u njihovoj ishrani nizak, tijekom hladnih zima i suhih ljeta. Jedna od popularnih žitarica koja se koristi u dopunskoj hranidbi jelena je kukuruz. Iako kukuruz sadrži mali dio bjelančevina (oko 7% do 10%) on sadrži visoku koncentraciju ugljikohidrata pa je zbog toga jaki energetski dodatak tijekom hladnih zima. Jelen mora dobiti barem 6 do 7% sirovih bjelančevina za održavanje funkcije buraga i 12 do 16% bjelančevina za optimalan razvoj kostiju i mišića (Perkins, 1991.). U našem istraživanju prihrana je sadržavala 10,37% i 12,98% sirovih bjelančevina, što je nešto manje od prihrane kod jelena bjelorepana (*Odocoileus virginianus* Zimm.) gdje je koncentracija sirovih bjelančevina bila 15,1% (Ramirez i sur., 1996.). Kod jelena lopatara u istraživanju koje su proveli Enright i sur. (2001) koncentracija sirovih bjelančevina također je bila veća i iznosila je 15%. U njihovom istraživanju, kao i u našem, najviše je bilo suhe tvari (86%), dok su rezultati za sirovu masti i sirovu vlakninu bili slični našima (4% i 8,1%). Česti dodatak u prihrani su i esencijalni minerali poput selena. Metabolizam selena kod domaćih životinja je poznat kao i načini kako dijagnosticirati i spriječiti deficit (Gunter i sur., 2013.; Humann-Ziehank i sur., 2013.). Kod divljih cervida kao što su los, jelen obični, smnjak, jelen bjelorepan i sob analize selena u serumu i jetri ukazuju na nisko do umjereno primanje selena (Aastrup i sur., 2000.; Grace i Wilson, 2002.; Wolf i sur., 2008.; Hassan i sur., 2012.). Poznato je da primanje selena varira s geografskim položajem i gustoćom populacije, kao i da su biljke u Europi siromašne selenom. Referentne vrijednosti za selen poznate su u jelena običnog, ali ne i u jelena lopatara. Naši jeleni lopatari prihranjivani su gotovom krmnom smjesom uz dodatak selena (0,5 mg/kg) tijekom 60 dana, slično istraživanje proveli su Stoebe i sur. (2014) gdje su jeleni lopatari prihranjivani tijekom 12 tjedana peletiranom hranom koja

je sadržavala 0,18 mg/kg selena tijekom 7 tjedana i 0,32 mg/kg selena tijekom 5 tjedana kako bi vidjeli utjecaj dodatka selena na ukupnu koncentraciju selena i aktivnost GPx u krvi, serumu i tkivima jelena lopatara.

Tlo predstavlja veliki spremnik teških metala koji se ispuštaju u okoliš putem antropogenih aktivnosti i za razliku od organskih kontaminanata koji oksidiraju u ugljikov (IV) oksid mikrobiološkim djelovanjem, većina metala ne može proći mikrobiološku i kemijsku degradaciju (Kirpichtchikova i sur., 2006.), a njihova ukupna koncentracija u tlu ostaje dugo nakon ulaska (Adriano, 2003.). U našim uzorcima tla određena je koncentracija teških metala (Pb, Cd, As i Hg), kao i esencijalnih elemenata (Fe i Se). Uobičajena srednja vrijednost koncentracija olova u tlu iznosi 32 mg/kg i kreće se od 10 mg/kg do 67 mg/kg (Kabata-Pendias i Pendias, 2001.). U našim uzorcima tla srednja vrijednost olova iznosila je 24,75 mg/kg. To je slično koncentracijama olova u tlu (25 mg/kg) koje su dobili Kabata-Pendias i Mukherjee (2007) i Aloway (2013), a veće od koncentracije Pb u tlu koju su utvrdili Kulizhskiy i sur. (2014), a iznosila je 0,97 mg/kg. Udisanje i gutanje dva su načina izloženosti, a učinci su isti. Olovo se akumulira u mozgu, što može dovesti do trovanja ili čak smrti. Prisutnost olova također utječe na probavni sustav, bubrege i središnji živčani sustav (NSC, 2009.). Najozbiljniji izvor izlaganja olovu u tlu je kroz gutanje onečišćenog tla ili prašine. Općenito, biljke ne apsorbiraju ili akumuliraju olovo. Međutim, ako je u tlu visoka koncentracija olova moguće je da se dio akumulira u samu biljku. Istraživanja su pokazala da se ono ne nakuplja u plodnim dijelovima voća, povrća i usjeva (primjerice kukuruz, grah, rajčica, jagode i jabuke). Veća je vjerojatnost da će se ono nalaziti u lisnatim dijelovima (primjerice salata) ili površini korijenastih usjeva (kao što je mrkva). Rizik od trovanja olovom kroz hranidbeni lanac povećava se kada se koncentracija u tlu poveća iznad 300 mg/kg (Rosen, 2002.). Kadmij nema korisne fiziološke učinke u biljkama, životinjama i ljudima. Osim toga, relativno visoka koncentracija u tlu (>10 mg/kg) može izazvati fitotoksičnost, negativno utječe na klijavost, rast korijena, transpiraciju i fotosintezu, kao i na usvajanje hranjivih tvari i vode (Sharma i Dubey, 2006.). Kadmij ima dugo vrijeme poluživota (>10 godina) i njegova akumulacija u organizmu se povećava s vremenom (Di Toppi i Gabrielli, 1999.), uzrokujući brojne zdravstvene probleme. Koncentracija kadmija u našim uzorcima tla iznosila je 0,51 mg/kg. To odgovara koncentraciji od 0,5 mg/kg koju su utvrdili Kabata-Pendias i Mukherjee (2007), a nešto je veća od koncentracije od 0,29 mg/kg koju su utvrdili Cauty i sur. (2011.). Dijkstra i sur. (2004) primjetili su dominantnu ulogu organskih reaktivnih površina tla u kompleksaciji i kemijskoj adsorpciji kadmija. Organske tvari imaju specifičnu površinu i veliki kapacitet kationske izmjene, čime snažno utječu na



anorganske ligande u procesima resorpcije i kompleksiranja (Weng i sur., 2002.), reducirajući tako biodostupnost i usvajanje metala poput kadmija (Pinto i sur., 2004.). Raspon u kojem je arsen prisutan u tlu varira između 0,2 mg/kg i 40 mg/kg (Smedley i Kinniburgh, 2002.). Koncentracija arsena od 13,67 mg/kg u našim uzorcima tla bila je veća od koncentracije od 6,65 mg/kg koju su zabilježili Canty i sur. (2011), no ona je bila u razini dopuštenog. Dobar pokazatelj mobilnosti, migracije i potencijalne toksičnosti je frakcija u kojoj se arsen nalazi u tlu. S ekološkog i toksikološkog stajališta, frakcije koje sadrže kontaminante u matriksu tla treba koristiti u analizi kao pokazatelje rizika kontaminacije tla (Mench i sur., 2009.). Porast pH vrijednosti često rezultira mobilizacijom arsena u tlu. Općenito, porast pH tla uzrokuje oslobađanje aniona sa svojih mjesta, tako da su arsenat i arsenit mobilni (Fitz i Wenzel, 2002.; Beesley i sur., 2010.). U tlu je prisutna i živa. U našim uzorcima tla koncentracija živa bila je 0,05 mg/kg. Živa u tlu obično se snažno resorbira na organske tvari i/ili metalne okside koji ju čine nepokretnom (Kabata-Pendias, 2001.). Vrste anorganske žive, kao što je živin klorid, slabo se vežu u tlu i mogu se metilirati što rezultira mobilnim organskim vrstama žive kao što je metil živa, jedan od najvažnijih otrovnih organo-metalnih oblika žive (Han i sur., 2003.). Dokazano je da živa iz tla lako može ući u hranidbeni lanac. Izloženost živi može imati učinak na središnji živčani sustav životinja, na njihov razvoj i zdravlje (Meng i sur. 2011.). Kod preživača izloženost živi može dovesti do nakupljanja u bubrezima, a također se može prenijeti i u mlijeko (Olkowski, 2009.). Osim toksičnih, u tlu su prisutni i esencijalni elementi. U našim uzorcima tla izmjerena je koncentracija esencijalnih elemenata, Fe i Se. Koncentracija željeza bila je 31 195,71 mg/kg. Uobičajena koncentracija željeza u tlu iznosi od 20 000 do 550 000 mg/kg, a sama distribucija željeza u tlu ovisi o prisutnosti organske tvari (Bodek i sur., 1988.). Ono se u tlu nalazi u obliku slabo topivih željeznih oksida/hidroksida (Mengel i sur., 2006.) i raspoloživa frakcija željeza čini značajno manje od 1% ukupnog željeza u tlu, što značajno ovisi o pH reakciji tla. Tla su vrlo često deficitarna biljkama pristupačnim željezom zbog aerobnih uvijeta i alkalne pH reakcije. Poznato je da na topivost i brzinu otapanja Fe-okisda/hidroksida najviše utječe pH tla, s najmanjim topivostima u karbonatnom tlu (pH >7,4). Kada je razina željeza u tlu niska, tada biljke tijekom svoga rasta mogu upijati teške metale iz tla. Sadržaj selena u tlu je vrlo promjenjiv. On varira od 0,1 µg/g do 2 µg/g u većini tala, a najčešće se kreće od 0,2 µg/g do 0,4 µg/g (McNeal i Balistreri, 1989.). Koncentracija selena u našim uzorcima tla bila je 0,28 mg/kg, što je veće od koncentracije selena od 0,25 ppm zabilježenim u Vojvodini (Čuvardić i sur., 1997.), a manje od koncentracije selena od 0,43 mg/kg koju su utvrdili Canty i sur. (2011) na području Irske. Sadržaj selena obično opada s dubinom jer se veže s bjelančevinama i organskim spojevima

koji sadrže dušik (Abrams i sur., 1990.). Fiksacija selena može biti posljedica mikrobiološkog uklapanja u aminokiseline i druge organske komponente koje sadrže selen. Ukupni sadržaj u tlu nije uvijek u korelaciji sa sadržajem u biljkama jer na topljivost selena utječe nekoliko čimbenika kao što su reakcija tla i sadržaj organske tvari (Pezzarossa, 1999.). Prema rezultatima našeg istraživanja tla su nedovoljno opskrbljena selenom. U području istočne Hrvatske utvrđen je deficit selena u tlu (Antunović i sur., 2005.) jer su koncentracije značajno ispod granica deficita (0,5 mg/kg) selena u tlu (Manojlović i Singh, 2012.).

Akumulacija teških metala u biljkama ovisi o biljnim vrstama. Koliko će biljke usvojiti i akumulirati metale ovisi o čimbenicima prijenosa metala iz tla u biljku (Rattan i sur., 2005.). Akumulacija teških metala u biljkama povećava rizik od prijenosa u preživače, goveda i divljač (Madejon i sur., 2002.; Taggart i sur., 2005.). Biljke akumuliraju najviše metala iz tla korjenom, ali neki metali mogu ući u biljku i putem lišća ili mogu biti resorbirani u vegetaciju putem zraka (Schreck i sur., 2012.). I vanjski i unutarnji metali dostupni su preživačima (Yusuf i sur., 2011.). Najvažniji izvor teških metala za preživača je njihova hranidba. Dnevno uzimanje niskih koncentracija metala neće dovesti do akutnog trovanja preživača, ali u slučaju da se oni zadržavaju u organizmu njihove koncentracije mogu rasti tijekom života. U slučaju primanja toksičnih metala kao što su Cd, Pb i As može se očekivati mutagenost, kancerogenost, teratogenost, imunosupresija, loše stanje organizma i smanjena reprodukcija (Alonso i sur., 2002.). Biljke mogu akumulirati olovo iz tla. Najznačajniji put ulaska atmosferskog olova u lanac ishrane je direktnom kontaminacijom biljaka. To ovisi o stupnju atmosferske kontaminacije, u konačnici kontaminirani zrak može povećati koncentraciju olova u tlu, što s vremenom može rezultirati povećanim usvajanjem olova u biljke (AQGE, 2000.). Koncentracija olova u uzorcima listinca i prizemne flore tijekom prve godine istraživanja iznosila je 0,54 mg/kg i 0,28 mg/kg. Koncentracija olova tijekom druge godine istraživanja bila je veća u prizemnoj flori u odnosu na prvu godinu istraživanja. Naše koncentracije bile su slične koncentracijama olova u biljkama i njihovim dijelovima koje su zabilježili Kowalski i sur. (1990) i Kulizhskiy i sur. (2014). Koncentracija kadmija u hrani povezana je s koncentracijom u tlu. Koncentracija kadmija u biljkama rijetko je viša od 0,2 mg/kg. Neke biljke, kao i lišće sposobne su akumulirati veće količine kadmija. Količine koje mogu primiti životinje su male (0,03% do 5% od ukupne količine kadmija), a njihova sposobnost resorpcije ovisi o različitim čimbenicima kao što su sadržaj kalcija, bjelančevina i vitamina D. Nedostatak tih čimbenika može povećati resorpciju kadmija. Unutarnji organi sisavaca kao što su jetra i bubrezi mogu također sadržavati visoke koncentracije kadmija (Da Silva i sur., 2005.). Koncentracija kadmija u biljkama od 0,48 mg/kg koju su zabilježili

Kulizhskiy i sur. (2014) bila je veća od naših koncentracija u listincu i prizemnoj flori tijekom dvije godine istraživanja (0,20 i 0,10 mg/kg; 0,38 i 0,31 mg/kg), ali te koncentracije bile su veće od 0,06 mg/kg koju su zabilježili Kowalski i sur. (1990). Koncentracija kadmija u sastavu prizemne flore tijekom druge godine istraživanja bila je statistički značajno veća u odnosu na prvu godinu istraživanja. Kada se proučava toksičnost elemenata u tragovima, kao što je arsen, kod biljaka, biljnih kultura ili usjeva obično se koriste ciljane biljne vrste, a rijetko šumske biljke. U našim uzorcima u sastavu prizemne flore utvrđene su statistički značajno manje koncentracije arsena tijekom druge godine istraživanja. Razlog niskih koncentracija može biti zbog toga što biljke arsen usvajaju u većoj mjeri putem korijena (Wolterbeek i van der Meer, 2002.) i prije ćemo ga pronaći u korijenu biljke, nego u mladicama. Primjerice, više od 15 puta veća koncentracija arsena pronađena je u korjenju kod jedne vrste trave (Rofkar i Dwyer, 2011.) i 28 do 75 puta veća koncentracija u korijenju riže (Azizur, 2007.). Poznato je da su biljke uglavnom neosjetljive na negativne utjecaje živinih spojeva, no živa utječe na fotosintezu i oksidativni metabolizam uplitanjem u transport elektrona u kloroplastima i mitohondriju. Živa također inhibira aktivnost akvaporina i smanjuje usvajanje vode u biljku (Sas-Nowosielska i sur., 2008.). Rizici za životinje nastaju prilikom unosa organskih oblika žive koji su prisutni u biljkama (Wang i sur., 2011.). Koncentracije žive u našim uzorcima listinca i prizemne flore bile su statistički značajno manje tijekom druge godine istraživanja. Metabolička funkcija željeza u zelenim biljkama dobro je poznata. Željezo se smatra ključnim metalom u energetske transformacijama za sintezu i ostale životne procese stanica. Odgovarajući sadržaj željeza u biljkama je bitan za zdravlje biljaka i za opskrbu životinja hranjivim tvarima. Razlike među biljkama u njihovoj sposobnosti usvajanja željeza su značajne i usvajanje željeza ovisi o klimi, tlu, biljnoj vrsti i genotipu kao i fenofazi rasta u kojoj se biljka nalazi. Poznato je da mahunarke usvajaju puno više željeza od trava, međutim gdje je željezo lako topivo biljke mogu akumulirati vrlo velike količine željeza. To pokazuju analize gdje je utvrđena koncentracija željeza u travama bila u rasponu od 2 127 do 3 580 mg/kg. Sadržaj željeza u krmnom bilju obično se kreće od 18 do 1000 ppm, a poznato je da je preživačima potrebno 50 do 100 mg/kg željeza u krmivima (Kabata-Pendias i Pendias, 1992.). Koncentracija željeza u listincu i prizemnoj flori u našim uzorcima bila je 149,52 mg/kg i 168,75 mg/kg tijekom prve godine, te 144,80 mg/kg i 190,72 mg/kg tijekom druge godine istraživanja, to je znatno manje od koncentracije od 201,40 mg/kg kojega su u biljkama zabilježili Canty i sur. (2011).

Selen nije klasificiran kao esencijalan element za biljke iako ima korisnu ulogu i u biljkama se može akumulirati u velikim količinama (Shanker, 2006.). Dokazano je da djeluje

kao antioksidans i inhibitor lipidne peroksidaze u koncentracijama od 0,1 do 1 mg/kg (Hartikainen i sur., 2000.). Koncentracija selena od 0,04 mg/kg u biljkama koje su zabilježili Canty i sur. (2011) odgovara našim koncentracijama u lisincu tijekom dvije godine istraživanja (0,06 mg/kg i 0,04 mg/kg), dok je razina selena u sastavu prizemne flore tijekom prve godine istraživanja bila veća i iznosila je 0,17 mg/kg. Usvajanje i akumulacija selena u biljkama određeni su kemijskim oblikom i koncentracijom, čimbenicima u tlu kao što su pH, salinitet i sadržaj CaCO<sub>3</sub>, kao i o sposobnosti biljke da usvoji i metabolizira selen (Kabata-Pendias, 2001.).

Krmiva za prihranu također su potencijalni izvor teških metala. Poljoprivredna proizvodnja doprinosi akumulaciji teških metala u površinskim slojevima poljoprivrednih tala primjenom različitih agrotehničkih mjera: gnojidbom mineralnim gnojivima (prirodni minerali, pojedinačna i složena gnojiva), gnojidba organskim gnojivima (stajska gnojiva, komposti, organski ostaci), kondicioniranje tala (kanalizacija, zakiseljavanje, poboljšivači teksture), aplikacija pesticida i navodnjavanje i fertigacija (Lončarić i sur., 2012.). Biljke ih putem korijena i lista usvajaju i predstavljaju opasnost za životinje koje se njima hrane. Akumulacija teških metala u biljkama ovisi o biljnim vrstama. Koliko će teških metala biljka usvojiti ovisi o čimbenicima mobilnosti, usvajanja i transporta koji uključuju teške metale, tlo i biljke (Rattan i sur., 2005.). Koncentracija svih teških metala bila je u rasponu ispod maksimalnih vrijednosti propisanih Pravilnikom o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja (NN 9/2014). U našem istraživanju utvrđene su niže koncentracije Pb od koncentracija koje su zabilježili Lavado i sur. (2001) u zrnima kukuruza (0,80 mg/kg), soje (0,85 mg/kg) i pšenice (0,74 mg/kg). Veliku ulogu u metabolizmu životinja imaju i elementi u tragovima (poput Fe i Se) koji u organizam uglavnom ulaze kao komponente animalne hranidbe. U našem istraživanju tijekom druge godine istraživanja koncentracije Fe i Se (415,13 mg/kg i 3,11 mg/kg) bile su veće u odnosu na prvu godinu. To je zbog toga što se tijekom druge godine istraživanja u prihrani jelena lopatara koristila gotova krmna smjesa koja je imala pojačani udio selena od 0,5 mg/kg. Razina resorpcije ili zadržavanja mikroelemenata modulirana je njihovim stvarnim razinama u tkivima i njihovim koncentracijama u hranidbi (Cao i sur., 2000.).

#### 4.2. Teški metali i esencijalni elementi u tkivima jelena lopatara

Divlje životinje u prirodnim ekosustavima posebno su izloženi raznim čimbenicima okoliša, upravo je okoliš glavni čimbenik koji određuje zdravlje, stanje i populaciju divljači. Zbog prekomjernog zagađenja u posljednjih nekoliko godina, teški metali su sve više prisutni u mesu divljači. Primljeni u organizam putem vezanja na enzimske sustave životinjskih stanica ili nekih komponenti stanične membrane, uzrokuju intoksikaciju i u određenim situacijama pokazuju svoj kancerogeni, teratogeni ili embriotoksični potencijal. Poznate su interakcije esencijalnih elemenata sa teškim metalima *in vivo*. Teški metali relativno se lako resorbiraju iz hranidbe. Brzo se akumuliraju u tkivima (mišićima, jetri i bubrezima). Nedostatak esencijalnih elemenata u tjelesnim tekućinama i tkivima životinja uz višak teških metala narušava homeostazu i dovodi do brojnih poremećaja. Koncentracija teških metala u tkivima divljači dobar je pokazatelj onečišćenja okoliša. Koncentracije teških metala i esencijalnih elemenata u divljači važan je pokazatelj kvalitete mesa divljači.

Olovo u organizam ulazi raznim putevima, uključujući udisanje prašine, te primanje putem hrane i vode (Beyer i sur., 2007.; Ma, 2011.). Nakon resorpcije, olovo se distribuira putem krvotoka i obično se vrlo sporo izlučuje fecesom i urinom (Skerfving i Bergdahl, 2007.). Najveći dio resorbiranog olova lokalizirano je u kosturu, koji sadrži više od 90% ukupnog olova koje se nalazi u organizmu. To je zbog toga što olovo interferira s kalcijem. Tom činjenicom može se objasniti veća koncentracija olova u svim tkivima (osim slezene) kod mladih jelena lopatara tijekom prve godine našeg istraživanja, naime kod mlađih životinja stupanj resorpcije olova iz probavnog sustava veći je nego u odraslih jedinki zbog toga što je njima potrebno više minerala (prvenstveno kalcija) za intenzivan rast, pa se u tom procesu resorbira i veća količina olova. Slične rezultate ustanovili su Srebočan i sur. (2011) u mišićima srneće divljači (mladi 0,05 mg/kg, odrasli 0,02 mg/kg) iz područja nizinske Hrvatske i Falandysz i sur. (2005) u mišićima (mladi 0,24 mg/kg, odrasli 0,21 mg/kg) i jetri (mladi 0,33 mg/kg, odrasli 0,24 mg/kg) jelena običnog iz dva područja Poljske. Kada se govori o mekim tkivima, jetra i bubrezi sadrže najveće koncentracije olova iako je ono prisutno u većini tkiva u organizmu uključujući i mišiće (Rudy, 2009.; Thompson, 2012.). Zbog takve široke distribucije u organizmu, olovo može dovesti do različitih toksičnih učinaka. Kod goveda, olovo dovodi do promjene u hematološkom, reproduktivnom, imunološkom, krvožilnom, uropoetskom i živčanom sustavu. Izaziva poremećaj metabolizma minerala u tragovima (osobito u metabolizmu kalcija), te u ponašanju (Sharpe i Livesey, 2005.; Ma, 2011.; Thompson, 2012.). Koncentracija olova tijekom prve godine našeg

istraživanja u bubregu (0,27 mg/kg) bila je manja od koncentracija koje su ustanovili Bilandžić i sur. (2009) iz četiri područja Hrvatske u jelena običnog (2,28; 2,54; 1,33 i 1,04 mg/kg), dok je u mišiću koncentracija u našem istraživanju bila veća (0,44 mg/kg) od koncentracija u njihovom istraživanju (0,04; 0,01; 0,07 i 0,03 mg/kg). Podaci o koncentraciji olova u slezeni i masnom tkivu jelena lopatara i općenito preživača malo su poznati. Upravo su u tim tkivima u našem istraživanju zabilježene najveće koncentracije olova tijekom prve godine istraživanja (0,69 mg/kg u masnom tkivu i 2,14 mg/kg u slezeni). Koncentracija olova u masnom tkivu bila je dvostruko veća od koncentracije koju su ustanovili Caggiano i sur. (2005) u masnom tkivu ovaca (0,31 µg/g). Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani NN (154/08) dopuštene koncentracije olova u jetri i bubregu iznosi 0,5 mg/kg, dok je u mišiću dopuštena koncentracija 0,1 mg/kg. Prema tome, tijekom prve godine istraživanja koncentracija olova u mišićima naših jelena lopatara bila je iznad dopuštene, dok su koncentracije u jetri i bubrezima bile u razini dozvoljenog. Tijekom druge godine istraživanja provela se dopunska hranidba uz dodatak selena (0,5 mg/kg) u trajanju od 60 dana kako bi se vidjelo može li selen smanjiti koncentraciju teških metala u tkivima jelena lopatara. Istraživanja su pokazala da visoke koncentracije selena u plazmi smanjuju toksičnost olova (Nehru i Dua, 1997.; Xie i sur., 1998.). Iako temeljni mehanizam za takav učinak selena nije u potpunosti jasan, neka istraživanja ukazuju da se selen veže s toksičnim metalima i smanjuje ili uklanja njihov učinak (Peraza i sur., 1998.; Xie i sur., 1998.). Antioksidativnost selena također može biti važan čimbenik koji smanjuje toksičnost olova (Stadtman, 2002.). Koncentracije olova u tkivima naših jelena lopatara bile su manje nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena u odnosu na prvu godinu istraživanja. Statistički značajno manja koncentracija olova utvrđena je u masnom tkivu i slezeni, to je upravo u onim tkivima gdje se utvrdila najveća koncentracija olova tijekom prve godine našeg istraživanja. U istraživanju koje su proveli Wang i sur. (2013) na štakorima, pokazano je da tretman selenom značajno može smanjiti koncentraciju olova u krvi, što pokazuje da selen može promicati izlučivanje olova. To je dokaz da selen ima snažnu tendenciju stvaranja kompleksa s teškim metalima. Također treba naglasiti da selen, u slučaju vezanja s teškim metalima pokazuje smanjenu biološku aktivnost. Iako je u sastavu prizemne flore tijekom druge godine našeg istraživanja bila veća koncentracija olova to nije utjecalo na povećanje koncentracije olova u tkivima. Razlog tome je manja bioraspoloživost olova kroz hranidbeni lanac jer su količine olova koje uđu u biljku iz tla vrlo niske, što nije slučaj s kadmijem.

Primarno primanje kadmija iz tla putem biljaka i sekundarno primanje putem hrane kod životinja objašnjenje je zašto su koncentracije kadmija kod preživača veće. Kod životinja

kadmij nije lako eliminirati iz stanica, slaba učinkovitost staničnog izlučivanja objašnjava dugo zadržavanje u tkivima kao što su jetra i bubrezi. Upravo zbog toga koncentracija kadmija je u jetri i bubrežima starijih životinja veća. Ova pojava očitovala se i u našem istraživanju gdje je najveća koncentracija kadmija tijekom prve godine istraživanja bila upravo u bubrežima i jetri odraslih jelena lopatara (3,24 mg/kg i 0,12 mg/kg). Takve rezultate zabilježili su i Falandysz i sur. (2005) u bubregu (mladi 0,61 mg/kg, odrasli 2,7 mg/kg) i jetri (mladi 0,09 mg/kg, odrasli 0,23 mg/kg) jelena običnog i Parker i Hamr (2001) u bubregu (mladi 5,67 mg/kg, odrasli 24,64 mg/kg) i jetri (mladi 1,10 mg/kg, odrasli 2,44 mg/kg) losa. Najveća koncentracija kadmija u bubregu, bez obzira na dob, posljedica je specifičnog afiniteta ovog metala za bubreg, gdje on dolazi posredno iz jetre, ali i krvi te se vrlo sporo izlučuje iz bubrega. Koncentracije Cd u bubregu tijekom prve godine istraživanja (2,43 mg/kg) i jetri (0,19 mg/kg) bili su znatno veće od koncentracija koje su utvrdili Karmarova i sur. (2005) u bubregu i jetri jelena lopatara (0,35 mg/kg i 0,06 mg/kg). Iako se zakonom dopuštene koncentracije primarno odnose na domaće životinje, možemo ih primijeniti i na divljač. Dopuštena koncentracija kadmija u bubregu iznosi 1,0 mg/kg, a u jetri 0,5 mg/kg. Tijekom prve godine istraživanja u našim uzorcima bubrega razina kadmija bila je iznad dopuštene. Postoji realna mogućnost da se kroz duže vremensko razdoblje prime u organizam značajne količine kadmija. Upravo zbog toga u nekim zemljama se preporuča da se unutarnji organi jelenske divljači smatraju nejestivim za ljude, upravo zbog povišenih koncentracija kadmija. Poznato je da mnogi toksični učinci kadmija nastaju zbog njegova djelovanja s esencijalnim elementima. Pretpostavka je da kadmij za ulazak u stanicu rabi transportne sustave esencijalnih elemenata (Himeno i sur., 2009.) i tako smanjuje njihovu resorpciju (Peraza i sur., 1998.). Proučavanjem međudjelovanja selena i kadmija, uglavnom na glodavcima, i utjecaju selena na smanjenje toksičnih učinaka kadmija došlo se do saznanja o promjenama toksokinetike i toksodinamike kadmija. Pretpostavlja se da se međudjelovanje zbiva na dvije razine. Prvo se stvara kompleks selena i kadmija koji se zatim metabolizira na drukčiji način od svakog pojedinog elementa i utječe na udjele kadmija u tkivima, dok na drugoj razini selen djeluje kao antioksidans smanjujući oksidativni stres uzrokovan od strane kadmija (Santos i sur., 2005.; Newairy i sur., 2007.). U našem istraživanju nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena došlo je do smanjenja koncentracije kadmija u trima tkivima, bubregu (1,86 mg/kg), masnom tkivu (0,02 mg/kg) i slezeni (0,01 mg/kg). Smanjene koncentracije kadmija u bubregu u uvjetima peroralne suplementacije selenom, uz izlaganje kadmiju pronađene su kod sisajućih štakora u istraživanju koje su proveli Lazarus i sur. (2009). Kod naših jelena lopatara u jetri nisu pronađene niže koncentracije nakon dopunske

hranidbe uz dodatak selena. U istraživanjima gdje nije primjećen učinak selena na razinu kadmija u jetri, životinje su bile izlagane tijekom više tjedana hranom i/ili vodom dozama selena od 0,1 mg/kg do 3 mg/kg hrane ili vode i dozama kadmija od 0,006 mg/kg do 200 mg/kg (Flegal i sur., 1980.; Chavez, 1981; Andersen i Nilsen, 1994.; Jihen i sur., 2008.). To je pokazatelj da veliku ulogu ima i dužina primjene Se i Cd tijekom kroničnih, subkroničnih i akutnih izlaganja, prema tome rezultati se razlikuju prema učinku selena na distribuciju kadmija u unutrašnjim organima. U istraživanju Chmielnicka i sur. (1983) nakon dva tjedna peroralnog davanja selena (0,1 mg/kg na dan) i subkutane primjene kadmija (0,3 mg/kg na dan) u štakora, utvrđeno je povećanje Se u topljivoj frakciji jetre, povećanja u bubregu, ali bez utjecaja na unutarstaničnu raspodjelu selena.

Karakteristika arsena je da se bioakumulira u vodenim organizmima, no njegova koncentracija ne raste prema vrhu hranibenog lanca. Resorbira se iz probavnog sustava, a više od 90% brzo nestaje iz krvi i izlučuje se u roku od 48 sati. To znači da se s vremenom ne nakuplja značajno u organizmu. Upravo zbog toga razine arsena u tkivima naših jelena lopatara bile su niske (mišić 0,01 mg/kg, bubreg 0,02 mg/kg, jetra 0,01 mg/kg, masno tkivo 0,01 mg/kg, slezena 0,01 mg/kg). Slične vrijednosti u bubregu srneće divljači zabilježili su Findo i sur. (1993) na području Slovačke (0,01 mg/kg), i Kocan i sur. (1980) u bubregu jelena bjelorepana (0,18 mg/kg) na području Oklahome. Na području Slovenije Tomšič (1986) je utvrdio u bubregu srneće divljači nešto veće koncentracije arsena (0,08 mg/kg). Selen može imati važnu ulogu u smanjenju znakova toksičnosti arsena (Gailer i sur., 2000.; Sah i Smith, 2012.). U našem istraživanju nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena statistički značajno manje koncentracije arsena utvrđene su u bubregu, masnom tkivu i slezeni jelena lopatara. Selen je antagonist arsena, te zato ima mogućnost smanjenja toksičnih učinaka arsena. Iz eksperimentalnog rada na zečevima, utvrđeno je da se selen suprotstavlja koncentracijama arsena u krvi stvaranjem netoksičnih konjugata u jetri i žuči (Gailer i sur., 2000). Higijenska ispravnost istraživanih tkiva, što se tiče arsena je neupitna, jer su utvrđene koncentracije ispod maksimalno dozvoljenih (0,1 mg/kg za mišić, 0,5 mg/kg za bubreg i 0,5 mg/kg za jetru).

U suštini sva životinjska tkiva sadrže niske koncentracije žive. To je uobičajeno za kopnene životinje, dok je u vodenim životinja, pogotovo morskih, stanje obrnuto zbog poznate metilacije žive i njezine biomagnifikacije. Općenito, koncentracije žive u analiziranim tkivima jelena lopatara bile su niske. Slične vrijednosti u mišićima, bubrezima i jetri zabilježili su Findo i sur. (1993), Falandysz i sur. (1994) i Lazarus i sur. (2008) u jelena običnog. Putevi primanja žive kod sisavaca su udisanjem i gutanjem (WHO, 1989.). Upravo zbog načina primanja, niske koncentracije žive kod naših jelena lopatara pokazatelj su niske razine



zagađenja živom u okolišu. Općenito je koncentracija žive kod preživača manja (Drasch i sur., 2004.), to je zbog toga što se živa obično veže na čestice tla koje mogu smanjiti dostupnost žive biljkama, posebno u prisutnosti sedimenta ili velike količine organske tvari. Nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena došlo je do smanjenja koncentracije žive u bubregu i masnom tkivu. Studije su pokazale vezanje kompleksa živa-selen, srebro-selen i kadmij-selen putem selenoproteina P u plazmi (Yoneda i Suzuki, 1997.; Sasakura i Suzuki, 1998.), što znači da taj protein djeluje na kelate teških metala smanjujući tako njihovu toksičnost.

Minerali su potrebni za većinu fizioloških procesa u organizmu. Moraju biti dobiveni hranidbom jer se ne mogu sintetizirati (McDowell, 2003.). Uravnotežena mineralna hranidba potrebna je za adekvatan rast, reprodukciju i zdravlje. To je složen proces koji je proučavan većinom kod domaćih životinja dok je kod divljači slabo istražen. Željezo je nosač kisika, ima veliku ulogu u oslobađanju energije fermentativnim reakcijama, imunitetu i metabolizmu kolesterola. Najveća koncentracija željeza nalazi se u jetri, slezeni i koštanoj srži. Dodatno željezo koje nije odmah potrebno za stvaranje novih krvnih stanica pohranjuje se u najvećoj mjeri u slezeni. U našem istraživanju tijekom prve godine u slezeni je utvrđena najveća koncentracija željeza (424,80 mg/kg) što je pokazatelj da su naši jelena lopatari hranom unosili velike količine željeza koje se pohranjivalo. Malo je dostupnih podataka o koncentracijama željeza u jetri jelena lopatara. Koncentracija od 91,24 mg/kg manja je od one koju je zabilježio Vengušt (2004), a veća od koncentracije koje su zabilježili Morse i sur. (2009). O još manjim koncentracijama kod jelena običnog (40 mg/kg) i srneće divljači (50 mg/kg) izvjestili su Falandysz i sur. (1994). Dok je Puls (1994) izvjestio o koncentracijama željeza u jetri koje su se kretale sve do 1 500 mg/kg. Prema tome, može se zaključiti da je opskrbljenost željezom u naših jelena lopatara bila normalna. Nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena u našem istraživanju zabilježene su manje koncentracije željeza u svim istraživanim tkivima. Podaci o takvom utjecaju selena na željezo u tkivima divljači nisu dostupni. Istraživanje koje je proveo Bik (1998) o interakcijama između selena i željeza u serumu ovaca, gdje su ovce tretirane sa selenom pokazalo je da nije bio značajnog učinka injekcije selena na koncentracije željeza u serumu ovaca i da nije došlo do značajnih promjena. Nauprot tome, Danch i sur. (1991) izvjestili su o značajnom povećanju u koncentracijama željeza u plazmi štakora nakon što su bili izlagani koncentracijama selena od 2 µg/kg u periodu od tri mjeseca. Nepovoljan učinak selena na koncentracije željeza u tkivima u našem istraživanju može biti posljedica indukcije metalotioneina ili načina preraspodjele željeza između tkiva i stanica. Iako je distribucija Fe u tkivima i krvi bila u fiziološkim

granicama, u slučaju povećane koncentracije Se u hrani koncentracija Fe bila je manja. Poznato je da deficit esencijalnih elemenata povećava toksičnost teških metala dok njihov višak djeluje zaštitno. Koncentracije Cd i Pb u organizmu možda nisu bile toliko visoke zahvaljujući zadovoljavajućoj opskrbi Fe jer u slučaju dovoljne opskrbe Fe smanjena je gastrointestinalna resorpcija Cd (Goyer, 1995.).

Bioraspoloživost selena ovisi o kemijskom obliku, što također utječe na raspodjelu selena u organizmu. Selenometionin se u većoj mjeri zadržava u bjelančevinama tkiva od selenocisteina i anorganskih oblika, ali selen nije odmah nužno dostupan funkcionalnim selenoproteinima. Osim kemijskog oblika i brojni drugi čimbenici kao što su hranidbene komponente obroka, status selena u organizmu i fiziološko stanje mogu utjecati na bioraspoloživost i dostupnost selena (Thomson, 1998.). U našem istraživanju tijekom prve godine utvrđene su značajno veće koncentracije selena u mišiću, bubregu i jetri odraslih jelena lopatara. Te su koncentracije bile manje od onih koje su zabilježili Lazarus i sur. (2008) u mišiću (0,05:0,53  $\mu\text{g/g}$ ) i bubregu (0,79:1,89  $\mu\text{g/g}$ ) i jetri (0,15:0,24  $\mu\text{g/g}$ ). Koncentracije u jetri kod naših jelena lopatara bile su izrazito niske. Referentni raspon koncentracije selena u jetri je od 0,25 do 1,5 mg Se/kg jetre (Puls, 1994.). U istraživanju koje su proveli Humann-Ziehank i sur. (2008) kod srneće divljači koncentracije selena u jetri bile su veće od naših (0,21 mg/kg i 0,27 mg/kg), ali se i one smatraju niskima. Posljedica niskih koncentracija selena u tkivima je vjerojatno zbog niske razine selena u biljnim krmivima koja su glavni izvor hranidbe kod preživača. To možemo objasniti činjenicom da je crijevna resorpcija selena u preživača manja nego kod monogastričnih životinja, što je povezano s redukcijom selenita iz krmiva u netopljive forme. Pretpostavka je da bakterije u probavi preživača reduciraju selen u netopljive i neodgovarajuće oblike (Underwood, 1977.). Iako su koncentracije selena u tkivima naših jelena lopatara niske, životinje su sigurne u smislu deficita selena, jer deficit selena nastupa kada je koncentracija selena u krvi manja od 0,05 ppm. Za različite metaboličke funkcije kod većine preživača potrebno je 0,10 mg/kg (Anonymous, 1985.). Niske koncentracije Se u jetri utvrđene su kod jelena običnog u dvijema studijama koje su proveli Froslie i sur. (1984) i Vikoren i sur. (2005). Zbog značajnih metaboličkih procesa postoji stalna potreba za dodatkom selena hrani za životinje i to najčešće u obliku selenita i selenata, s sve češće u anorganskom obliku selena. Anorganski oblici selena (selenit i selenat) apsorbiraju se iz probavnog sustava, nešto više od 50%. Oba oblika dostavljaju se do jetre putem portalne cirkulacije. Frakcije se ekstrahiraju putem hepatocita, a ostatak se odvodi cirkulacijom u različite stanice organizma (Dodig i Čepelak, 2004.). Koncentracije selena u stočnoj hrani od 0,1 mg/kg do 0,5 mg/kg u suhoj tvari

prihvaćene su kao sigurne u smislu moguće toksičnosti selena. Simptomi kroničnih i akutnih trovanja opisane su kod koncentracije od 2 mg/kg do 5 mg/kg (Edmondson i sur., 1993.). Tijekom druge godine istraživanja naše jelene lopatare prihranjivalo se gotovom krmnom smjesom koja je sadržavala 0,5 mg/kg selena u trajanju od 60 dana. Cilj je prvenstveno bio da se takvom vrstom prihrane smanji koncentracija teških metala u ispitanim tkivima. Nakon dopunske prihrane razina selena u drugoj godini istraživanja bila je statistički značajno veća u bubregu, dok je u mišiću, jetri i slezeni koncentracija bila veća, ali ne i statistički značajna. U masnom tkivu utvrđena je manja koncentracija nego tijekom prve godine istraživanja. Takvu vrstu pokusa na divljači nismo pronašli. U literaturi postoje podaci o pokusima koji su većinom na domaćim životinjama gdje se provodi dopunska hranidba selenom kako bi se vidio učinak na zdravlje, antioksidaciju i razinu selena u krvi, ali nema podataka o proučavanju učinka selena na smanjenje koncentracije teških metala uz njegovu istovremenu akumulaciju u tkivima.

#### **4.3. Imunohematološki i biokemijski pokazatelji u jelena lopatara**

Znanje o sastavu krvi važno je za procjenu zdravstvenog stanja i populacije jelenske divljači (Fowler i Miller, 2003.). Različiti autori otkrili su razlike u vrijednostima ispitanih pokazatelja u krvi jelena. To se može pripisati uvjetima uzgoja, načinima upravljanja i tehnikama uzorkovanja, odnosno svemu onomu za što je dokazano da utječe stresno na jelene (Mattews i Cook, 1991.). Te razlike također mogu biti zbog mnogo drugih razloga, uključujući genetiku, stanište, prehranbene i fiziološke učinke, kao i različite načine uzorkovanja krvi (Chapman, 1977.; Asher i sur., 1989.). U literaturi postoje podaci koji se odnose na krvne parametre jelena lopatara uslijed drugačijih tehnika uzorkovanja, kao što su kemijska imobilizacija (Peinado i sur., 1999.; Poljičak-Milas i sur., 2004.), tjelesno ograničenje (Rehbein i sur., 1999.) ili nakon odstrijela (Chapman i sur., 1980.; Vengušt i sur., 2002.). Malo je dostupnih informacija o normalnim krvnim vrijednostima jelena lopatara nakon odstrijela. Kada promatramo imunohematološke pokazatelje tijekom dvije godine istraživanja kod mladih i odraslih jelena lopatara nije bilo statističkih značajnosti među dvjema dobnim skupinama. Tijekom našeg dvogodišnjeg istraživanja, procjena hematoloških pokazatelja u jelena lopatara pokazala je povećane prosječne vrijednosti eritrocita, hemoglobina i hematokrita u odnosu na referentne vrijednosti u goveda (RBC =  $5,0\text{--}10,0 \times 10^{12}/\text{L}$ ; HGB = 80–150 g/L; HCT = 0,24–0,46 L/L; Radostis i sur., 2000.). To može biti

posljedica stresa tijekom hvatanja, otpora ili odstrijela životinje, kako su izvjestili Cimbal i sur. (1990). Uočene promjene također mogu biti posljedica kontrakcije slezene zbog otpuštanja kateholamina tijekom fizičkog otpora (Hartwig i Hartwig, 1985.). Koncentracije krvnih vrijednosti u našem istraživanju u referentnom su rasponu koji je utvrđen u jelena običnog (Woodbury, 2002.). Kateholamini mogu uzrokovati prolaznu leukocitozu s neutrofilijom, monocitozu i limfocitozu, prebacivanjem stanica iz skladišnih bazena u cirkulaciju (Jain, 1993.). U našem istraživanju vrijednosti WBC, RBC, HGB, MCV bile su veće, dok su vrijednosti MCH i MCHC bile manje od vrijednosti u odstrijeljenih jelena lopatara koje su utvrdili Vengušt i sur. (2002). Jeleni su vrsta koja se lako uzbuđi, što se često vidi u hematološkim pokazateljima, odnosno visokim vrijednostima eritrocita. Kod uzbuđenih jelena vrijednosti su značajno veće, u odnosu na jelene koji odmaraju, a upravo to je rezultat kontrakcija slezene (Thorn, 2000.). U krvnim razmazima proučavali smo diferencijalnu krvnu sliku. U diferencijalnoj krvnoj slici jelena lopatara utvrdili smo povećani broj segmentiranih (41,73%) i nesegmentiranih neutrofila (5,73%) i monocita (2,09%), te smanjeni broj eozinofila (0,45%), bazofila (0,01%) i limfocita (50,00%) tijekom prve godine istraživanja i povećani broj eozinofila (3,5%) i limfocita (57,00%) tijekom druge godine istraživanja u odnosu na istraživanje koje su proveli Vengušt i sur. (2000). Limfocitoza je karakteristična za jelene, ali visoki broj limfocita može biti znakom kronične upale ili reaktivnog odgovora limfocita na izgled zdravih životinja. Eozinofiliju tumačimo prisustvom crijevnih nametnika (Nemi, 1993.). Iako blizu graničnih vrijednosti, naši jelena lopatari nisu imali poremećaj u vidu limfocitoze i eozinofilije iako je vrlo teško tumačiti razlike između dobnih skupina za broj eozinofila. Eozinofilija može biti posljedica tjelesnog i emocionalnog stresa, što je opisano kod laboratorijskih životinja, ali se može pripisati i drugim faktorima kao što je djelovanje endoparazita (Jain, 1993.). Dopunska hranidba uz dodatak selena tijekom druge godine istraživanja nije statistički značajno utjecala na imunoematološke pokazatelje kod jelena lopatara.

Poznavanje normalnih biokemijskih vrijednosti u serumu važno je za procjenu štete u organima i tkivima kod različitih bolesti i za procjenu stanja organizma (Steinhardt i Thilescher, 2000.). Kao i za imunoematološke pokazatelje i za biokemijske pokazatelje ima malo dostupnih podataka u jelena lopatara. Koncentracija glukoze u našem istraživanju bila je veća od rezultata drugih autora kod jelena lopatara (Vengušt i Bidovec, 2002.; Poljičak-Milas i sur., 2004.; Vengušt i sur., 2006.) što govori o dobroj energetskej opskrbljenosti. Visoka koncentracija glukoze u krvi povezana je s temperamentnošću životinje, pogotovo kada je upotrebljen fizički otpor (Nimitsuntiwong i sur., 2000). Stres aktivira simpatički živčani

sustav i nuzbubrežnu žlijezdu, to uzrokuje oslobađanje kateholamina, adrenalina i noradrenalina u krvotok, što dovodi do povećanja opskrbe glukozom i ubrzanja razgradnje glikogena u jetri (Vellucci, 1997.). Koncentracija ureje u našem istraživanju slaže se s koncentracijama kod jelena lopatara (Vengušt i sur., 2006.) i srneće divljači (Žele i Vengušt, 2012.), a nešto je manja od koncentracije kod jelena običnog (Poljičak-Milas i sur., 2006.). Koncentracija albumina odgovara koncentraciji kod jelena lopatara koju su utvrdili Vengušt i sur. (2006), a nešto je veća od koncentracije kod jelena običnog (Rafaj i sur., 2011.). Kolesterol je strogo reguliran i pokazuje samo blage godišnje varijacije koje su povezane s hranidbenim promjenama (Bartley, 1980.). Koncentracija kolesterola statistički je značajno veća kod mladih jelena lopatara tijekom dvije godine istraživanja. Kolesterol, kao sastavnica stanične membrane, integrirana je u morfološku i staničnu strukturu mišića (Hoelscher i sur., 1988.; Horgan i Kuypers, 1988.). Odgovarajuća razina kolesterola u krvi neophodna je za postizanje maksimalne težine u uzgoju životinja. Statistički značajno veća kod mladih jelena lopatara bila je razina HDL-a (1,83 mmol/L i 1,50 mmol/L) tijekom dvije godine istraživanja i LDL-a tijekom prve godine istraživanja (0,60 mmol/L). Vrijednosti Fe od 20  $\mu$ mol/L do 35  $\mu$ mol/L u serumu karakteristične su za jelene lopatare (Kolb i sur., 1995.). Naše vrijednosti su u skladu s tom tvrdnjom. Efikasnost resorbiranog željeza ovisi o potrebi organizma, a važno je za sintezu hemoglobina. U tom rasponu bila je i koncentracija Fe kod srneće divljači (Vengušt i sur., 2006.). Dopunska hranidba uz dodatak selena nije imala utjecaj ni na biokemijske pokazatelje u jelena lopatara.

Koncentracija ukupnih proteina i globulina u serumu jelena lopatara bila je statistički značajna među dobnim skupinama. Značajno veća koncentracija utvrđena je u odraslih jelena lopatara i to za ukupne proteina tijekom druge godine istraživanja i za globuline tijekom obje godine istraživanja. Utvrđene koncentracije bile su u granicama referentnog raspona (ukupni proteini = 56,03–69,68 g/L; globulini = 28,84–39,40 g/L) koji je određen u plazmi jelena običnog (Kučer i sur., 2013.). Obično telad ima nižu koncentraciju ukupnih proteina nego odrasla životinja (Kraft i Durr, 1999.). O najnižoj koncentraciji ukupnih proteina (43 g/L) u krvi uzetoj iz srca odstrijeljene životinje izvestili su Pav i sur. (1975.).

U perifernoj cirkulaciji najzastupljeniji su imunoglobulini IgG klase koji štite od virusa, bakterija ili parazitskih infekcija. Povezivanje IgG s antigenom znakom je pokrenute imunosne reakcije, aktiviraju se imune stanice i usmjeravaju se na željeno mjesto u tkivu. Samo je jedan tip Fc receptora poznat (FcRn) i on je izražen u epitelnim stanicama. On prenosi IgG kroz različite epitelne barijere, a kod nekih vrsta sudjeluje u prijenosu IgG kod novorođenčadi. FcRn je heterodimer koji se sastoji od  $\alpha$ -lanca i  $\beta$ -2 mikroglobulina. U

epitelnim stanicama prenosi IgG, dok u endotelnim stanicama ima ulogu u homeostazi IgG (Bender, 2009.). Kod preživača protutijela u kolostrumu pružaju pasivni imunitet koji štiti mladunče od infekcije prvih mjeseci života, a nakon toga ono je sposobno proizvoditi vlastita protutijela (Sjaastad i sur., 2003.). Nakon što mladunče posiše kolostrum, imunoglobulini dolaze u tanko crijevo, procesom pinocitoze ulaze u epitelne stanice i u njima se resorbira u crijevne kapilare i tako dospijeva u sistemski optjecaj. Količina koja se prenese kolostrumom ovisi o količini kolostruma koju mladunče posiše (Božić, 2006.). Važnost kolostruma proizlazi iz činjenice da sadrži protutijela. Oni obnavljaju i jačaju imunološke funkcije, čime čine pasivnu imunosnu zaštitu. Koncentracija IgG u krvi kod teladi potrebna za zaštitu od infekcije je 10 mg/ml seruma (Wattiaux, 2014.). Najveća koncentracija IgG u kolostrumu je tijekom prvih 48 sati, nakon čega koncentracija opada. Poput ostalih preživača i jelena lopatari vjerojatno vrše intenzivan prijenos imunoglobulina kolostrumom. Koncentracija IgG u serumu tijekom našeg istraživanja bila je statistički značajno veća kod odraslih jelena lopatara. Veća koncentracija protutijela je samo kod mladunčadi u prvih 48 sati života. Nakon toga crijeva više nemogu resorbirati netaknute bjelančevine, a za to vrijeme koncentracija protutijela u mlijeku znatno opada i mladunče samo proizvodi protutijela čija koncentracija sa starosti raste, iz čega možemo zaključiti da su starije životinje imunokompetentnije. Selen kao bitan mikronutrijent za preživače česti je dodatak prihrane. Poznato je da utječe na imunološke funkcije. Poznato je da dodatak 3 mg/kg selena (u obliku Na selenita) u kolostrum poboljšava apsorpciju IgG kod novorođene teladi s deficitom selena (Kamada i sur., 2007.). Hranidba uz dodatak selena povećala je koncentraciju IgG u serumu jelena lopatara, ali ona nije bila statistički značajna. Takve rezultate dobili su Ni i sur. (2014) u istraživanju gdje su proučavali utjecaj različitih izvora selena kao dodataka hrani i njihov utjecaj na antioksidaciju i imuni status kod krava. Rezultati su pokazali da dodatak selena u hrani nema statistički značajan utjecaj na koncentraciju IgG u krava, međutim Silvestre i sur. (2007) izvjestili su da prihrana selenovim kvascem (0,3 mg/kg) povećava koncentraciju IgG u krava u usporedbi s dodatkom selenita.

#### **4.4. Antioksidativni status u jelena lopatara**

Oksidativni stres uzrokovan je raznim patofiziološkim mehanizmima odnosno povećanom proizvodnjom ROS-a tijekom upalnih procesa. Zaštitni enzimski i neenzimski antioksidativni obrambeni mehanizmi smanjuju oksidativni stres tako što degradiraju ROS.

Glavni unutarstanični antioksidativni enzimi su SOD, CAT i GPx. Oni djeluju u dva koraka. Prvo, SOD pretvara visoko aktivni superoksidni radikal u vodikov peroksid i kisik. Nakon toga, CAT i GPx samostalno pretvaraju vodikov peroksid u vodu i kisik (Sies, 1993.). Glutation (GSH) nije samo kofaktor GPx-a, nego također može djelovati kao izravni deaktivator ROS-a (Meister, 1989.). Na neenzimskoj razini i vitamini (poput vitamina E) i drugi antioksidansi mogu ukloniti slobodne radikale i odgoditi oksidaciju molekula. U našem istraživanju u plazmi i serumu jelena lopatara odredili smo koncentracije SOD, GPx, GSH i vitamina E prije i nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena. Statistički značajno veća aktivnost GPx-a bila je tijekom prve godine istraživanja kod odraslih jelena lopatara. Chin i sur. (2011) izvjestili su da se aktivnost GPx-a povećava s dobi, dok je u istraživanju na miševima pokazano da aktivnost GPx-a opada s dobi (Aliahmat i sur., 2012.). Takvi različiti rezultati vezani uz dob i antioksidacijsku aktivnost mogu biti posljedica metodologije, okoliša i različitih varijacija kod ljudi i životinja, ali i stanja zaliha selena u organizmu kao i izloženosti selenu (Inal i sur., 2001.). Selen u metabolizmu sisavaca gradivni je dio selenoproteina enzima GPx, koji djeluje kao hvatač peroksida i njegova aktivnost mjera je sposobnosti hvatača radikala da spriječe oštećenja stanice nakon oksidacijskih procesa. U našem istraživanju dodatak selena u prihrani nije značajno djelovao na aktivnost SOD-a, ali je značajno djelovao na aktivnost GPx-a čija se koncentracija statistički značajno povećala tijekom druge godine istraživanja. To je suprotno od rezultata koje su dobili Calamari i sur. (2011), koji su istraživali različite koncentracije i izvore selena. U njihovom istraživanju aktivnost GPx-a kretala se između 243,40 U/L (kontrolna skupina) i 313,60 U/L (pokusna skupina s 0,03 ppm organskog selena), no tretman nije značajno utjecao na povećanje aktivnosti GPx-a. Povećanje aktivnosti GPx-a u našem istraživanju može biti rezultat povećane bioraspoloživosti selena zbog suplementacije jelena lopatara selenom, što izravno djeluje na aktivnost enzima ovisnog o selenu. Glutation peroksidaza dio je glutacion redoks-ciklusa koji uklanja slobodne radikale pa se zato suplementacijom selena poboljšava antioksidativni status organizma.

Glutation je rasprostranjen u različitim staničnim odjeljcima i glavni je topivi antioksidans. Povećanje omjera GSSG/GSH indikativna je odrednica oksidativnog stresa. GSH pokazuje svoj antioksidativni učinak na nekoliko načina. Djelovanje GPx-a detoksicira vodikov peroksid i lipidni peroksid. GSH donira elektron vodikovom peroksidu i reducira ga u kisik i vodu. GSSG ga ponovno reducira u GSH putem GSH reduktaze koja koristi NADPH kao elektron donor. GSH ima ulogu u pretvorbi vitamina C i E u njihove aktivne oblike. On štiti stanice od apoptoze putem interakcije s proapoptotskim i antiapoptotskim signalnim

putevima (Videla i sur., 2003.). Većina GSH prisutna je u citosolu, dok su izvanstanične koncentracije relativno niske (od 2  $\mu\text{M/L}$  do 20  $\mu\text{M/L}$  u plazmi). U našem istraživanju koncentracija GSH u plazmi u navedenom je rasponu. Nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena koncentracija GSH bila je manja, ali ne i statistički značajna. Još jednu osobinu GSH možemo povezati s našim istraživanjem, a to je da GSH ima sposobnost formiranja slabo topljivih merkaptida s ionima teških metala putem svojih –SH grupa. U istraživanju koje su proveli Jovanović i sur. (2012.) o učincima GSH na akumulaciju Cd i Pb i učincima lipidne peroksidacije u jetri i bubrezima kod intoksiciranih štakora pokazalo se da GSH ima zaštitnu ulogu tijekom i nakon intoksikacije kadmijem i olovom. On sadrži slobodnu –SH skupinu koja tvori stabilnu vezu s ionima Cd i Pb čime ih blokira i smanjuje njihove toksične učinke. Što znači da unos hrane bogate GSH-om ili proizvoda slične strukture, može imati preventivni učinak, te značajno smanjiti toksični učinak ovih metala.

Malo je istraživanja o vitaminskim potrebama kod jelena. Vitamini A, D, i E među najvažnijim su vitaminima potrebnim za normalan rast i razvoj jelenske divljači. Vitamin E važan je u sprječavanju oštećenja mišićnog tkiva koji su izloženi fizičkim naporima. Status vitamina E kod naših jelena lopatara bio je veći od referentnom rasponu od 1 do 5 mg/L plazme za domaće preživace (Puls, 1994.). Jukola i sur. (1996) utvrdili su koncentraciju vitamina E u serumu krava od 1,5 mg/L do 15,3 mg/L. Značajan višak vitamina E kod ljudi smatra se kada je koncentracija veća od 40 mg/L. Vitamin E nestabilan je u krmivima i sadržaj ovisi o sezoni i trajanju pohrane. Poznato je da travama u jesen opada koncentracija vitamina E, a zima predstavlja razdoblje nedostatka vitamina E kada se hranidba sastoji od suhog sijena. Visoku koncentraciju vitamina E kod jelena lopatara možemo objasniti činjenicom da je on selektivni preživac. On u svojoj ishrani uzima pupoljke, lišće i svježe trave koje sadrže puno veće koncentracije vitamina E od ostalih krmiva koja su dostupna domaćim preživcima. Naši jeleni lopatari prihranjivani su između ostaloga i sjemenka suncokreta koje su bogate vitaminom E (36,3 mg/100 g). Kod divljih životinja velike su individualne razlike u statusu vitamina E zbog sezonskih varijacija i različitih lokacija na kojima obitavaju. Postoji sinergizam između selena i vitamina E u zaštiti od staničnog oštećenja putem ROS-a (Saito i sur., 2003.). Metabolička funkcija selena povezana je s funkcijom GPx-a u citosolu stanice, dok je vitamin E komponenta lipidne membrane (Surai, 2002.). Istraživanja su pokazala da kombinirani dodatak vitamina E i selena značajno povećava aktivnost GPx-a (Surai i Dvorska, 2002.; Ebeid, 2012.). Iako veća, koncentracija vitamina E nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena nije bila statistički značajna u našem istraživanju. Mnoge studije su izvjestile o antioksidativnom zaštitnom učinku vitamina E



protiv nekoliko metala koji izazivaju hepatotoksičnost, uključujući bakar, olovo, kadmij, narijev fluorid, živu i željezov sulfat (Chinoy i sur., 2004.; Osfor i sur., 2010.; Gaurav i sur., 2010.; Al-Attar, 2011.). U studiji o učinku vitamina E u Cr-induciranoj hepatotoksičnosti pokazan je zaštitni učinak vitamina E na Cr(VI) izazvanu citotoksičnost i peroksidaciju lipida u primarnim kulturama hepatocita štakora (Susa i sur., 1996.). Takvi zaštitni učinci mogu biti povezani s razinama neenzimskih umjesto enzimskih antioksidanata.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Područje istraživanja karakteriziraju kisela tla koja su srednje humozna do humozna, siromašna kalijem i fosforom i osrednje opskrbljena željezom i deficitarna selenom. Utvrđene koncentracije teških metala u tlu bile su niže od maksimalno dopuštenih koncentracija.
2. Povećana koncentracija kadmija i manja koncentracija željeza i seleno od poželjne koncentracije utvrđena je u uzorcima listinca i prizemne flore. Dopunska hranidba jelena lopatara bila je uravnotežena, bogata željezom i selenom.
3. Tijekom prve godine istraživanja najveća koncentracija olova utvrđena je u masnom tkivu i slezeni jelena lopatara. U mišićima je utvrđena koncentracija koja je iznad dopuštene, što znači da takvo meso nije dozvoljeno za ljudsku upotrebu. Nakon dopunske hranidbe uz dodatak seleno značajno je smanjena koncentracija olova u masnom tkivu i slezeni, a koncentracija u mišićima bila je u dopuštenim granicama.
4. Najveća koncentracija kadmija bila je u bubregu tijekom prve godine istraživanja i to iznad dopuštenih granica za ljudsku upotrebu. Dodatak seleno u hrani značajno je smanjio koncentraciju kadmija u bubregu, masnom tkivu i slezeni.
5. Koncentracije arsena i žive bile su niske tijekom prve godine istraživanja, a dodatak seleno značajno je snizio koncentracije arsena u bubregu, masnom tkivu i slezeni, a žive u bubregu i masnom tkivu.
6. Dobra opskrbljenost željezom rezultat je dostatne količine hrane zadovoljavajuće koncentracije željeza. Dodatak seleno smanjio je prosječne koncentracije željeza u tkivima jelena lopatara. Ovakav učinak seleno na koncentracije željeza u tkivima može biti posljedica indukcije metalotioneina ili načina preraspodjele željeza između tkiva i stanica, što ima povoljan učinak na zdravlje životinja.

7. U svim promatranim tkivima tijekom prve godine istraživanja utvrđena je mala koncentracija selena. Nakon dodataka selena u hrani značajno se ( $p < 0,01$ ) povećala koncentracija selena u bubregu, manje u mišiću. Manja koncentracija selena u tkivima posljedica je male koncentracije selena u biljnim krmivima koja su glavni izvor hranidbe jelena lopatara.
8. Dodatak selena nije utjecao na imunohematološke i biokemijske pokazatelje niti na humoralni odgovor. Utvrđene su značajno veće koncentracije ukupnih proteina, globulina i IgG u odraslih jelena u odnosu na mlade jelene lopatare tijekom obje godine. Stabilno kretanje metaboličkih pokazatelja ukazuje da dodatak selena nije imao negativan učinka na energetske metabolizam i zdravlje jelena lopatara. Visoka koncentracija glukoze odgovor je na stres prilikom uzorkovanja.
9. Kao rezultat prihrane jelena lopatara uz dodatak selena utvrđena je povećana aktivnost GPx-a čime je postignuta zadovoljavajuća antioksidativna zaštita.

U radu je istraživano stanje teških metala u okolišu i tkivima životinja koje su maksimalno izložene utjecaju toga okoliša. Utvrđene koncentracije teških metala u okolišu i tkivima jelena lopatara predstavljaju doprinos poznavanju onečišćenja okoliša. Istraživanjem međudjelovanja selena i teških metala uvođenjem antropogenog utjecaja na okoliš, dokazane su mogućnosti povoljnog učinka takvog utjecaja. Dosadašnja istraživanja o utjecaju selena uglavnom su bazirana na domaće preživače. Malo je podataka o njegovom utjecaju u jelena lopatara i ostalih vrsta divljači. S obzirom da je dodana količina selena u prihrani omogućila smanjenje koncentracije teških metala u tkivima i povećala antioksidativnu sposobnost, valjalo bi utvrditi koje bi koncentracije selena u prihrani bile dovoljne kako bi se povećala koncentracija selena u mišićnom tkivu. Takvo meso imalo bi veće tržišno i funkcionalno značenje za zdravlje ljudi.

## 6. LITERATURA

1. Aastrup, P., Riget, F., Dietz, R., Asmund, G. (2000.): Lead, zinc, cadmium, mercury, selenium and copper in Greenland caribou and rein deer (*Rangifer tarandus* L.). *Science of Total Environment* 245(1–3):149–159.
2. Abrams, M. A., Shennan, C., Zasoski, R. J., Burau, R. G. (1990.): Selenomethionine uptake by wheat seedling, *Agronomy Journal* 82: 1127.
3. Aderemi, F. A. (2004.): Effect of replacement of wheat bran with cassava root sieviate supplemented or unsupplemented with enzyme on the hematology and serum biochemistry of pullet chicks. *Tropical Journal of Animal Science* 7: 147–153.
4. Adriano, D. C. (2003.): *Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals*, Springer, New York, NY, USA.
5. *Air Quality Guidelines for Europe (2000.):WHO Regional Publications, European Series, 91: 288.*
6. Al-Attar, A. M. (2011.): Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 395–401.
7. Alfven, T., Jarup, L., Elinder, C. G. (2002.): Cadmium and lead in relation to low bone mineral density and tubular proteinuria. *Environmental Health Perspective* 110: 699–702.
8. Aliahmat, N. S., Noor, M. R. M., Yusof, W. J. W., Makpol, S., Ngah, W. Z. W., Yusof, Y. A. M. (2012.): Antioxidant enzyme activity and malondialdehyde levels can be modulated by Piper betle, tocotrienol rich fraction and *Chlorella vulgaris* in aging C57BL/6 mice. *Clinics* 67(12): 1447–1454.
9. Allan, G., Robert, A. C., O'Reilly, D. S. J., Stewart, M. J., James, S. (1995.): *Clinical Biochemistry*. 2nd Edn., Harcourt Brace and Company Ltd. 114–115.
10. Alloway, B. Y. (2013.): Heavy metals in soils. *Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*. Springer, 613.
11. Alonso, M. L., Benedito, J. L., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Shore, R. F. (2000.): Arsenic, cadmium, lead, copper and zinc in cattle from Galicia, NW Spain. *The Science of the Total Environment* 246: 237–248.
12. Andersen, O., Nielsen, J. B. (1994.): Effects of simultaneous low-level dietary supplementation with inorganic and organic selenium on whole-body, blood and organ levels of toxic metals in mice. *Environmental Health Perspective* 102(3): 321–424.

13. Anderson, B. H., Watson, D. L., Colditz, I. G. (1999.): The effect of dexamethason on some immunological parameters in cattle. *Veterinary Research Communication* 23: 399–413.
14. Anonymous (1994.): Summary Report of Phytoremediation Research Needs. Santa Rosa, California.
15. Anonymous (1985.): Nutrient Requirements of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Sheep, 6th revised ed., National Academy of Science-National Research Council, Washington, DC.
16. Antunović, Z., Steiner, Z., Steiner, Z., Šperanda, M., Domačinović, M., Karavidović, P. (2005.): Content of selenium and cobalt in soil, plants and animals in Eastern Slavonia. *Proceedings of XII International Conference Krmiva*, Opatija, Croatia, 204.
17. Araujo, A. S. R., Ribeiro, M. F. M., Enzweiler, A., Schenkel, P., Fernandez, T. R. G., Partata, W. A., Irigoyen, M. C., Bello-Klein, A. (2006.): Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Molecular and Cellular Endocrinology* 249: 133–139.
18. Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., Dwek, R. A. (2007.): The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual Review of Immunology* 25: 21–50.
19. Arthur, J. R. (2000.): The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 1825–1835.
20. Asher, G. W., Peterson, A. J., BASS, J. J. (1989.): Seasonal pattern of LH and testosterone secretion in adult male fallow deer (*Dama dama* L.). *Journal of Reproduction and Fertility* 85: 657–665.
21. Azizur R. M., Hasegawa, H., Mahfuzur, R. M., Nazrul, I. M., Majid, M. M. A., Tasmien, A. (2007.): Accumulation of arsenic in tissues of rice plant (*Oryza Sativa* L.) and its distributions in fractions of rice grains. *Chemosphere* 69: 942–948.
22. Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S. (1997.): Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry* 272: 217–221.
23. Bajović, V. V., Banovčanin, B., Birman, T., Bojović, D., Bulc, M., Černe, A., Čok, V., Čolić, D., Čop, J., Darabuš, S., De Brisambo, P., Divjak, V., Forgić, M., Frković, A., Garovnik, B., Grupče, R., Isaković, I., Jović, D., Krže, B., Kučančanin, S., Leskovic, B., Litričin, V., Mikeš, M., Mikuletić, V., Milenković, M., Milisavljević, M., Mirić, Đ., Naumov, V., Pantelić, A., Pekić, B., Radosavljević, L., Raguž, D., Rapić, M., Ristić, M., Simić, Ž., Simjanovski, J., Stanković, S., Stanojević, T., Stevanović, D.,

- Šelmić, V., Tadić, M., Trpkov, B., Urošević, M., Varićak, V., Vasić, V., Višnjić, M., Vučković, M., Zečević, M., Živančević, V., Živković, S. (1987.): Velika ilustrovana enciklopedija lovstva I, ur.: Zečević, M., Frković, A., Isaković, I., Naumov, V., Radosavljević, L., Rapaić, Ž., Rapaić, M., Simić, Ž., Šelmić, V., Trpkov, B., Varićak, V., Vasiljević, O., Višnjić, M., Vučković, M., Građevinska knjiga, Beograd, 85–92.
24. Barany, E., Bergdahl, I. A., Bratteby, L. E., Lundh, T., Samuelson, G., Skerfving, S., Oskarsson, A. (2005.): Iron status influences trace element levels in human blood and serum. *Environmental Research* 98: 215–223.
25. Bartley, J. C. (1980.): Lipid metabolism and its diseases. In: *Clinical biochemistry of domestic animals*. Kaneko, J. J. (Ed.). Academic Press, New York, USA, 106–141.
26. Baykov, B. D., Stoyanov, M. P., Gugova, M. L. (1996.): Cadmium and lead bioaccumulation in male chickens for high food concentrations. *Toxicology and Environment Chemistry* 54: 155–159.
27. Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Clemente, R., Lepp, N., Dickinson, N. (2010.): Mobility of arsenic, cadmium and zinc in a multi-element contaminated soil profile assessed by in-situ soil pore water sampling, column leaching and sequential extraction. *Environmental Pollution* 158: 155–160.
28. Beiglböck, C., Steineck, T., Tataruch, F., Ruf, T. (2001.): Environmental cadmium induces histopathological changes in kidneys of roe deer. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1811–1816.
29. Bender, B. (2009.): Examination of the bovine IgG transporter FcRn receptor Expression in vivo in transgenic mouse model. Thesis. Szent Istvan university faculty of agricultural and environmental sciences. Gödöllő.
30. Bernard, A. (2004.): Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. *Biometals* 17: 519–523.
31. Berneis, K., Rizzo, M. (2004.): LDL size: does it matter? *Swiss Medical Weekly* 134: 720–724.
32. Berzina, N., Markovs, J., Isajevs, S., Apsite, M., Smirnova, G. (2007.): Cadmium-induced enteropathy in domestic cocks: a biochemical and histological study after subchronic exposure. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 101: 29–34.
33. Beyer, W. N., Gaston, G., Brazzle, R., O'Connell, A. F., Audet, D. J. (2007.): Deer exposed to exceptionally high concentrations of lead near the Continental Mine in Idaho, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 1040–1046.

34. Beyrouly, P., Chan, H. M. (2006.): Co-consumption of selenium and vitamin E altered the reproductive and developmental toxicity of methylmercury in rats. *Neurotoxicology and Teratology* 28: 49–58.
35. Bharrhan, S., Chopra, K., Rishi, P. (2010.): Vitamin E supplementation modulates endotoxin-induced liver damage in a rat model. *American Journal of Biomedical Sciences* 2: 51–62.
36. Bik, D. (1998.): Interactions between selenium and selected trace elements in the serum of sheep. *Arbeitstgung Mengen- und Spurenelemente* 613–617.
37. Bilandžić, N., Sedak, M., Đokić, M., Šimić, B. (2010.): Wild boar tissue levels of cadmium, lead and mercury in seven regions of continental Croatia. *Bulletin of Environmental and Contaminant Toxicology* 84: 738–743.
38. Bilandžić, N., Sedak, M., Vratarić, D., Perić, T., Šimić, B. (2009.): Lead and cadmium in red deer and wild boar from different hunting grounds in Croatia. *Science of the Total Environment* 407(14): 4243–4247.
39. Birringer, M., EyTina, J. H., Salvatore, B. A., Neuzil, J. (2003.): Vitamin E analogues as inducers of apoptosis: structure–function relation. *British Journal of Cancer* 88: 1948–1955.
40. Biswas, S., Talukder, G., Sharma, A. (1999.): Prevention of cytotoxic effects of arsenic by short-term dietary supplementation with selenium in mice in vivo. *Mutation Research* 441: 155–160.
41. Bjerregaard, P., Fjordside, S., Hansen, M. G., Petrova, M. B. (2011.): Dietary selenium reduces retention of methyl mercury in fresh water fish. *Environmental Science & Technology* 45: 9793–9798.
42. Bobek, B., Morow, K., Perzanowski, K. (1984.): *Ekologiczne podstaw y łowiectwa*. PW RiL: 1-314, Warszawa.
43. Bodek, I., Lyman, W. J., Reehl, W. F., Rosenblatt, D. H (1988.): *Environmental Inorganic Chemistry: Properties, Processes, and Estimation Methods*. SETAC Special Publication Series, Walton, B. T, Conway, R. A. (Eds.) Pergamon Press. New York.
44. Borja-Aburto, V.H., Hertz-Picciotto, I., Rojas Lopez, M., Farias, P., Rios, C., Blanco, J. (1999.): Blood lead levels measured prospectively and risk of spontaneous abortion, *American Journal of Epidemiology* 150: 590–597.
45. Boyd, J. W. (1988.): Serum enzymes in the diagnosis of disease in man and animals. *Journal of Comparative Pathology* 98: 381–404.

46. Božić, F. (2006.): Imunost mladunčadi. Zavod za farmakologiju i toksikologiju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 165–248.
47. Brennan, P. A., Kendrick, K. M., Keverne, E. B. (1995.): Neurotransmitter release in the accessory olfactory bulb during and after the formation of an olfactory memory in mice, *Neuroscience* 69: 1075–1086.
48. Bridges, C. C., Zalups, R. K. (2005.): Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204: 274–308.
49. Brigelius-Flohe, R., Traber, M. G. (1999.): Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal* 13:1145–1155.
50. Brown, K. M., Arthur, J. R. (2001.): Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public health nutrition* 4(2): 593–599.
51. Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1986.): A receptor-mediated pathways for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34–47.
52. Bruss, M. L. (1997.): Lipids and Ketones. In: *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th ed., Kaneko, J. J., Harvey, J. W., Bruss, M. L. (Eds.), Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 83–115.
53. Bueno, A.R., Rasby, R., Clemens, E. T. (2003.): Age at weaning and the endocrine response to stress. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria Zootecnia* 1: 1–7.
54. Burger, J., Gochfeld, M. (2007.): Risk to consumers from mercury in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) from the Aleutians: fish age and size effects. *Environmental Research* 105: 276–284.
55. Burger, J., Marquez, M., Gochfeld, M. (1994.): Heavy metals in the hair of opossum from Palo Verde, Costa Rica, *Environmental Contamination and Toxicology* 4: 472–476.
56. Burk, R. F., Levander, O. A. (2002.): Selenio. In: Shils M. E, Olson, J. A, Shike, M., Ross, A. (Eds.) *Nutrición en Salud y Enfermedad*, 9th edn., vol I. Madrid: MacGraw-Hill Interamericana, 305–318.
57. Burk, R. F., Hill, K. E., Motley, A. K. (2003.): Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P, *Journal of Nutrition* 133: 1517–1520.
58. Burk, R. F., Levander, O. A. (1999.): Selenium. In: *Modern Nutrition in Health and Disease Ninth Edition*, Shils, M., Olson, J., Shike, M., Ross, A. C. (Eds.) Baltimore: Williams & Wilkins, 265–276.
59. Burtis, C. A., Ashwood, E. R. (1994.): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* 2nd ed.



60. Busher, J. T. (1990.): Chapter 101 Serum Albumin and Globulin In: Walker, H. K., Hall, D. W., Hurst, J. W. (Eds.), *Clinical Methods*, 3rd edition, The History, Physical and Laboratory Examinations. Butterworths, Boston, 497–498.
61. Cabadaj, R., Legáth, J., Pleva, J., Máté, D., Turek, P., Lohajová, L., Nagy, J., Mala, P. (1993.): Activity of some enzymatic parameters in halotane positive and negative pigs during their fattening and after transport to the slaughter-house. *Folia Veterinaria* 37: 23–26.
62. Cabanero, A. I., Carvalho, C., Madrid, Y., Batoreu, C., Camara, C. (2005.): Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal. *Biological Trace Element Research* 103: 17–35.
63. Caggiano, R., Sabia, S., Emilio, M., Macchiato, M., Anastasio, A., Ragosta, M., Paino, S. (2005.): Metal levels in fodder, milk, dairy productions and tissues sampled in ovine farms of Southern Italy. *Environmental Research* 99: 48–57.
64. Calabrese, V., Cornelius, C., Rizzarelli, E., Owen, J. B., Dinkova-Kostova, A. T., Butterfield, D. A. (2009.): Nitric oxide in cell survival: a Janusmolecule. *Antioxidants and Redox Signaling* 11(11): 2717–2739.
65. Calamari, L., Petrera, F., Abeni, F., Bertin, F. (2011.): Metabolic and hematological profiles in heat stressed lactating dairy cows fed diets supplemented with different selenium sources and doses. *Livestock Science*.
66. Cauty, M. J., McCormack, S., Lane, E. A., Collins, D. M., More, S. J. (2011.): Essential elements and heavy metal concentrations in a small area of the Castlecomer Plateau, Co. Kilkenny Ireland: Implications for animal performance. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 50: 223–238.
67. Cao, J., Henry, P. R., Guo, R., Holwerda, R. K., Toth, J. P., Littell, R. C., Miles, R. D., Ammerman, C. B. (2000.): Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *Journal of Animal Science* 78: 2039–2054.
68. Carvalho, C. M. L., Lu, J., Zhang, X., Arnér, E. S. J., Holmgren, A. (2011.): Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin reductase inhibited by mercury: implications for treatment of mercury poisoning. *FASEB Journal* 25: 370–381.
69. Cerklewski, F. L., Forbes, R. M. (1976.): Influence of dietary zinc on lead toxicity in the rat. *Journal of Nutrition* 106: 689.

70. Chang, H. L., Dedon, P. C., Deen, W. M. (2008.): Kinetic Analysis of Intracellular Concentrations of Reactive Nitrogen Species. *Chemical Research in Toxicology* 21(11): 2134–2147.
71. Chapman, D. I. (1977.): Haematology of the deer. In: *Comparative clinical haematology*. Archer, R. K., L., Jeffcott, L. B. (Eds.). Blackwell Science Publication, Oxford, 345–364.
72. Chapman, D. I., Chapman, N. G., Kent, J. E. (1980.): Some serum constituents of fallow deer (*Dama dama* L.) in England. *Research in Veterinary Science* 29: 105–107.
73. Chapman, D., Chapman, N. (1997.): *Fallow deer, Their Histology, Distribution and Biology*. Coch-y-bonddu-Books. Machynlleth.
74. Chavez, E. R. (1981.): Dietary selenium and cadmium interrelationship in weanling pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 61: 713–718.
75. Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1993.): An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 49: 481–493.
76. Chen, F., Ding, M., Castranova, V., Shi, X. L. (2001.): Carcinogenic metals and NF-kappa B activation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 222: 159–171.
77. Chen, R. W., Whanger, P. D, Weswig, P. H. (1975.): Selenium–induced redistribution of cadmium binding to tissue proteins: a possible mechanism of protection against cadmium toxicity. *Bioinorganic Chemistry* 4: 125–233.
78. Cheng, Z., Li, Y. (2007.): What is responsible for the initiating chemistry of iron mediated lipid peroxidation: an update. *Chemical Reviews* 107: 748–766.
79. Chin, S. F., Ibahim, J., Makpol, S., Abdul Hamid, N. A., Abdul Latiff, A., Zakaria, Z. (2011.): Tocotrienol Rich Fraction Supplementation Improved Lipid Profile and Oxidative Status in Healthy Older Adults: A Randomized Controlled Study. *Nutrition and Metabolism* 8(1): 42.
80. Chinoy, N., Sharma, A., Patel, T., Memon, R., Jhala, D. (2004.): Recovery from fluoride and aluminium induced free radical liver toxicity in mice. *Fluoride* 12: 14–16.
81. Chmielnicka, J., Bem, E. M., Kaszubski, P. (1983.): Organ and subcellular distribution of selenium in rats exposed to cadmium, mercury and selenium. *Environmental Research* 31: 273–278.
82. Chopra, S., Wallace, H. M. (1998.): Induction of spermidine/ spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species. *Biochemical Pharmacology* 55: 1119–1123.

83. Cimbal, D., Magic, D., Kovač, G. (1986.): Priebeh adaptacie danielerj zveri gyulajskej proveniencie v podmienkach UZ Rozhanovce. *Folia Venatoria* 16: 51–82.
84. Clarkson, T. W., Magos, L. (2006.): The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 609–662.
85. Combs, G. F., JR. (2001.): Selenium in global food systems. *British journal of nutrition* 85(5): 517–547.
86. Cunningham, W.P., Saigo, B. W. (1997.): *Environmental Science a Global Concern*. 4th Edn., WMC Brown Publisher, New York, 389.
87. Cuvin-Aralar, M. L., Furness, R. W. (1991.): Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21: 348–364.
88. Czene, S., Tiback, M., Harms-Ringdahl, M. (1997.): pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts. *Biochemical Journal* 323: 337–341.
89. Čepelak, I., Dodig, S. (2003.): Glutathione and oxidative stress, *Biochemical Medicine* 13: 93–100.
90. Čuvardić, M., Obradović, S., Vujošević, Z., Jugovac, N., Ubavić, M., Bogdanović, D. (1997.): Selenium content in the soils used for vegetable production. *Uređenje, korištenje i očuvanje zemljišta*, Jugoslovensko društvo za proučavanje zemljišta, Novi Sad, 266–272.
91. Da Silva, A. L. O., Barrocas, P. R. G., Jacob, S. C., Moreira, J. C. (2005.): Dietary intake and health effect of selected toxic elements. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1): 79–93.
92. Dalle Zotte, A., Szendrő, Z. S. (2011.): The role of rabbit meat as functional food, a review. *Meat Science* 88: 319–331.
93. Danch, A. (1991.): Selenium – poison or mikroelement? *Problemy* 9: 20–21.
94. Daniels, L. A. (1996.): Selenium metabolism and bioavailability. *Biological trace element research* 54(3): 185–199.
95. De Haan, J., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O’Shea, R. P., Cheung, N. S., Bronson, R. T., Silvestro, M. J., Wild, S., Zheng, S. S., Beart, P. M., Herzog, P. J., Kola, I. (1998.): Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase. GPX1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry* 273: 22528–22536.

96. Dêbska-Kalinowska, Z., Lewicka, E., Kwasowski, W. (1999.): Heavy metal content in soil and meadow plants growing at various distances from motorways. *Environmental and Protection Natural Resources* 18: 357–336.
97. Di Toppi, L. S., Gabbrielli, R. (1999.): Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105–130.
98. Dietz, R., Riget, F., Johansen, P. (1996.): Lead, cadmium, mercury and selenium in Greenland marine animals, *Science of The Total Environment* 186: 67–93.
99. Dijkstra, J. J., Meeussen, J. C. L., Comans, R. N. J. (2004.): Leaching of heavy metals from contaminated soils: an experimental and modeling study. *Environmental Science and Technology* 38: 4390–4395.
100. Dobrowolska, A., Melosik, M. (2002.): Mercury contents in liver and kidneys of wild boar (*Sus scrofa* L.) and red deer (*Cervus elaphus* L.). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 48: 156–160.
101. Dodig, S., Čepelak, I. (2004.): The facts and controverses about selenium. *Acta Pharmaceutica* 54: 261–276.
102. Dosi, A. (2000.): Heavy metals in blubber and skin of Mediterranean monk seals, *Monachus monachus* from the Greek waters. Degree Diss., University of North Wales, Bangor Menai Bridge Gwynedd, UK.
103. Doyle, D. (2006.): William Hewson (1739–1774): The father of hematology. *British Journal of Haematology* 133: 375–381.
104. Drasch, G., Horvat, M., Stoepler, M. (2004.): Mercury. In: Merian, E., Anke, M., Ihnat, M., Stoepler, M., (Eds.) *Elements and their compounds in the environment*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 931–1005.
105. Duce, J. A., Bush, A. I. (2010.): Biological metals and Alzheimer's disease: Implications for therapeutics and diagnostics. *Progress in Neurobiology* 92: 1–18.
106. Đerić, M. (2003.): Pathophysiology and clinical significance of atherogenic lipoprotein phenotype and small dense LDL particles. *Jugoslavenska Medicinska Biohemija* 22: 101–107.
107. Ebeid, T. A. (2012.): Vitamin E and organic selenium enhances the antioxidative status and quality of chicken cockerel semen under high ambient temperature. *British Poultry Science* 53: 708–714.
108. Edmondson, A. J., Norman, B. B., Suther, I. D. (1993.): Survey of state veterinarians and state veterinary diagnostic laboratories for selenium deficiency and toxicosis in animals. *Journal of American Veterinary Medical Association* 202: 865–874.

109. EFSA Scientific Committee (2009.): Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal* 10(3): 2579.
110. Egner, H., Riehm, H., Domingo, W. R. (1960.): Untersuchungen über die chemische Bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoffzustandes der Boden, II: Chemische Extraktionsmethoden zu Phosphor und Kaliumbestimmung. *Kungliga Lantbrukshögskolans Annaler* 26: 199–215.
111. El-Begearmi, M. M., Ganther, H. E., Sunde, M. L. (1982.): Dietary interaction between methylmercury, selenium, arsenic, and sulfur amino acids in Japanese quail. *Poultry Science* 61: 272–279.
112. El-Demerdash, F. M., Yousef, M. I., Kedwany, F. S., Baghdadi, H. H. (2004.): Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food and Chemical Toxicology* 42: 1563–1571.
113. Elinder, C. G., Friberg, L., Kjellström, T. (1994.): *Biological Monitoring of Metals*. Geneva: World Health Organization.
114. Eni, D. D., Iwara, A. I., Offiong, R. A. (2011.): Principal Component Analysis of Soil-Vegetation Interrelationships in a South-Southern Secondary Forest of Nigeria.
115. Enright, W. J., Spicer, L. J., Kelly, M., Culleton, N., Prendiville, D. J. (2001.): Energy level in winter diets of Fallow deer: effect on plasma levels of insulin-like growth factor-I and sex ratio of their offspring. *Small Ruminant Research* 39: 253–259.
116. Erdei, L., Mezôsi, G., Mécs, I., Vass, I., Fôglein, F., Bulik, L. (2005.): Phytoremediation as a program for decontamination of heavy-metal polluted environment. *Acta Biologica Szegediensis* 49: 75–76.
117. Falandysz, J. (1994.): Some toxic and trace metals in big game hunted in the northern part of Poland in 1987–1991, *Science of The Total Environment* 141: 59–73.
118. Falandysz, J., Szymczyk-Kobrzynska, K., Brzostowski, A., Zalewski, K., Zasadowski, A. (2005.): Concentrations of heavy metals in the tissues of red deer (*Cervus elaphus* L.) from the region of Warmia and Mazury, Poland. *Food Additives and Contaminants* 22(2): 141–149.
119. Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G. (2002.): Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 18: 872–878.
120. Feldhamer, G., Farris-Renner, K., Barker, C. (1988.): *Mammalian Species*. The American Society of Mammalogists 317: 1–8.

121. Findo, S., Hell, P., Farkas, J., Mankovska, B. Z., Ilinec, M., Stanovsky, M. (1993.): Akkumulation von ausgewählten Schwermetallen beim Rot- und Rehwild im zentralen Teil der Westkarpaten (Mittelslowakei). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 39:181–189.
122. Finley, J. W. (2006.): Bioavailability of selenium from foods. *Nutrition reviews* 64(3): 146–151.
123. Fitz, W. J., Wenzel, W. W. (2002.): Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology* 99: 259–278.
124. Flanagan, P. R., McLellan, J. S., Haist, J., Cherian, G., Chamberlain, M. J., Valberg, L. S. (1978.): Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology* 74: 841–846.
125. Flegal, K. M., Cary, E. E., Pond, W. G., Krook, L. P. (1980.): Dietary selenium and cadmium interrelationships in growing swine. *Journal of Nutrition* 110: 1255–1261.
126. Flora, S. J., Mittal, S. M., Mehta, A. (2008.): Heavy metal oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy, *Indian Journal of Medical Research* 128: 501–523.
127. Flueck, W. T., Smith-Flueck, J. M., mionczynski, J., Mincher, B. J. (2012.): The implications of selenium deficiency for wild herbivore conservation: a review. *European Journal of Wildlife Research* 1–20.
128. Forbes, J. M., Kyriazakis, I. (1995.): Food preferences in farm animals: why don't they choose wisely? *Proceeding of the Nutrition Society* 541: 429–440.
129. Fowler, M. E., Miller, R. E. (2003.): *Zoo and wild animal medicine*. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA.
130. Frank, A. (1986.): In search of biomonitors for cadmium: cadmium content of wild Swedish fauna during 1973–1976. *Science of the Total Environment* 57: 57–65.
131. Fredriksson, A., Gardlund, A. T., Bergman, K., Oskarsson, A., Ohlin, B., Danielsson, B., Archer, T. (1993.): Effects of maternal dietary supplementation with selenite on the postnatal development of rat offspring exposed to methyl mercury in utero. *Pharmacology and Toxicology* 72: 377–382.
132. Freeland, W. J. (1991.): Plant secondary metabolites: biochemical coevolution with herbivores. Palo, R. T., Robbins, C. T. (Eds.) In: *Plant defences against mammalian herbivory*, 61–81.
133. Friberg, L., Norberg, G. F., Vouk J. (1979.): *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier, North Holland Biomedical Press, 1–709.

134. Fridovich, I. (1972.): Superoxide radicals and superoxide dismutase. *Accounts of Chemical Research* 5: 321.
135. Fritioff, A., Greger, M. (2003.): Aquatic and Terrestrial Plant Species with Potential to Remove Heavy Metals from Stormwater, *International Journal of Phytoremediation* 5: 211–224.
136. Frosly, A., Norheim, C., Rambaek, J. P., Steinnes, E. (1984.): Levels of trace elements in liver from Norwegian moose, reindeer and red deer in relation to atmospheric deposition. *Acta Veterinaria Scandinavica* 25: 333–345.
137. Gailer, J., George, G. N., Pickering, I. J., Prince, R. C., Ringwald, S. C., Pemberton, J. E., Glass, R. S., Younis, H. S., De Young, H. S., De Young, D. W., Aposhian, V. (2000.): A metabolic link between arsenite and selenite: the seleno-bis(S-glutathionyl) arsinium ion. *Journal of the American Chemical Society* 122: 4637–4639.
138. Galanter, W. L., Hakimian, M., Labotka, R. J. (1993.): Structural determinants of substrate specificity of the erythrocyte anion transporter. *American Journal of Physiology* 265: 918–926.
139. Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M. L., Kopecky, M. J., Wagner, P. (1972.): Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science* 175: 1122–1124.
140. Ganz, T. (2003.): Hcpidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 102: 783–788.
141. García-Fernández, A. J., Sánchez-García, J. A., Jiménez, P., Luna, A. (1995.): Lead and cadmium in wild birds in southeastern Spain, *Environmental Toxicology and Chemistry* 14(12): 2049–2058.
142. Gardner, J. M., Aust, S. D. (2009.): Quantification of hydroxyl radical produced during phacoemulsification. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 35(12): 2149–2153.
143. Gasiewicz, T. A., Smith, J. C. (1976.): Properties of the cadmium and selenium complex formed in rat plasma *in vivo* and *in vitro*. *Chemico- Biological Interactions* 23: 171–183.
144. Gaur, A., Adholeya, A. (2004.): Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86: 528–534.
145. Gaurav, D., Preet, S., Dua, K. (2010.): Chronic cadmium toxicity in rats: treatment with combined administration of vitamins, amino acids, antioxidants and essential metals. *Journal of Food and Drug Analysis* 18: 464–470.

146. Geyikoglu, F., Turkez, H. (2005.): Protective effect of sodium selenite on genotoxicity to human whole blood cultures induced by aflatoxin B1. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 905–910.
147. Ghosh, J., Myers, C. E. (1998.): Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 13182–13187.
148. Gibb, D. J., Schwartzkopf-Genswein, K. S., Stookey, J. M., Mckinnon, J. J., Godson, D. L., Wiedmeier, R. D., Mcallister, T. A. (2000.): Effect of a trainer cow on health, behavior and performance of newly weaned beef calves. *Journal of Animal Science* 78: 1716–1725.
149. Goering, P. L., Waalkes, M. P., Klaassen, C. D. (1995.): Toxicology of cadmium. In: Goyer, R. A., Cherian, M. G. (eds.). *Toxicology of metals — biochemical aspects*. New York, NY: Springer, 189–214.
150. Goering, P. L., Fisher, B. R., Noren, B. T., Papaconstatinou, A., Rojko, J. L., Marler, R. J. (2000.): Mercury induces regional and cell-specific stress protein expression in rat kidney. *Toxicology Science* 53: 447–457.
151. Goldfarb, A. H. (1999.): Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Canadian Journal of Applied Physiology* 24: 249–266.
152. Gottipolu, R., Bhuvanesh, W., Chellu, S. (2006.): Developmental lead Neurotoxicity. *Neurotoxicology* 3: 18–29.
153. Goyer, R. A. (1995.): Nutrition and metal toxicity, *American Journal of Clinical Nutrition* 61: 646–650.
154. Goyer, R. A. (1996.): Toxic effects of metals. In: Klaassen, C. D. (Ed.), *Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 5th ed. New York City, NY: McGraw-Hill, 715–716.
155. Grace, N. D., Wilson, P. R. (2002.): Trace element metabolism, dietary requirements, diagnosis and prevention of deficiencies in deer *Veterinary Journal* 50(6): 252–259.
156. Grawe, K. P., Pickova, J., Dutta, P. C., Oskarsson, A. (2004.): Fatty acid alterations in liver and milk of cadmium exposed rats and in brain of their suckling offspring. *Toxicology Letters* 148: 73–82.
157. Greentree, W. F., Hall, J. O. (1995.): Iron toxicosis. In: Bonagura, J. D. (Ed.), *Kirk's current therapy XII small animal practice*. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co, 240–242.



158. Grizmek, B. (1990.): Grizmek's Encyclopedia of Mammals Vol. 5. Ed. Parker, S. P., New York: McGraw-Hill Publishing Co.
159. Groff, J. L., Gropper S. S., Hunt, S. M. (1995.): Microminerals. In: Advanced Nutrition and Human Metabolism. Minneapolis: West Publishing Company, Minneapolis, 381–384.
160. Grozdńska, K., Szarek-Łukaszewska, G. (2001.): Response of mosses to the heavy metal deposition in Poland - an overview. In *Environmental Pollution* 114: 443–451.
161. Grummer, R. R. (1993.): Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76: 3882–3896.
162. Grundy, S. M. (1990.): Atlas of lipid disorders. 1st ed. New York: Gower Medical Publishing.
163. Gunter, S. A., Beck, P. A, Hallford, D. M. (2013.): Effects of supplementary selenium source on the blood parameters in beef cows and their nursing calves. *Biological Trace Element Research* 152(2): 204–211.
164. Gupta, U. C., Gupta, S. C. (2000.): Selenium in soils and crops, its deficiencies in livestock and humans: implications for management. *Communications in soil science and plant analysis* 31: 1791–1807.
165. Gutierrez-De Lar, J. H., Warnick, A. C., Cowley, J. J., Hentages, J. F. (1971.): Environmental physiology in the sub-tropics. I. Effect of continuous environmental stress on some hematological values of beef cattle. *Journal of Animal Science* 32: 968–973.
166. Halliwell, B. (2005.): Free radicals and other reactive species in disease. John Wiley and Sons.
167. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989.): Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford, UK.
168. Haltiwanger, R. S., Lowe, J. B. (2004.): Role of glycosylation in development. *Annual Review of Biochemistry* 73: 491–537.
169. Han, Y., Kingston, H. M., Boylan, H. M., Rahman, G. M. M., Shah, S., Richter, R. C. (2003.): Speciation of mercury in soil and sediment by selective solvent and acid extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375: 428–436.
170. Harris, E. D. (2003.): Biochemical Facts behind the Definition and Properties of Metabolites, Biochemistry and Biophysics and Faculty of Nutrition, Texas A&M University, Texas.

171. Hartikainen, H., Xue, T., Piironen, V. (2000.): Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225: 193–200.
172. Hartwig, H., Hartwig, H. G. (1985.): Structural characteristic of the mammalian spleen indicating storage and release of red blood cells: aspects of evolutionary and environmental demands. *Experientia* 41: 159–163.
173. Hassan, A. A., Sandanger, T. M., Brustad, M. (2012.): Selected vitamins and essential elements in meat from semidomesticated rein deer (*Rangifer tarandus tarandus* L.) in mid and northern Norway: geographical variations and effect of animal population density. *Nutrients* 4(7): 724–739.
174. Hecht, H., Schinner, W., Kreutzer, W. (1984.): Endogene und exogene Einflüsse auf die Gehalte an Blei und Cadmium in Muskel und Organproben. 1 Mitteilung: Einfluss von Alter und Versuchsort. *Fleischwirtsch* 64: 967–969.
175. Hei, T.K., Filipić, M. (2004.): Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radical Biology Medicine* 37: 574–581.
176. Herber, R. F. M. (2004.): Cadmium. In: Merian, E., Anke, M., Ihnat, M., Stoeppler, M., (Eds) *Elements and their compounds in the environment*. 2nd ed. Weinheim:Wiley-VCH, 689–708.
177. Hillman, R. S. (1995.): Hematopoietic agents: growth factors, minerals, and vitamins. In: Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B. (Eds.), *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 9th ed. New York City, NY: McGraw-Hill, 1311–1340.
178. Himeno, S., Yanagiya, T., Fujishiro, H. (2009.): The role of zinc transporters in cadmium and manganese transport in mammalian cells. *Biochimie* 91: 1218–1222.
179. Hoelscher, L. M., Savell, J. W., Smith, S. B., Cross, H. R. (1988.): Subcellular distribution of cholesterol within muscle and adipose tissues of beef loin steaks. *Journal of Food Science* 53(3): 718–722.
180. Hofmann, R. R. (1989.): Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* 78: 443–457.
181. Holben, D. H., Smith, A. M. (1999.): The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *Journal of American Dietetic Association* 99: 836–843.
182. Hooda, P. (2010.): *Trace Elements in Soils*, First ed. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom.

183. Horgan, D., Kuypers, R. (1988.): Effect of high pressure treatment on rabbit longissimus dorsi muscles on the microsomal membranes. *Meat Science* 24(1): 1–10.
184. Horky, D., Illek, J., Pechova, A. (1998.): Distribution of heavy metals in calf organs. *Veterinary Medicine* 43: 331–342.
185. Huang, Z., Pei, Q., Sun, G., Zhang, S., Liang, J., Gao, Y. (2008.): Low selenium status affects arsenic metabolites in an arsenic exposed population with skin lesions. *Clinica Chimica Acta* 387: 139–144.
186. Hughes, M. F. (2002.): Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicology Letters* 133(1): 1–16.
187. Humann-Ziehank, E., Ganter, M., Hennig-Pauka, I., Binder, A. (2008.): Trace mineral status and liver and blood parameters in sheep without mineral supply compared to local roe deer (*Capreolus capreolus* L.) populations. *Small Ruminant Research* 75: 185–191.
188. Humann-Ziehank, E., Renko, K., Mueller, A. S., Roehrig, P., Wolfsen, J., Ganter, M. (2013.): Comparing functional metabolic effects of marginal and sufficient selenium supply in sheep. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 27(4): 380–390.
189. Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B., Williamson, G. (1997.): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of rat class Theta glutathione transferase T2-2. *Biochemical Society Transactions* 25: 559.
190. Imai, H., Narashima, K., Arai, M., Sakamoto, H., Chiba, N., Nakagawa, Y. (1998.): Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 273: 1990–1997.
191. Inal, M. E., Kanbak, G., Sunal, E. (2001.): Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinica Chimica Acta* 305(1): 75–80,
192. International Organization for Standardization. ISO 10390:1994: Soil quality- Determination of pH.
193. International Organization for Standardization. ISO 10693:1995: Soil quality- Determination of carbonate content-Volumetric method.
194. International Organization for Standardization. ISO 11464:1994: Soil quality- Pretreatment of samples for physico-chemical analyses.
195. International Organization for Standardization. ISO 11466:1995: Soil quality- Extraction of trace elements soluble in aqua regia.

196. International Organization for Standardization. ISO 14235:1994: Soil quality-Determination of organic carbon by sulfochromic oxidation.
197. International Organization for Standardization. ISO 1442:1997: Meat and meat products-Determination of moisture content (Reference method).
198. Jackson, J. (1977.): The annual diet of the fallow deer (*Dama dama* L.) in the New Forest, Hampshire as determined by rumen content analysis. *Journal of Zoology*, London 181: 465–473.
199. Jain, N. C. (1993.): *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 222–257.
200. James, P., McFadden, R. (2004.): Understanding the processes behind the regulation of blood glucose, *Nurs Times* (100)16: 56–58.
201. Jameson, R. R., Diamond, A. M. (2004.): A regulatory role for- Sec tRNA [Ser] Sec in selenoprotein synthesis, *RNA* 10: 1142–1152.
202. Jansson, G., Harms-Ringdahl, M. (1993.): Stimulating effects of mercuric- and silver ions on the superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radical Research Communications* 18: 87–98.
203. Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C.G., Nordberg, G., Vahter, M. (1998.): Health effects of cadmium exposure-a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* 24: 1–51.
204. Jazbec, I. (1990.): *Klinično laboratorijska diagnostika*, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija, 82–206.
205. Jenkins, R. (2000.): *American Journal of Clinical Nutrition* 72(2): 670–674.
206. Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M. K., Ames, B. N. (2001.): gamma-Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *American Journal of Clinical Nutrition* 74:714–722.
207. Jihen, E. H., Imed, M., Fatima, H., Abdelhamid, K. (2008.): Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: Histology and Cd accumulation. *Food and Chemical Toxicology* 46: 3522–3527.
208. Jihen, E. H., Imed, M., Fatima, H., Abdelhamid, K. (2009.): Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: Effects on the oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1559–1564.
209. John, H. H., Jeanne, I. R. (1994.): *Food Additives, Contaminants and Natural Toxins*. In: Maurice, E. S., James, A.O., Moshe, S., Febiger, L. (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease* 8: 1597–1598.

210. Jokukowski, M., Trzcinka-Ochoka, M., Razniewska, G., Matczak, W. (1998.): Biological monitoring of occupational exposure to arsenic by determining urinary content of inorganic arsenic and its methylated metabolites. *International Archives Occupational and Environmental Health* 71: 29–32.
211. Jones-Lee, A., Lee, G. F. (2005.): Role of iron chemistry in controlling the release of pollutants from resuspended sediments. *Remediation Journal* 16: 33–41.
212. Jornot, L., Petersen, H., Junod, A. F. (1998.): Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochemical Journal* 335: 85–94.
213. Jovanović, J. M., Nikolić, R. S., Kocić, G. M., Krstić, N. S., Krsmanović, M. M. (2013.): Glutathione protects liver and kidney tissue from cadmium and lead-provoked lipid peroxidation. *Journal of the Serbian Chemical Society* 78(2): 197–207.
214. Kabata-Pendias, A. (2001.): *Trace Elements in Soils and Plants*, 3rd ed., Boca Raton, FL: CRC Press, 241–252.
215. Kabata-Pendias, A., Mukherjee, B. A. (2007.): *Trace Elements from Soil to Human*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 560.
216. Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (1992.): *Trace Elements in Soils and Plants*, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
217. Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001.): *Trace elements in soils and plants*. 3rd edition. Boca Raton, London, New York, Washington, 413.
218. Kakkar, P., Jaffery, F. N. (2004.): Biological markers for metal toxicity, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 335–349.
219. Kamada, H., Nonaka, I., Ueda, Y., Murai, M. (2007.): Selenium addition to colostrum increases immunoglobulin G absorption by newborn calves. *Journal of Dairy Science* 90: 5665–5670.
220. Kamárová, M., Massányi, P., Jančová, A., Toman, R., Slamečka, J., Tataruch, F., Kováčik, J., Gašparik, J., Nad, P., Skalická, M., Koréneková, B., Juričik, R., Čubon, J., Haščik P. (2005.): Concentration of cadmium in the liver and kidneys of some wild and farm animals, *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 49: 465–469.
221. Kaneko, J. J. (1997.): Serum proteins and the dysproteinemias. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed. Kaneko, J. J., Harvey, J. W., Bruss, M. L. (Eds.). Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 117–138.

222. Karita, K., Shinozaki, T., Yano, E., Amari, N. (2000.): Blood lead levels in copper smelter workers in Japan. *Industrial Health* 38: 57-61.
223. Karstad, L. (1967.): Fluorosis in deer (*Odocoileus virginianus* Zimm.). *Bulletin Wildlife Disease Association* 3: 42–46.
224. Khan, M. A. K., Wang, F. (2009.): Mercury-Selenium compounds and their toxicological significance: toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 1567–1577.
225. Kiningham, K. K., St Clair, D. K. (1997.): Overexpression of manganese superoxide dismutase selectively modulates the activity of Jun-associated transcription factors in fibrosarcoma cells. *Cancer Research* 57: 5265–5271.
226. Kinnula, V. L., Crapo, J. D., Raivio, K. O. (1995.): Biology of disease: generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Laboratory Investigation* 73: 3–19.
227. Kippler, M., Goessler, W., Nermell, B., Ekstrom, E. C., Lonnerdal, B., El Arifeen, S., Vahter, M. (2009.): Factors influencing intestinal cadmium uptake in pregnant Bangladeshi women – a prospective cohort study. *Environmental Research* 109: 914–21.
228. Kiremidjian-Schumacher, L., Stotzky, G. (1987.): Selenium and immune responses. *Environmental Research* 42: 277–303.
229. Kirpichtchikova, T. A., Manceau, A., Spadini, L., Panfili, F., Marcus, M. A., Jacquet, T. (2006.): Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70(9): 2163–2190.
230. Klapac, T., Mandic, M. L., Grgic, J., Primorac, L. G., Perl, A., Krstanovic, V. (2004.): Selenium in selected foods grown or purchased in eastern Croatia. *Food Chemistry* 85: 445–452.
231. Kocan, A. A. (1980.): Heavy metal concentration in the kidney of white-tailed deer in Oklahoma. *Journal of Wildlife Disases* 16: 593–596.
232. Kopsell, D. A., Kopsell, D. E. (2007.): Selenium. In Barker, A. W., Pilbeam, D. J. (Eds.) *Handbook of plant nutrition*. CRC Press, 515-549.
233. Kormarinsky, L. A., Christopherson, R. J., Basu, T. K. (2003.): Sulfur: Its clinical and toxicologic aspects. *Nutrition* 19: 54–61.
234. Kottferová J., Koréneková, B. (1998.): Distribution of Cd and Pb in the tissues and organs of free living animals in the territory of Slovakia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60: 171–176.

235. Kottferová, J., Koréneková, B. (2000.): Game as an indicator of environmental pollution by cadmium and lead. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* 18: 571–575.
236. Kraft, W., Dürr, U. M. (1999.): Harnapparat. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, W. Kraft, W., Dürr, U. M. (Eds.), Schattauer, Stuttgart, Germany, 169 – 200.
237. Kraft, W., Dürr, U. M. (1999.): Leber. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, Schattauer, Stuttgart, Germany, 112–133.
238. Kryukov, G. V., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R., Castellano, S., Gladyshev, V. N. (2003.): Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300: 1439–1443.
239. Kučer, N., Kuleš, J., Rafaj, R. N., Tončić, J., Vicković, I., Štoković, I., Potočnjak, D., Šošarić, B. (2013.): Mineral concentrations in plasma of young and adult red deer. *Veterinarski arhiv* 84(4): 425–434.
240. Kulizhskiy, S., Rodikova, A., Evseeva, N., Kvasnikova, Z., Kashiro, M. (2014.): The components of critical zone (soil and vegetation) as indicators of atmospheric pollution with heavy metals of the Tomsk district (Western Siberia) in the natural ecosystems. *Procedia Earth and Planetary Science* 10: 399–404.
241. Kumar, B., Pachaura, S. P. (2000.): Haematological profile of crossbred dairy cattle to monitor herd health status at medium elevation in central Himalayas. *Research in Veterinary Science* 69: 141–145.
242. Kurasaki, M., Saito, T., Kaji, H., Kojima, Y., Saito, K. (1986.): Increased erythrocyte catalase activity in patients with hyperthyroidism. *Hormone and Metabolic Research* 18: 56–59.
243. Larison, J. R., Likens, G. E., Fitzpatrick, J. W., Crock, J. G. (2000.): Cadmium toxicity among wildlife in the Colorado Rocky Mountains. *Nature* 406: 181–183.
244. Larsen, P. R., Davies, T. F., Hay, I. D. (1998.): The Thyroid Gland, in *Williams Textbook of Endocrinology*. 9th ed., Wilson, J. D., Foster, D. W., Kronenberg, H. M., Larsen, P. R. (Eds.), W. B. Saunders Company, Philadelphia, 389–515.
245. Lavado, R. S., Claudia, A., Porcelli, R. A. (2001.): Nutrient and heavy metal concentration and distribution in corn, soybean and wheat as affected by tillage systems in the Argentine Pampas. *Soil & Tillage Research* 62: 55–60.

246. Lazarus, M., Orct, T., Aladrović, J., Beer Ljubić, B., Jurasović, J. (2010.): Effect of selenium pre-treatment on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in Cd-exposed suckling rats. *Biological Trace Element Research* 142(3): 611–622.
247. Lazarus, M., Orct, T., Blanuša, M., Vicković, I., Šoštarić, B. (2008.): Toxic and essential metal concentrations in four tissues of red deer (*Cervus elaphus* L.) from Baranja, Croatia. *Food Additives and Contaminants* 25(3): 270–283.
248. Lazarus, M., Orct, T., Jurasović, J., Blanuša, M. (2009.): The effect of dietary selenium supplementation on cadmium absorption and retention in suckling rats. *Biometals* 22: 973–983.
249. Lazarus, M., Vicković, I., Šoštarić, B., Blanuša, M. (2005.): Heavy metal levels in tissues of Red deer (*Cervus Elaphus* L.) from eastern Croatia, *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 56: 233–240.
250. Lee, D. W., Andersen, J. K., Kaur, D. (2006.): Iron dysregulation and neurodegeneration: the molecular connection. *Molecular Intervention* 6: 89–97.
251. Lee, T.C., Ho, I. C. (1994.): Differential cytotoxic effects of arsenic in human and animal cells. *Environmental Health Perspectives* 102: 101–105.
252. Lee, Y. J., Galoforo, S. S., Berns, C. M. (1998.): Glucose deprivation- induced cytotoxicity and alterations in mitogen- activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 273: 5294–5299.
253. Leonard, S. S., Harris, G. K., Shi, X. L. (2004.): Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 37: 1921–1942.
254. Lerner, K. L., Lerner, B. W. (2003.): *Word of Microbiology and Immunology*. The Gale Group, Inc. Farmington Hills, 249–250.
255. Lewis, G. F., Rader, D. J. (2005.): New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation Research* 96: 1221–1232.
256. Lindroth, R. (1989.): *Mammalian Herbivore-Plant Interactions* in Abrahamson, W. G. (Ed.) *Plant-animal interactions*, 163–206.
257. Links, J.M., Schwartz, B.S., Simon, D., Bandeen-Roche, K., Stewart, W.F. (2001.): Characterization of toxicokinetics and toxicodynamics with linear systems theory: application to lead-associated cognitive decline, *Environmental Health Perspectives* 109: 361–368.



258. Lončarić, Z., Kadar, I., Jurković, Z., Kovačević, V., Popović, B., Karalić, K. (2012.): Teški metali od polja od stola. Proceedings. 47<sup>th</sup> Croatian and 7<sup>th</sup> International Symposium on Agriculture. Opatija, Croatia, 14–23.
259. Lovnogospodarska osnova državnog otvorenog lovišta br. XIV/23 "Krndija II" (2006.).
260. Lugasi, A. (2006.): A vadhusok szerepe a táplálkozásban, tekintettel kémiai összetételükre és egyes élelmiszerbiztonsági szempontokra. *A Hús* 2: 85–90.
261. Ma, W. C. (2011.): Lead in mammals. In: Beyer, W. N., Meador, J. P. (Eds.), *Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 595–608.
262. Madejón, P., Murillo, J. M., Marañón, T., Cabrera, F., López, R. (2002.): Bioaccumulation of As, Cd, Cu, Fe and Pb in wild grasses affected by the Aznalcóllar mine spill (SW Spain). *Science of Total Environment* 290: 105–120.
263. Magos, L. (1997.): Physiology and toxicology of mercury. In: Sigel, A., Sigel, H. (Eds.), *Metal ions in biological systems: Mercury and its effects on environment and biology*, vol. 34. Dekker, New York, 321–370.
264. Mahaffey, K. R. (1974.): Nutritional factors and susceptibility to lead toxicity. *Environmental Health Perspectives* 7: 107.
265. Maher, P. (2005.): The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews* 4(2): 288–314.
266. Makarov, P., Kropf, S., Wiswedel, I., Augustin, W., Schild, L. (2006.): Consumption of redox energy by glutathione metabolism contributes to hypoxia/reoxygenation-induced injury in astrocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 286: 95–101.
267. Maňkovská, B. (1980.): The concentration of four toxic elements in the teeth of roe deer from the area of an aluminium plant. *Biologia (Bratislava)* 35: 819–822.
268. Maňkovská, B., Steinnes, E. (1995.): Effects of pollutants from an aluminium reduction plant on forest ecosystems. *Science of Total Environment* 163: 11–23.
269. Manojlović, M., Singh, B. R. (2012.): Trace elements in soils and food chains of the Balkan region. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B - Soil and Plant Science* 62: 673–695.
270. Manor, D., Morley, S. (2007.): The alpha-tocopherol transfer protein. *Vitamins & Hormones* 76: 45–65.
271. Marklund, S. L., Holme, E., Hellner, L. (1982.): Superoxid dismutase in extracellular fluids. *Clinica chimica Acta*.

272. Marsh, D. J., Knepper, M. A. (1992.): Renal handling of urea. In Handbook of Physiology, section 8, Renal Physiology, Windhager, E. E. (Ed.), New York: Oxford University Press, 1317–1348.
273. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005.): Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16: 577–586.
274. Mates, J. M., Sanchez-Jimenez, F. M. (2000.): Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32: 157–170.
275. Matthews, L. R., Cook, C. J. (1991.): Deer welfare research – Ruakura findings. Proceedings of a deer course for veterinarians, Wilson, P.R. (Ed.). Deer branch course 8, 353–366.
276. McDowell, L. R. (2003.): Minerals in animal and human nutrition. 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier.
277. McKinney, J. (1993.): Metals bioavailability and disposition kinetics research needsworkshop. *Toxicological and Environmental Chemistry* 39: 1–71.
278. McMurray, C. T, Tainer, J. A. (2003.): Cancer, cadmium and genome integrity. *Nature Genetics* 34: 239 – 241.
279. McNeal, J. M., Balistrieri, L. S. (1989.): Geochemistry and occurrence of selenium: an overview. In: Selenium in Agriculture and the Environment, Jacobs, L. W. (Ed.), SSSA Special Publication.
280. Meister, A. (1989.): Metabolism and function of glutathione. In: Dolphin, D., Poulson, R., Avramovic, O. (Eds.). Glutathione: chemical, biochemical, and medical aspects. Part A. New York: Wiley, 367–474.
281. Mench, M., Schwitzguébel, J. P., Schroeder, P., Bert, V., Gawronski, S., Gupta, S. (2009.): Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification, and sequestration, and consequences to food safety. *Environment Science and Pollution Research International* 16: 876–900.
282. Meng, B., Feng, X. B., Qiu, G. L., Liang, P., Li, P., Chen, C. X. (2011.): The process of methylmercury accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science and Technology* 45: 2711–2717.
283. Mengel, K., Kirkly, E. A., Kosegarten, H., Appel, T. (2006.): Principles of Plant Nutrition 5th edition. Kluwer Academic Publishers.

284. Merian, E., Anke, M., Ihnat, M., Stoepler, M. (2004.): Elements and Their Compounds in the Environment. Occurrence, Analysis and Biological Relevance. Wiley-VCH, Weinheim.
285. Meso i mesni proizvodi-Određivanje količine dušika. Referentna metoda (HRN ISO 937:1999 (ISO 937:1978)).
286. Meso i mesni proizvodi-Određivanje ukupne količine masti (HRN ISO 1443:1999 (ISO 1443:1973)).
287. Messarah, M., Boulakoud, M., Boumendjel, A., Abdennour, C., El Feki, A. (2007.) The impact of thyroid activity variations on some oxidizing-stress parameters in rats. *Comptes Rendus Biologies* 330: 107–112.
288. Mills, E. M., Takeda, K., Yu, Z. X. (1998.): Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry* 273: 22165–22168.
289. Milne, J. A. (1991.): Diet selection by grazing animals. *Proceedings of the Nutrition Society* 50: 77–85.
290. Min, K. S., Ueda, H., Tanaka, K. (2008.): Involvement of intestinal calcium transporter 1 and metallothionein in cadmium accumulation in the liver and kidney of mice fed a low-calcium diet. *Toxicology Letters* 176: 85–92.
291. Moore, N. P, Hart, J. D., Kelly, P. F., Langton, S. D. (2000.): Browsing by fallow deer (*Dama dama* L.) in young broadleaved plantations: seasonality and the effects of previous browsing and bud eruption. *Forestry* 73: 437–445.
292. Morris, M. C., Evans, D. A., Tangney, C. C., Bienias, J. L., Wilson, R. S. (2005.): Fish consumption and cognitive decline with age in a large community study. *Arcives of Neurology* 62: 1849–1853.
293. Morse, B.W., Miller, D. L., Miller, K. V., Baldwin, C. A. (2009.): Population health of Fallow deer (*Dama dama* L.) on little St. Simons island, Georgia, USA. *Journla of Wildlife Diseases* 45(2): 411–421.
294. Mottet, N. K., Vahter, M. E., Charleston, J. S., Friberg, L. T. (1997.): Metabolism of methylmercuryin the brain and its toxicological significance. In: Sigel, A., Sigel, H. (Eds.), *Metal ions in biological systems: Mercury and its effects on environment and biology*, vol. 34. Dekker, New York, 371–403.
295. Movva, R., Rader, D. J. (2008.): Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clinical Chemistry* 54: 788–800.

296. Mustapić, Z., Abramović, V., Bašić, F., Blažina, D., Brna, J., Buklijaš, B., Cepelić, D., Čelap, M., Darbuša, S., Frković, A., Gardaš, M., Grubešić, M., Huber, Đ., Hrupački, T., Janicki, Z., Karlović, M., Kusak, J., Lekić, M., Lovrić, I., Ogrizović, V., Pećnik, A., Pećnik, D., Radović, D., Raguž, D., Bajgot, Z., Safner, R., Šabić, F. V., Štahan, Ž., Timarac, Z., Tompak, M., Trohar, J., Vratarić, P., Vrrhovac, N., Žižanović, M. (2004.): Lovstvo, ur., Mustapić, Z., Hrvatski lovački savez Zagreb, Zagreb, 85 – 91.
297. Nafikov, R. A., Beitz, D. C. (2007.): Carbohydrate and Lipid Metabolism in Farm animals, *Journal of Nutrition* 137: 702–705.
298. Nehru, B., Dua, R. (1997.): The effect of dietary selenium on lead neurotoxicity. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology* 16: 47–50.
299. Nehru, B., Dua, R., Iyer, A. (1997.): Effect of selenium on lead-induced alterations in rat brain. *Biological Trace Element Research* 57: 251–258.
300. Nemi, C. J. (1993): *Essential of veterinary hematology* Lea and Febinger Philadelphia, 57–71.
301. Newairy, A. A., El-Sharaky, A. S., Badreldeen, M. M., Eweda, S. M., Sheweita, S. A. (2007.): The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology* 242: 23–30.
302. Ni, J. G. L., Wang, D., Shi, B., Yan, S. (2014.): Effect of dietary organic selenium on milk selenium concentration and antioxidant and immune status in midlactation dairy cows. *Livestock Science* 170: 84–90.
303. Nimitsuntiwong, W., Homswat, S., Boonprakob, U., Kaewmukul, S., Schmidt, A. (2000.): Hematological and plasma biochemical values in captive Eld's-Brow antlered deer (*Cervus eldi thamin*) in Thailand. *Journal of Veterinary Medicine Science* 62: 93–95.
304. Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., Friberg, L.T. (2007.): *Handbook on the Toxicology of Metals*. London: Elsevier.
305. Nowak, R. (1999.): *Walker's Mammals of the World, Sixth Edition, Volume II*. Baltimore & London: The Johns Hopkins University Press.
306. NSC (2009.): *Lead Poisoning*, National Safety Council.
307. Ognlanović, B., Žikić, R. V., Stajin, A., Potrović, V. M. (1995.): The effects of selenium on the antioxidant defense system in the liver of rats exposed to cadmium. *American Journal of Physiology* 44: 293–300.
308. Oishi, S., Nakagawa, J. I., Andi, M. (2000.): Effects of cadmium administration on the endogenous metal balance in rats. *Biological Trace Element Research* 76: 257–278.

309. O'Leary, K. A., de Pascual-Tereasa, S., Needs, P. W., Bao, Y. P., O'Brien, N. M., Williamson, G. (2004.): Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase- 2 (COX-2) transcription. *Mutation Research* 551: 245–254.
310. Olkowski, A. A. (2009.): *Livestock water quality, a field guide for cattle, horses, poultry, and swine*. Canada: University of Saskatchewan/Minister of Agriculture and Agri-Food.
311. Osfor, M. M., Ibrahim, H. S., Mohamed, Y. A., Ahmed, S., Abd El Azeem, A., Hegazy, A. M. (2010.): Effect of alpha lipoic acid and vitamin E on heavy metals intoxication in male albino rats. *Journal of American Science* 6: 6–63.
312. Osweiler, G. D., Carson, T. L., Buck, W. B. (1985.): Iron. In: *Clinical and diagnostic veterinary toxicology*. 3rd ed. Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt Publishing Co, 104–106.
313. Pacyna, E. G., Pocyna, J. M., Sundseth, K., Munthe, J., Kindbom, K., Wilson, S., Steenhuisen, F., Maxon, P. (2010.): Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment*, 44: 2487–2499.
314. Parcell, S. (2002.): Sulfur in human nutrition and applications in Medicine. *Alternative Medicine Review* 7: 22–44.
315. Parija, S. C. (2009.): *Textbook of Microbiology and Immunology*, Elsevier, Haryana, India, 102.
316. Park, H. S., Kim, S. R., Lee, Y. C. (2009.): Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology* 14: 27–38.
317. Parker, G. H., Hamr, J. (2001.): Metal levels in body tissues, forage and fecal pellets of elk (*Cervus elaphus* L.) living near the ore smelters at Sudbury, Ontario. *Environmental Pollution* 113: 347–355.
318. Patra, R. C., Swarup, D., Dwiedi, S. K. (2001.): Antioxidant effects of a-tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology* 162: 81–88.
319. Patricia, S., Brocard, A., Pandolf, P. (2005.): Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral, cortex and Malathion and/or Zinc chloride. *Toxicology* 207: 283–291.
320. Patrick, L. (2006.): Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review* 11: 114–127.

321. Pav, J., Zajiček, D., Dvorak, M. (1975.): Klinicke vyšetreni krve srnči zvere (*Capreolus capreolus* L.) a danči zvere (*Dama dama* L.) prirodzene invadovane parazity. *Veterinary Medicine Praha* 20: 215–221.
322. Pedrero, Z., Madrid, Y. (2009.): Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica chimica acta* 634(2): 135–152.
323. Peinado, V. I., Jose, F. C., Jesus, P. (1999.): Basic haematological values in some wild ruminants in captivity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 124: 199–203.
324. Peraza, M. A., Ayala-Fierro, F., Barber, D. S., Casarez, E., Rael, L. T. (1998.): Effects of micronutrients on metal toxicity. *Environmental Health Perspectives* 106(1): 203–216.
325. Perettoni, J., Rodrigues, O. E. D., Paixao, M. W., Zeni, G., Lobato, L. P., Braga, A. L., Rocha, J. B. T., Emanuelli, T. (2004.): Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food and Chemical Toxicology* 42: 17–28.
326. Perkins, J. (1991.): Supplemental Feeding, Texas Parks and Wildlife Department Fisheries & Wildlife Division.
327. Pezzarossa, B. (1999.): Sorption and desorption of selenium in different soils of the Mediterranean area, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 30: 2669–679.
328. Piasek, M., Blanuša, M., Kostial, K., Laskey, J. W. (2004.): Low iron diet and parenteral cadmium exposure in pregnant rats: the effects on trace elements and fetal viability. *Biometals* 17: 1–14.
329. Ping-chi, H., Yueliang, M. (2002.): Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 180: 33–44.
330. Pinto, A. P., Mota, A. M., de Varennes, A., Pinto, F. C. (2004.): Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of Total Environment* 326: 239–247.
331. Pokorny, B. (2000.): Roe deer (*Capreolus capreolus* L.) as an accumulative bioindicator of heavy metals in Slovenia. *Web Ecology* 1: 54–62.
332. Pokorny, B., Al Sayegh-Petkovšek, S., Ribariè-Lasnik, C., Vrtaènik, J., Doganoc, D. Z., Adamiè, M. (2004.): Fungi ingestion as an important factor influencing heavy metal intake in roe deer: evidence from faeces. *Science of Total Environment* 324: 223–234.

333. Pokorny, B., Ribariè-Lasnik, C. (2002.): Seasonal variability of mercury and heavy metals in roe deer (*Capreolus capreolus* L.) kidney. *Science of Total Environment* 117: 35–46.
334. Poli, B. M., Focardi, S., Tinelli, A. (1996.): Composition and metabolizable energy of feed used by fallow deer (*Dama dama* L.) in a coastal Mediterranean ecosystem. *Small ruminant research* 22: 103–109.
335. Poljièak-Milas, N., Slavica, A., Janicki, Z., Marenjak, T. S., Koliè, E. (2006.): Comparison of serum biochemical parameters between red (*Cervus elaphus* L.) and fallow deer (*Dama dama* L.) in Moslavina Region of Croatia. *Veterinarski arhiv* 76: 229–238.
336. Poljièak-Milas, N., Slavica, A., Janicki, Z., Robiè, M., Beliè, M., Milinkoviè-Tur, S. (2004.): Serum biochemical values in fallow deer (*Dama dama* L.) from different habitats in Croatia. *European Journal of Wildlife Research* 50: 7–12.
337. Pompe-Gotal, J., Prevendar Crniè, A. (2002.): Cadmium in tissues of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in Croatia. *Veterinarski arhiv* 72: 303–310.
338. Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A. F. (2003.): The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology* 66: 1499–1503.
339. Ponka, P., Schulman, H. M., Woodworth, R. C. (1990.): Iron transport and storage. Boca Raton, Fla: CRC Press.
340. Poorter, H., Remkes, C. (1990.): Leaf area ratio and net assimilation rate of 24 wild species differing in relative growth rate. *Oecologia* 83: 553–559.
341. Postolache, A. N. (2011.): Research on the knowledge of quality parameters that characterize the meat of certain game species used in human consumption, Doctoral thesis.
342. Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o najveèim dopuštenim kolièinama odreèenih kontaminanata u hrani. Narodne Novine br. 78/2011.
343. Pravilnik o najveèim dopuštenim kolièinama odreèenih kontaminanata u hrani. Narodne Novine br. 154/2008.
344. Pravilnik o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od oneèišèenja NN 15/1992.
345. Pravilnik o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od oneèišèenja NN 39/2013.
346. Pravilnik o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od oneèišèenja NN 9/2014.
347. Puls, R.(1994.): Mineral levels in animal health: diagnostic data, 2<sup>nd</sup> edn. Sherpa International, Clearbook, Canada, 356.

348. Puppe, B., Tuchscherer, M., Tuchscherer, A. (1997.): The effect housing conditions and social environment immediately after weaning on the agonistic behaviour, neutrophil/ lymphocyte ratio and plasma glucose level in pigs. *Livestock Production Science* 48: 157–164.
349. Pócsi, I., Prade, R. A., Penninckx, M. J. (2004.): Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology* 49: 1–76.
350. Quarterman, J., Morrison, J. N. (1975.): The effects of dietary calcium and phosphorus on the retention and excretion of lead in rats. *British Journal of Nutrition* 34: 351.
351. Radostis, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., Hinchliff, K. W. (2000.): *Veterinary Medicine*, 9th ed., Saunders, W. B. (Ed.), London, 1819–1822.
352. Rafaj, R. B., Tončić, J., Vicković, I., Šoštarić, B. (2011.): Haematological and biochemical values of farmed red deer (*Cervus elaphus* L.). *Veterinarski arhiv* 81(4): 513–523.
353. Ramírez, R. G., Haenlein, G. F. W., Treviño, A., Reyna, J. (1996.): Nutrient and mineral profile of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) diets in northeastern Mexico. *Small Ruminant Research* 23: 7–16.
354. Rana, S. V. S. (2008.): Metals and apoptosis: recent developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22: 262–284.
355. Rattan, R. K., Datta, S. P., Chhonkar, P. K., Suribabu, K., Singh, A. K. (2005.): Long-term impact of irrigation with sewage effluents on heavy metal content in soils, crops and groundwater-a case study. *Agriculture Ecosystems and Environment* 109: 310–322.
356. Rayman, M. P., Infante, H. G., Sargent, M. (2008.): Food-chain selenium and human health: Spotlight on speciation. *British journal of nutrition* 100(2): 238–253.
357. Rayman, P. R. (2008.): Food-chain selenium and human health: Emphasis on intake. *British journal of nutrition* 100(2): 254–268.
358. Raymond, L. J., Ralston, N. V. C. (2004.): Mercury: selenium interactions and health implications. *Seychelles Medical and Dental Journal* 7: 72–77.
359. Rederstorff, M., Krol, A., Lescure, A. (2006.): Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 52–59.
360. Reglero, M. M., Taggart, M. A., Monsalve-González, L., Mateo, R. (2009.): Heavy metal exposure in large game from a lead mining area: effects on oxidative stress and fatty acid composition in liver. *Environmental Pollution* 157: 1388–1395.



361. Rehbein, S., S. Bienoschek, Sachse, M., Neubert, E. (1999.): Hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen bei natürlich und bei mutterlos aufgewachsenen Damhirschen (*Dama dama* L.) - 2. Mitt.: Klinisch-chemische Untersuchung im Blutplasma. Zoologische Garten 69: 89–108.
362. Reimer, K. J., Koch, I., Cullen, W. R. (2010.): Organoarsenicals. Distribution and transformation in the environment. Metal ions in life science 7: 165–229.
363. Risher, J. F., Amler, S. N. (2005.): Mercury Exposure: Evaluation and Intervention The Inappropriate Use of Chelating Agents in the Diagnosis and Treatment of Putative Mercury Poisoning. Neuro Toxicology 26: 691–699.
364. Rodler, I. (2009.): A táplálkozás szerepe a rákbetegség kialakulásában II. Egészségtudomány 53: 3.
365. Rodríguez, L., Ruiz, E., Alonso-Azcárate, J., Rincón, J. (2009.): Heavy metal distribution and chemicals speciation in tailings and soils around a Pb-Zn mine in Spain. Journal of Environmental Management 90: 1106–1116.
366. Rofkar, R. J., Dwyer, D. F. (2011.): Effects of light regime, temperature, and plant age on uptake of arsenic by *Spartina pectinata* and *Carex stricta*. International Journal of Phytoremediation 13: 528–537.
367. Rooke, J. A., Robinson, J. J., Arthur, J. R. (2004.): Effects of vitamin E and selenium on the performance and immune status of ewes and lambs, a review. Journal of Agricultural Science 14: 253–262.
368. Rosen, B. P., Liu, Z. (2009.): Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. Environment International 35: 512–515.
369. Rosen, C. J. (2002.): Lead in the home garden and urban soil environment, Communication and Educational Technology Services, University of Minnesota Extension.
370. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E. (1973.) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science 179: 588–590.
371. Roy, S., Labelle, S., Mehta, P. (2005.): Phytoremediation of heavy metal and PAH-contaminated brownfield sites. Plant and Soil 272: 277–290.
372. Rudy, M. (2009.): The analysis of correlations between the age and the level of bioaccumulation of heavy metals in tissues and the chemical composition of sheep meat from the region in SE Poland. Food Chemistry and Toxicology 47: 1117–1122.

373. Ruiz, E., Alonso-Azcárate, J., Rodríguez, L., Rincón, J. (2009.): Assessment of metal availability in soils from a Pb-Zn mine site of South-Central Spain. *Soil and Sediment Contamination* 18: 619–641.
374. Swiergosz, R., Perzanowski, K., Makosz, U., Biłek, I. (1993.): The incidence of heavy metals and other toxic elements in big game tissues. *Science of the Total Environment* 225–231.
375. Sah, S., Smits, J. (2012.): Dietary selenium fortification: a potential solution to chronic arsenic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 94: 1–13.
376. Saito, Y., Takahashi, K. (2002.): Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein, *European Journal of Biochemistry* 269: 5746–5751.
377. Saito, Y., Yoshida, Y., Akazawa, T., Takahashi, K., Niki, E. (2003.): Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *Journal of Biological Chemistry* 278: 39428–39434.
378. Sakr, S. A. R., Mahran, H. A., Nofal, A. E. (2011.): Effect of selenium on carbimazole induced testicular damage and oxidative stress in albino rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 25: 59–66.
379. Sakurai, T. S. (2003.): Biomethylation of Arsenic is Essentially Detoxicating Event. *Journal of Health Science* 49(3): 171–178.
380. Santamaria, A., Sanchez, A., Roman, B. (2003.): Selenium on quinolinic acid induces neurotoxicity in rats. *Journal of Neurochemistry* 86: 479–488.
381. Santiago, D., Motas-Guzmán, M., Reja, A., María-Mojica, P., Rodero, B., García-Fernández, A. J. (1998.): Lead and cadmium in red deer and wild boar from Sierra Morena Mountains (Andalusia, Spain), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61(6): 730–737.
382. Santos, F. W., Zeni, G., Rocha, J. B. T., Weis, S. N., Fachinotto, J. M., Favero, A. M., Nogueira, C. W. (2005.): Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chemico- Biological Interactions* 151: 159–165.
383. Sasakura, C., Suzuki, K. T. (1998.): Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *Journal of Inorganic Biochemistry* 71: 159–162.
384. Sas-Nowosielska, A., Galimska-Stypa, R., Kucharski, R., Zielonka, U., Małkowski, E., Gray, L. (2008.): Remediation aspect of microbial changes of plant rhizosphere in mercury contaminated soil. *Environmental Monitoring and Assessment* 137: 101–109.

385. Satarug, S., Baker, J. R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P. E., Williams, D. J., Moore, M. R. (2003.): A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population, *Toxicology Letters* 137: 65–83.
386. Satarug, S., Nishijo, M., Lasker, J.M., Edwards, R. J., Moore, M.R. (2006.): Kidney dysfunction and hypertension: role for cadmium, p450 and heme oxygenases? *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 208: 179–202.
387. Satoh, H., Yasuda, N., Shimai, S. (1985.): Development of reflexes in neonatal mice prenatally exposed to methylmercury and selenite. *Toxicology Letters* 25: 199–203.
388. Sawicka-Kapusta, K. (1978.): Ocena zawartości metali ciężkich w porożach sarn z lasów śląskich. *Archiwum Ochrony Srodowiska* 1: 107–121.
389. Schrauzer, G. N. (2000.): elenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity, *Journal of Nutrition* 130: 1653–1656.
390. Schreck, E., Foucault, Y., Sarret, G., Sobanska, S., Cécillon, L., Castrec-Rouelle, M., Uzu, G., Dumat, C. (2012.): Metal and metalloid foliar uptake by various plant species exposed to atmospheric industrial fallout: mechanisms involved for lead. *Science of the Total Environment* 427–428, 253–262.
391. Selvaraj, V., Yeager-Armstead, M., Murray, E. (2012.): Protective and antioxidant role of selenium on arsenic trioxide-induced oxidative stress and genotoxicity in the fish hepatoma cell line PLHC-1. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31: 2861–2869.
392. Serdaru, M., Vlădescu, L., Ţolea, I. (2004.): Fluorimetric study of the selenium course in the dam–calf relationship. *Biological Trace Element Research* 99: 113–121.
393. Shanker, A. K. (2006.): Countering UV-B stress in plants: does selenium have a role? *Plant and Soil* 282: 21–26.
394. Sharkley, L. C., Radin, M. J. (2010.): *Manual of Veterinary Clinical Chemistry: A Case Study Approach*, Tenton NewMedia, Jackson, 149–151.
395. Sharma, P., Dubey, R. S. (2006.): Cadmium uptake and its toxicity in higher plants. In: Nafees, A., Samiullah, K. (Eds.) *Cadmium toxicity and tolerance in plants*. New Delhi, India: Narosa Publishing House, 63–86.
396. Sharpe, R. T., Livesey, C. T. (2005.): Surveillance of suspect animal toxicosis with potential food safety implications in England and Wales between 1990 and 2002. *Veterinary Record* 157: 465–469.

397. Shchedrina, V. A., Zhang, Y., Labunskyy, V. M., Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N. (2010.): Structure–function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins. *Antioxidant and Redox Signaling* 12: 839–849.
398. Sheweita, S. A. (1998.): Heavy metal-induced changes in the glutathione levels and glutathione reductase/glutathione S-transferase in the liver of male mice. *International Journal of Toxicology* 17: 383–392.
399. Shilo, S., Aronis, A., Komarnitsky, R., Tirosh, O. (2003.): Selenite sensitizes mitochondrial permeability transition pore opening in vitro and in vivo: a possible mechanism for chemo-protection. *Biochemical Journal* 370: 283–290.
400. Shimada, H., Takamura, Y., Shimada, A., Yasutake, A., Waalkes, M. P., Imamura, Y. (2004.): Strain differences of cadmium-induced hepatotoxicity in Wistar–Imamichi and Fischer 344 rats: involvement of cadmium accumulation. *Toxicology* 203: 189–197.
401. Sies, H. (1991.): *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, London.
402. Sies, H. (1993.): Strategies of antioxidant defence. *European Journal of Biochemistry* 215: 213–219.
403. Sileo, L., Beyer, W. N. (1985.): Heavy metals in white-tailed deer living near a zinc smelter in Pennsylvania. *Journal of Wildlife Diseases* 21: 289–296.
404. Silvestre, F. T., Rutigliano, H. M., Thatcher, W. W., Santos, J. E. P., Staples, C. R. (2007.): Effect of selenium source on production, reproduction, and immunity of lactating dairy cows in Florida and California. In: Lyons, T. P., Jacques, K. A., Hower, J. M. (Eds.), *Proceedings of the Twenty Third Alltech Annual Symposium Nutritional, Biotechnology in the Feed and Food Industries*, Nottingham University Press, UK, 265–277.
405. Singh, U., Devaraj, S., Jialal, I. (2005.): Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu Review Nutrition* 25: 151–174.
406. Sirichakwal, P. P., Puwastein, P., Polngam, J., Kongkachuichai, R. (2005): Selenium content of Thai foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 47–59.
407. Sjaastad, O. V., Hove, K., Sand, O. (2003.): *Physiology of Domestic Animals*. Scandinavian Veterinary Press 736–759.
408. Skerfving, S., Bergdahl, I. (2007.): Lead. In: Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., Friberg, L. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*, 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 599–643.

409. Slavica, A., Janicki, Z., Barić Rafaj, R., Kolić, E., Manojlović, L., Deždek, D. (2000.): Biochemical blood analysis of the fallow deer (*Dama dama* L.) from the Brijuni islands, Croatia. *Veterinarski arhiv* 70: 193–199.
410. Smedley, P. L., Kinniburgh, D. G. (2002.): A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* 17: 517–568.
411. Smith, J. E. G., Haigh, J. C. (1990.): Game framing practice. Notes for the wallow farmer, University of Saskatchewan, Canada.
412. Sobańska, M. A. (2005.): Wild boar hair (*Sus scrofa* L.) as a non-invasive indicator of mercury pollution. *Science of Total Environment* 339: 81–88.
413. Soylak, M., Aydin, F. A., Saracoglu, S., Elci, L., Dogan, M. (2002.): Chemical analysis of drinking water samples from Yozgat, Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies* 2: 151–156.
414. Spallholz, J. E., Mallory-Boylan, L., Rhaman, M. (2004.): Environmental hypothesis: is poor dietary selenium intake an underlying factor for arsenicosis and cancer in Bangladesh and West Bengal, India? *Science of the Total Environment* 323: 21–32.
415. Srebočan, E., Pompe-Gotal, J., Prevendar-Crnić, A., Ofner, E. (2007.): Mercury concentrations in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus Thynnus*) farmed in the Adratic Sea. *Veterinary Medicine* 52(4): 175–177.
416. Srebočan, E., Prevendar Crnić, A., Ekert-Kabalin, A. M., Lazarus, M., Jurasović, J., Tomljanović, K., Andreić, D., Perović, I. S., Čož-Rakovac, A. (2011): Cadmium, Lead and Mercury Concentrations in Tissues of Roe Deer (*Capreouls capreolus* L.) and Wild Boar (*Sus scrofa* L.) from Lowland Croatia. *Czech Journal of Food Sciences* 6: 624–633.
417. Stadtman, T. C. (2002.): Discoveries of vitamin B12 and selenium enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 71: 1–16.
418. Stapelberg, M., Tomasetti, M., Alleva, R., Gellert, N., Procopio, A., Neuzil, J. (2004.): alpha-Tocopheryl succinate inhibits proliferation of mesothelioma cells by selective down-regulation of fibroblast growth factor receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318: 636–641.
419. StatSoft, Inc. (2014.): Statistica (data analysis software system), version 12.
420. Stawarz, R., Zakrzewski, M., Marencik, A., Hraska, S. (2003): Heavy-metal concentration in the toad *Bufo bufo* from a region of Mochovce, Slovakia. *Ekologia-Bratislava* 3: 292–297.

421. Stevenson, F. J. (1982.): Humus chemistry genesis, composition, reactions. Wiley Interscience, New York.
422. Stoebe, S., Müller, A. S., Most, E., Coenen, M., Vervuert, I. (2014.): Effects of selenium supplementation on selenium status of farmed fallow deer in outdoor pens. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 29: 216–221.
423. Stohs, S. J., Bagchi, D. (1995.): Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18: 321–336.
424. Styblo, M., Thomas, D. J. (2001.): Selenium modifies the metabolism and toxicity of arsenic in primary rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 172: 52–61.
425. Su, L., Wabg, M., Yin, S. T., Wang, H. L., Chen, L., Sun, L. G., Ruan, D. Y. (2008.): The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 483–489.
426. Sunde, R. A. (2012.): Selenium. In: Ross, A. C, Caballero, B., Cousins, R. J., Tucker, K. L., Ziegler, T.R. (Eds.) *Modern Nutrition in Health and Disease*. 11th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 225–237.
427. Surai, P. F. (2002.): Selenium in poultry nutrition 2. Reproduction, egg and meat quality and practical applications. *World's Poultry Science Journal* 58: 431–450.
428. Surai, P. F. (2006.): Selenium and immunity: Selenium in nutrition and health. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 213–278.
429. Surai, P. F. (2006.): Selenium in nutrition and health. Nottingham university press, 974.
430. Surai, P. F., Dvorska, J. E. (2002.): Effects of selenium and vitamin E content of the diet on lipid peroxidation in breast muscle tissue of broiler breeder hens during storage. In: *Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium* 14: 187–192.
431. Susa, N., Ueno, S., Furukawa, Y., Sugiyama, M. (1996.): Protective effect of vitamin E on chromium (VI)-induced cytotoxicity and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes. *Archives of Toxicology* 71: 20–24.
432. Swanson, C. A., Patterson, B. H., Levander, O. A., Veillon, C., Taylor, P. R., Helzlsouer, K., McAdam, P. A., Zech, L. A. (1991.): Human 74 Seselenomethionine metabolism: a kinetic model, *American Journal of Clinical Nutrition* 54: 917–926.
433. Swiergosz, R., Perzanowski, K., Makosz, U., Birek, I. (1993.): The incidence of heavy metals and other toxic elements in big game tissues, *Science of The Total Environment* 134(1): 225–231.

434. Szablewski, L. (2011.): Glucose Homeostasis – Mechanism and Defects, Diabetes - Damages and Treatments, Rigobelo, E. (Ed.), InTech.
435. Škorić, A. (1991.): Sastav i svojstva tla. Fakultet Poljoprivrednih znanosti. Zagreb.
436. Taggart, M. A., Carlisle, M., Pain, D. J., Williams, R., Green, D., Osborn, D. (2005.): Arsenic levels in the soils and macrophytes of the 'Entremuros' after the Aznalcóllarmine spill. *Environmental Pollution* 133: 129–138.
437. Tall, A. R., Lange, Y. (1978.): Interaction of cholesterol, phospholipid and apoprotein in high density lipoprotein recombinants. *Biochimica et Biophysica Acta* 513: 185–197.
438. Tandon, S. K., Khandelwal, S., Jain, V. K., Mathur, N. (1994.): Influence of dietary iron deficiency on nickel, lead and cadmium intoxication. *Science of Total Environment* 148: 16–73.
439. Tangahu, B. V., Abdullah, S. R. S., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M. (2011.): A Review on Heavy Metals (As, Pb and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering* 6–7.
440. Tapiero, H., Townsed, D. M., Tew, K. D. (2003.): The antioxidant role of selenium and selenocompounds. *Biomedicine & pharmacotherapy* 57(3): 134–144.
441. Tataruch, F. (1993.): Vergleichende Untersuchungen zur Schwermetallbelastung von Rot-, Reh- und Gamswild. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 39: 190–200.
442. Thompson, L. J. (2012.): Lead. In: Gupta, R. C. (Ed.), *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, USA, 522–526.
443. Thomson, C. D. (1998.): Selenium speciation in human body fluids, *Analyst* 123: 827–831.
444. Thorn, C. (2000.): Normal Hematology of the Deer. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5th ed., Feldman, B. F., Zinkl, J. G., Jain, N. C. (Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, 391–404.
445. Todorović, M., Hristov, S., Mihailović, M. (2001.): Deficit i suficit selena u živine. *Savremena Poljoprivreda* 50: 37–142.
446. Toman, R., Massányi, P., Lukác, N., Ducsay, L., Golian, J. (2005.): Fertility and content of cadmium in pheasant (*Phasianus colchicus*) following cadmium intake in drinking water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 112–117.
447. Tomšič, E. (1986.): Rezidua svicna, kadmija in arzena v organih srnjadi, jelenjadi in divjih prašičev na širšem območju občine Ilirska Bistrica. Magistrsko delo, Veterinarska fakulteta Ljubljana, in Slovene.

448. Traber, M. G. (2007.): Vitamin E regulatory mechanisms. *Annual Review of Nutrition* 27: 347–362.
449. Traber, M. G., Burton, G. W., Hughes, L., Ingold, K. U., Hidaka, H., Malloy, M., Kane, J., Hyams, J., Kayden, H. J. (1992.): Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of lipoprotein metabolism. *Journal of Lipid Research* 33: 1171–1182.
450. Ullrey, D. J. (1987.): Biochemical and physiological indicators of selenium status in animals. *Journal of Animal Science* 65: 1712–1726.
451. Underwood, E. J. (1977.): Selenium, In: Trace elements in human and animal nutrition, 4 ed., Academic press, New York, San Francisco, London, 302–346.
452. Uzun, F. G., Kalender, S., Durak, D., Demir, F., Kalender, Y. (2009.): Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology* 47: 1903–1908.
453. Uzunhisarcikli, M., Kalender, Y. (2011.): Protective effects of vitamins C and E against hepatotoxicity induced by methyl parathion in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 2112–2118.
454. Van Gaal, L., Mertens, I., De Block, C. (2006): Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444: 875–880.
455. Van Ginneken, L., Meers, E., Guisson, R. (2007.): Phytoremediation for heavy metal-contaminated soils combined with bioenergy production, *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 15: 227–236.
456. Van Oostdam, J., Gilman, A., Dewailly, E., Usher, P., Wheatley, B., Kuhnlein, B., Neve, S., Walker, J., Tracyh, B., Feeley, M., Jerome, V., Kwavnick, B. (1999.): Human health implications of environmental contaminants in Arctic Canada: a review. *Science of the Total Environment* 230: 1–82.
457. Vellucci, S. V. (1997.): The autonomic and behavioural response to stress. In: Buckingham, J. C., Gilles, G. E., Cowell, A. E. (Eds.), *Stress, stress hormones and the immune System*, Chichester, 49–70.
458. Vengušt, G., Bidovec, A. (2002.): Some serum chemistry values of fallow deer (*Dama dama* L.) in Slovenian hunting enclosures. *Veterinarski arhiv* 4: 205–212.
459. Vengušt, G., Klinkon, M., Vengušt, A., Bidovec, A. (2002.): Biochemical parameters in blood of farmed fallow deer (*Dama dama* L.). *Zeitschrift Fur Jagdwissenschaft* 48: 226–233.



460. Vengušt, G., Vengušt, A. (2004.): Some minerals as well as trace and toxic elements in livers of fallow deer (*Dama dama* L.) in Slovenia. *European Journal of Wildlife Research* 50: 59–61.
461. Vengušt, G., Žele, D., Kobal, S., Bidovec, A. (2006.): Haematological and biochemical values of farmed fallow deer (*Dama dama* L.) after using different methods of capture. *Veterinarski arhiv* 76(6): 189–197.
462. Vernon, R. G. (2005.): Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *Journal of Dairy Research* 72: 460–469.
463. Videla, L. A., Fernandez, V., Tapia, G., Varela, P. (2003.): Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells. *Biometals* 16(1): 103–111.
464. Vikoren, T., Bernhoft, A., Waaler, T., Handeland, K. (2005.): Liver concentrations of copper, cobalt, and selenium in wild Norwegian red deer (*Cervus elaphus* L.). *Journal of Wildlife Diseases* 41: 569–579.
465. Vukadinović, V., Vukadinović, V. (2011.): Ishrana bilja. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
466. Walt, D. A., Bendiak, B., Bertozzi, C. R., Boons, G. J., Darvill, A., Hart, G., Kiessling, L. L., Lowe, J., Moon, R. (2012.): *Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future*. Washington, DC: The National Academies Press.
467. Wang, J., Feng, X., Anderson, C. W. N., Qiu, G., Ping, L., Bao, Z. (2011.): Ammonium thiosulphate enhanced phytoextraction from mercury contaminated soil results from a greenhouse study. *J Hazardous Materials* 186: 119–127.
468. Wang, M., Fu, H., Xiao, Y., Ai, B., Wei, Q., Wang, S., Liu, T., Ye, L., Hu, Q. (2013.): Effects of low-level organic selenium on lead-induced alternation in neural cell adhesion molecules. *Brain Research* 1530: 76–81.
469. Wangher, P. D. (2001.): Selenium and the brain: A review. *Nutritional Neuroscience* 4: 81–97.
470. Watanabe, C. (2002.): Modification of mercury toxicity by selenium: practical importance? *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 196: 71–77.
471. Wattiaux, M. A. (2014.): *Importance of Colostrum Feeding*. The Babcock Institute, 109–112.
472. Weiss, B. (2000.): Vulnerability of children and the developing brain to neurotoxic hazards. *Environmental Health Perspectives* 108: 375–381.

473. Weng, L. P., Temminghoff, E. J. M., Lofts, S., Tipping, E., Van Riemsdijk, W. H. (2002.): Complexation with dissolved organic matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil. *Environmental Science and Technology* 6: 4804–4810.
474. Whanger, P. D. (2000.): Selenoprotein W: A review, *Cellular and Molecular Life Science* 57: 1846–1852.
475. Whanger, P. D. (2002.): Selenocompounds in plants and animals and their biological significance, *Journal of the American College of Nutrition* 21: 223–232.
476. White, E., Shannon, J. S., Patterson, R. E. (1997.): Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 6: 769–774.
477. WHO (1989.): Mercury-environmental aspects. *Environmental Health Criteria* No. 86. Geneva: World Health Organization, 16.
478. WHO: WHO/FAO/IASEA (1996.): Report on Trace Elements in Human Nutrition and Human Health. Geneva: World Health Organization.
479. Woodbury, M. (2002.): Normal Hematology and Serum Chemistry Values for Red Deer (*Cervus elaphus* L.). Western College of Veterinary Medicine, Saskatoon, Canada.
480. Wojtaszek, P. (1997.): Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322: 681–692.
481. Wojtkiewicz, G., Kokin, A., Miroschnikov, A., Prokhorov, V. (1990.): Handbook of Geochemistry. Moscow, Nedra, 479.
482. Wolf, K. N., De Perno, C. S., Jenks, J. A., Stoskopf, M. K., Kennedy-Stoskopf, S., Swanson, C. C. (2008.): Selenium status and antibodies to selected pathogens in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in southern Minnesota. *Journal of wild Disease* 44(1): 181–187.
483. Wolkers, H., Wensing, T., Groot Bruinderink GWTA (1994.) Heavy metal contamination in organs of red deer (*Cervus elaphus* L.) and wild boar (*Sus scrofa* L.) and the effect on some trace elements. *Science of the Total Environment* 144:191–199.
484. Wolterbeek, H., van der Meer, A., J. (2002.): Transport rate of arsenic, cadmium, copper and zinc in *Potamogeton pectinatus* L.: radiotracer experiments with <sup>76</sup>As, <sup>109,115</sup>Cd, <sup>64</sup>Cu and <sup>65, 69</sup>Zn. *The Science of the Total Environment* 287: 13–30.

- 
485. Xie, Y., Chiba, M., Shinohara, A., Watanabe, H., Inaba, Y. (1998.): Studies on leadbinding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. *Industrial Health* 36: 234–239.
486. Yadav, S. K. (2010.): Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* 76: 16–179.
487. Yin, G. Y., Yin, Y. F., He, X. F. (1995.): Effect of zhuchun pill on immunity and endocrine function of elderly with kidney-yang deficiency. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih* 15: 601–603.
488. Yoneda, S., Suzuki, K. T. (1997.): Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 231: 7–11.
489. Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S., Ahmad, A. (2011.): Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86: 1–17.
490. Zakon o lovstvu. Narodne Novine br. 140/2005.
491. Zhong, X., Zhou, S., Zhu, Q., Zhao, Q. (2011.): Fraction distribution and bioavailability of soil heavy metals in the Yangtze River Delta-a case study of Kunshan City in Jiangsu Province. *Chinese Journal of Hazardous Materials* 198: 13–21.
492. Žele, D., Vengušt, G. (2012.): Biochemical indicators in serum of free-ranging roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in Slovenia. *Acta Veterinaria Brno* 81: 377–381.

## 7. SAŽETAK

Divljač se smatra pogodnim bioindikatorom onečišćenosti okoliša teškim metalima. Teški metali često imaju usmjerene fiziološke toksične učinke i pohranjuju se ili ugrađuju u živa tkiva. Selen kao bitan mikronutrijent kod svih životinja u posljednjih nekoliko godina privukao je veliku pozornost zbog svoga antioksidativnog i imunostimulirajućeg djelovanja. Mnoštvo podataka govori o zaštitnom djelovanju selena protiv djelovanja teških metala u organizmu. Cilj ovoga istraživanja bila je utvrditi koncentraciju teških metala (Cd, Pb, Hg i As) i esencijalnih elemenata (Fe i Se) u tkivima jelena lopatara (mišić, bubreg, jetra, masno tkivo i slezena) koji obitava u prirodnom staništu, a zatim nakon antropogenog djelovanja obogaćivanja dopunske hrane selenom kako bi utvrdili međudjelovanje selena s teškim metalima u tkivima i utjecaj dodatka selena na imunohematološke (KKS i DKS), biokemijske (GUK, UREA, CRE, ALB, TGC, KOL, HLD, LDL, Fe, TP, GLOB i IgG) pokazatelje i pokazatelje oksidacijskog stresa (SOD, GPx, GSH i vitamin E). Istraživanje je provedeno na 40 jelena lopatara odstrijeljenih u sezoni lova tijekom dvije godine istraživanja. Napravljena je i analiza staništa koja je obuhvaćala analize tla, listinca, prizemne flore i prihrane. Dopunska hranidba uz dodatak selena (0,5 mg/kg) provodila se 60 dana tijekom druge godine istraživanja. Tijekom prve godine istraživanja utvrđene su povećane koncentracije Pb u mišiću (0,56 mg/kg u mladim i 0,37 u odraslim) i Cd u bubregu (0,41 u mladim i 3,82 mg/kg u odraslim). Koncentracija Se bila je niska. Nakon dopunske hranidbe uz dodatak selena utvrđena je manja koncentracija teških metala u tkivima i poboljšana je antioksidativna zaštita. Koncentracija Pb bila je manja u svim tkivima (mišić = 0,07:0,44 mg/kg; bubreg = 0,15:0,27 mg/kg; jetra = 0,17:0,19 mg/kg; masno tkivo = 0,17:0,69 mg/kg; slezena = 0,06:2,14 mg/kg). Aktivnost Gpx bila je statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) druge godine istraživanja (1375,36:933,23 U/L). Dodatak selena nije imao negativan učinak na ostale ispitane parametre.

*Ključne riječi: jelen lopatar, teški metali, selen, antioksidativna zaštita, imunost jelena lopatara*

## 8. SUMMARY

### INFLUENCE OF SELENIUM ON HEAVY METALS DISTRIBUTION IN FALLOW DEER (*Dama dama* L.) TISSUES

Game is suitable bioindicator of environmental pollution by heavy metals. Heavy metals usually have targeted physiological and toxic effects and they are stored in or implanted into living tissues. Selenium as an essential micronutrient for all animals in the past few years has attracted much attention because of its antioxidant and immune stimulatory activity. A variety of data tells about protective action of selenium against the effects of heavy metals in the organism. The aim of this study was to determine the concentration of heavy metals (Cd, Pb, Hg and As) and essential elements (Fe and Se) in deer tissues (muscle, kidney, liver, adipose tissue and spleen) which resides in the natural habitat, and then after anthropogenic activity enrichment supplemental feed with the selenium, to determine the interaction of selenium with heavy metals in the tissues and the influence of selenium on immunohaematological (CBC and WBC), biochemistry (glucose, urea, CRE, ALB, TGC, KOL, HLD, LDL, Fe, TP, GLOB and IgG) indicators and indicators of oxidative stress (SOD, GPx, GSH and vitamin E). The research was conducted on 40 fallow deer that were shot in the hunting season during the two years of research. Analysis of habitat included analyzes of soil, tree leaves, grasses and fodders. Supplemental nutrition with the addition of selenium (0.5 mg/kg) carried out for 60 days in the second year of research. During the first year of the experiment there was increased concentrations of Cd and Pb in the tissues of fallow deer and concentration of Se was low. After supplementary feeding with the addition of selenium concentration of heavy metals in the tissues was lower and antioxidant protection was improved. After supplementary feeding with the addition of selenium concentration of Pb was lower in all tissues (muscle = 0.07:0.44 mg/kg; kidney = 0.15:0.27 mg/kg; liver = 0.17:0.19 mg/kg; fat = 0.17:0.69 mg/kg; spleen = 0.06:2.14 mg/kg). GPx activity was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the second year of research (1375.36:933.23 U/L). Addition of selenium had no negative impact on other tested parameters.

*Keywords: fallow deer, heavy metals, selenium, antioxidant protection, immunity of fallow deer*

## ŽIVOTOPIS

Neška Vukšić rođena je 06. lipnja 1989. godine u Našicama, gdje je završila osnovnu školu i srednju Prirodoslovno matematičku gimnaziju. Preddiplomski studij biologije upisala je 2008. godine u Osijeku na Odjelu za biologiju, gdje je 2011. godine stekla naziv Sveučilišna prvostupnica Biologije. Iste godine upisuje diplomski studij Lovstvo i pčelarstvo na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. Diplomirala je 2013. godine na temi "Koncentracija epinefrina u serumu divlje svinje (*Sus scrofa* L.) nakon ponovljenog smrzavanja ELISA metodom". Od 2014. godine polaznica je poslijediplomskog doktorskog studija Lovstvo i kinologija na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. Govori engleski jezik. Neki od radova koje je objavila su:

VUKŠIĆ, N., FLORIJANČIĆ, T., BOŠKOVIĆ, I., ĐIDARA, M., PAVIĆ, M., ŠPERANDA, M. (2013.): Koncentracija adrenalina u serumu divlje svinje (*Sus scrofa* L.) nakon ponovljenog smrzavanja, određena ELISA metodom. *Poljoprivreda* 19: 36–39.

VUKŠIĆ, N., PAVIĆ, M., ĐIDARA, M., JURČEVIĆ, J., ŠPERANDA, M. (2013.): Interakcija teških metala sa selenom u životinjskom organizmu. *Krmiva* 55(4): 189–195.

VUKŠIĆ, N., ŠPERANDA, M., GROSS BOŠKOVIĆ, A., PAVIĆ, M., ĐIDARA, M. (2014.): Teški metali u mesu divljači, *Meso* 16: 45–53.