

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Aleksandra A. Buha

**TOKSIČNI EFEKTI PRODUŽENE IZLOŽENOSTI  
KADMIJUMU I/ILI POLIHLOROVANIM  
BIFENILIMA U PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Aleksandra A. Buha

**TOKSIČNI EFEKTI PRODUŽENE IZLOŽENOSTI  
KADMIJUMU I/ILI POLIHLOROVANIM  
BIFENILIMA U PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Aleksandra A. Buha

**TOXIC EFFECTS OF PROLONGED EXPOSURE TO  
CADMIUM AND/OR POLYCHLORINATED  
BIPHENYLS IN RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

**Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:**

Prof. dr Vesna Matović, mentor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Biljana Antonijević  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Milena Kataranovski  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

U Beogradu \_\_\_\_\_

## TOKSIČNI EFEKTI PRODUŽENE IZLOŽENOSTI KADMIJUMU I/ILI POLIHLOROVANIM BIFENILIMA U PACOVA

### Rezime

Tokom prethodnih decenija, kadmijum (Cd), metal bez biološke funkcije, je zbog svoje toksičnosti i sposobnosti bioakumulacije postao predmet brojnih toksikoloških istraživanja. Polihlorovani bifenili (PCB), široko rasprostranjeni zagađivači životne sredine koji ulaze u lanac ishrane, takođe predstavljaju značajnu globalnu pretnju po zdravlje ljudi. Ljudi i drugi organizmi su obično izloženi smešama različitih supstanci koje su prisutne u životnoj sredini, hrani i u proizvodima široke upotrebe. Međutim, uz nekoliko izuzetaka, toksikološke studije i studije procene rizika razmatraju toksične efekte pojedinačnih supstanci, pa i dalje nema podataka o efektima istovremene izloženosti Cd i PCB.

Ova studija je imala za cilj da ispita efekte izloženosti različitim dozama Cd ili PCB, kao i efekte istovremene izloženosti različitim dozama ovih supstanci na prirast t.m, hematološke parametre, funkciju jetre i bubrega i štitaste žlezde. Ispitani su i parametri oksidativnog statusa i status bioelemenata u cilju pojašnjenja mehanizama toksičnosti Cd i PCB. Nakon uspostavljanja veze između primenjenih doza i koncentracija Cd i PCB u ciljnim tkivima, ispitano je postojanje dozne zavisnosti ispitivanih parametara i izračunate su *Benchmark* doze (BMD) za ispitivane parametre. Istraženi su i efekti istovremene primene različitih doza Cd i PCB na pomenute parametre, kao i moguće interakcije Cd i PCB pri njihovoj istovremenoj primeni u ispitivanim tkivima i organima.

Šest grupe pacova su primale 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5 ili 10 mg Cd/kg t.m/dan u obliku vodenog rastvora CdCl<sub>2</sub>, šest grupa je tretirano sa 0,5; 1; 2; 4; 8 ili 16 mg PCB/kg t.m/dan u obliku Aroclor 1254 rastvorenog u kukuruznom ulju, dok je devet grupa tretirano smešama različitih doznih kombinacijama Cd i PCB (1,25; 2,5 ili 5 mg Cd/kg t.m/dan sa 2; 4 ili 8 mg PCB/kg t.m/dan). Dve

grupe koje su primale samo vodu odnosno samo kukuruzno ulje služile su kao kontrola. Eksperimentalne životinje tretirane su oralno, gavažom, tokom 28 dana.

Obe hemikalije ispoljile su izražen efekat na prirast t.m. pacova što sugeriše da obe supstance ispoljavaju razvojnu toksičnost. Kritični hematološki efekat obe hemikalije je ispoljen na broj leukocita. Studija je pokazala hepatotoksične i nefrotoksične efekte oba toksična agensa uz oksidativni stres kao važan mehanizam toksičnosti. Dokazano je da Cd i PCB utiču i na enzimske i na neenzimske komponente antioksidativnog sistema zaštite te da izazivaju degradaciju lipida i proteina u jetri i bubrezima. Studija je takođe ukazala i na sposobnost obe ispitivane supstance da ometaju funkciju štitaste žlezde. Kadmijum je pre svega, doveo do smanjenja nivoa hormona T3 što ukazuje na izraženiji uticaj Cd na procese koji se dešavaju van same žlezde, dok je PCB ispoljio izraženije efekte na nivoe T4 hormona najverovatnije kao rezultat njihovog direktnog uticaja na štitastu žlezdu.

Poređenje izračunatih BMD vrednosti i procenjenih NOAEL vrednosti (*No Observable Adverse Effect Level*-doza bez štetnog efekta) za ispitivane parametre uglavnom je ukazalo na niže BMD vrednosti. Potvrđeno je da BMD koncept omogućava bolju upotrebu dostupnih podataka o odnosu doza-odgovor, kao i bolju kvantifikaciju nesigurnosti u odnosu na NOAEL koncept.

Deo studije u kojem su ispitivani efekti istovremene primene hemikalija ukazao je na izraženije i u nekim slučajevima, različite efekte smeša u odnosu na efekte pojedinačnih supstanci. Smeša je dovela do smanjenja broja eritrocita i sadržaja hemoglobina što nije bilo uočeno pri pojedinačnoj primeni ovih toksičnih agenasa. Studija je pokazala aditivne efekte ovih hemikalija na ispitivanim parametrima funkcije jetre, kao i parametrima oksidativnog statusa u jetri. Uočen je sinergistički efekat Cd i PCB na funkciju bubrega i oksidativni status u ovom organu. Sinergističke interakcije između ove dve hemikalije mogu se pretpostaviti i na nivou funkcije štitaste žlezde, tačnije za efekat koje ove hemikalije imaju na nivoe hormona štitaste žlezde u serumu. Razlike u

dobijenim rezultatima za efekte pojedinačnih supstanci i efekte njihovih smeša na ispitivanim tkivima i organima pokazale su da studije u kojima se ispituje toksičnost pojedinačnih agenasa ne mogu u potpunosti predvideti ceo opseg efekata i mogućih interakcija između toksičnih agenasa u smeši. Ovo zapažanje otvara pitanje da li bezbedni nivoi izloženosti dobijeni na osnovu studija ispitivanja toksičnosti pojedinačnih agenasa zaista pružaju odgovarajuću zaštitu od štetnih efekata hemikalija.

**Ključne reči:** kadmijum, polihlorovani bifenili, smeše, mehanizmi toksičnosti, pacov

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Toksikološka hemija

**UDK broj:** 615.9:[546.48:616-092.9 (043.3)

## TOXIC EFFECTS OF PROLONGED EXPOSURE TO CADMIUM AND/OR POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN RATS

### Abstract

In previous decades, cadmium (Cd), a metal of no biological function, has gained particulate attention due to its toxicity and ability to bioaccumulate. Similarly, polychlorinated biphenyls (PCBs), as widely spread toxic environmental pollutants that enter food chain, pose risk to human health and together with Cd represent one of the worldwide health threats. Humans and other organisms are typically exposed to chemical mixtures, present in the environment, food or consumer products. However, with a few exceptions, toxicological studies and chemical risk assessment consider toxic effects of single substances.

This study was aimed to investigate the effects of exposure to different doses of Cd or PCBs, and the effects of co-exposure to these two substances on body weight gain, hematological parameters, liver and kidney function, as well as their thyroid disrupting effects. Parameters of oxidative stress and bioelements status were determined in order to clarify the mechanisms of Cd and PCBs toxicity. Furthermore, an attempt was made to establish the connection between external doses and target tissue doses of Cd or PCBs and, buttressed on this relationship, to investigate dose response relationship and derive appropriate Benchmark doses (BMD) for the investigated parameters. Treatment of animals with different dose mixtures of these chemicals gave an insight into the effects of this mixture and differences between the effects of mixtures and single substances. Furthermore, possible interactions between these chemicals were assessed in investigated tissues and organs.

Six groups of rats were receiving 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5 or 10 mg



Cd/kg b.w./day as aqueous solutions of CdCl<sub>2</sub>, six groups were treated with 0.5, 1, 2, 4, 8 or 16 mg PCBs/kg b.w./day as Aroclor 1254 dissolved in corn oil, while nine groups were treated with different dose combinations of Cd and PCBs (1.25, 2.5 or 5 mg Cd/kg b.w./day with 2,4 or 8 mg PCBs/kg b.w./day). Two groups receiving only water or corn oil served as controls. Treatment of all animals was performed by oral gavage and lasted for 28 days.

Both chemicals produced profound effects on body weight gain suggesting possible developmental toxicity. Critical effects of both chemicals in blood were the effects on white blood cells count. The study demonstrated hepatotoxic and nephrotoxic effects of both toxic agents with oxidative stress as an important mechanism of their toxicity. Cadmium and PCBs were shown to affect enzymatic and non-enzymatic components of antioxidant defence system and to cause both lipid and protein degradation in liver and kidneys. The obtained results also gave the evidence of thyroid disrupting effects of both chemicals. Cadmium mainly caused decrease in T3 hormone levels suggesting predominant disruption of extrathyroidal processes, while PCBs showed more profound effects on T4 hormone levels presumably as the result of PCBs direct effect on thyroid gland.

Comparison between calculated BMD values and estimated NOAEL values for various investigated parameters mainly revealed lower BMD values. The ability of BMD concept to enable extended use of available dose-response data and better quantification of the uncertainties in the data set was proved.

The part of the study concerned with the effects of co-exposure to these chemicals implicated more profound and in some cases different effects of mixtures when compared to the effects of single chemicals. The mixture produced decrease in red blood cells count and hemoglobine content which was not observed with single chemical treatment. The study showed additive effects of these chemicals on investigated parameters of liver function and hepatic oxidative status. The effects of mixture on kidney function and oxidative status in this organ were shown to be synergistic. Synergistic

interactions between these two chemicals were also implicated for the effects on thyroid function, i.e. levels of thyroid hormones in serum. Obtained results on mixture toxicity showed that single agent toxicity studies cannot fully predict the entire range of interactions leading to toxicity. This observation raises the question whether the derived safe levels of exposure based on single agent toxicity studies really do provide reasonable protection from adverse effects of chemicals.

**Key words:** cadmium, polychlorinated biphenyls, mixtures, mechanisms of toxicity, rat

**Academic Expertise:** Pharmacy

**Major in:** Toxicological chemistry

**UDK No:** 615.9:[546.48:616-092.9 (043.3)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. KADMIJUM .....	1
1.1.1. Toksikokinetika kadmijuma .....	2
1.1.2. Mehanizmi toksičnosti .....	3
1.1.3. Toksični efekti .....	7
1.1.4. Karcinogenost .....	12
1.2. POLIHLOROVANI BIFENILI .....	13
1.2.1. Toksikokinetika .....	14
1.2.2. Mehanizmi toksičnosti .....	15
1.2.2.1. Mehanizmi toksičnosti dioksinima sličnih PCB .....	15
1.2.2.2. Mehanizmi toksičnosti PCB koji nisu slični dioksinima .....	17
1.2.3. Toksični efekti .....	18
1.2.4. Karcinogenost .....	22
1.3. TOKSIKOLOGIJA SMEŠA .....	22
<b>2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>27</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>29</b>
3.1. EKSPERIMENT .....	29
3.1.1. Hemikalije .....	29
3.1.2. Eksperimentalne životinje .....	29
3.1.3. Eksperimentalni protokol .....	29
3.2. BIOHEMIJSKA ISPITIVANJA .....	31
3.2.1. Određivanje hematoloških parametara .....	31
3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima funkcije jetre i koncentracije albumina u serumu .....	31
3.2.3. Određivanje parametara funkcije bubrega u serumu .....	32
3.2.4. Određivanje hormona štitaste žlezde u serumu .....	33
3.3. ODREĐIVANJE METALA U UZROCIMA JETRE, BUBREGA I KRVI .....	33
3.3.1. Reagensi i standardi .....	33
3.3.2. Priprema uzoraka .....	34
3.3.3. Određivanje koncentracije metala .....	34
3.4. ODREĐIVANJE POLIHLOROVANIH BIFENILA U UZORCIMA JETRE I BUBREGA .....	35
3.4.1. Reagensi i standardi .....	36
3.4.2. Priprema uzoraka .....	36
3.4.3. Određivanje koncentracije polihlorovanih bifenila .....	36
3.5. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA .....	38
3.5.1. Hemikalije .....	38
3.5.2. Priprema homogenata tkiva .....	38
3.5.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa .....	39
3.5.3.1. Određivanje koncentracije proteina .....	39
3.5.3.2. Određivanje koncentracije malondialdehida .....	40
3.5.3.3. Određivanje aktivnosti ukupne superoksid-dismutaze .....	40
3.5.3.4. Određivanje koncentracije redukovanog glutationa .....	41
3.5.3.5. Određivanje koncentracije ukupnih -SH grupa .....	42
3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	43
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>45</b>
4.1. TOKSIČNI EFEKTI KADMIJUMA .....	45
4.1.1. Efekti na prirast telesne mase .....	45
4.1.2. Efekti na hematološke parametre .....	45
4.1.3. Efekti na jetru .....	49
4.1.3.1. Efekti na relativnu masu organa .....	50
4.1.3.2. Efekti na nivoe albumina u serumu .....	51

4.1.3.3.	Efekti na parametre funkcije jetre u serumu.....	51
4.1.3.4.	Efekti na koncentraciju bioelemenata .....	52
4.1.3.5.	Efekti na parametre oksidativnog stresa .....	53
4.1.4.	<i>Efekti na bubrege</i> .....	55
4.1.4.1.	Efekti na relativnu masu organa .....	55
4.1.4.2.	Efekti na parametre funkcije bubrega u serumu .....	56
4.1.4.3.	Efekti na koncentraciju bioelemenata .....	57
4.1.4.4.	Efekti na parametre oksidativnog stresa .....	58
4.1.5.	<i>Efekti na štitastu žlezdu</i> .....	60
4.1.5.1.	Efekti na relativnu masu organa .....	60
4.1.5.2.	Efekti na nivoe hormona štitaste žlezde u serumu .....	60
4.2.	<b>TOKSIČNI EFEKTI POLIHLOOROVANIH BIFENILA .....</b>	<b>63</b>
4.2.1.	<i>Efekti na prirast telesne mase</i> .....	63
4.2.2.	<i>Efekti na hematološke parametre</i> .....	63
4.2.3.	<i>Efekti na jetru</i> .....	66
4.2.3.1.	Efekti na relativnu masu organa .....	66
4.2.3.2.	Efekti na nivoe albumina u serumu .....	67
4.2.3.3.	Efekti na parametre funkcije jetre u serumu .....	68
4.2.3.4.	Efekti na koncentracije bioelemenata .....	69
4.2.3.5.	Efekti na parametre oksidativnog stresa .....	70
4.2.4.	<i>Efekti na bubrege</i> .....	72
4.2.4.1.	Efekti na relativnu masu organa .....	73
4.2.4.2.	Efekti na parametre funkcije bubrega u serumu .....	74
4.2.4.3.	Efekti na koncentracije bioelemenata .....	74
4.2.4.4.	Efekti na parametre oksidativnog stresa .....	75
4.2.5.	<i>Efekti na štitastu žlezdu</i> .....	77
4.2.5.1.	Efekti na relativnu masu organa .....	77
4.2.5.2.	Efekti na nivoe hormona štitaste žlezde u serumu .....	78
4.3.	<b>TOKSIČNI EFEKTI SMEŠE KADMIJUMA I POLIHLOOROVANIH BIFENILA .....</b>	<b>80</b>
4.3.1.	<i>Efekti na prinos telesne mase</i> .....	80
4.3.2.	<i>Uticaj smeše na sadržaj Cd i PCB u krvi, jetri i bubregu</i> .....	81
4.3.3.	<i>Efekti na hematološke parametre</i> .....	82
4.3.4.	<i>Efekti na jetru</i> .....	86
4.3.4.1.	Efekti na relativnu masu organa .....	86
4.3.4.2.	Efekti na koncentraciju albumina.....	87
4.3.4.3.	Efekti na enzimske parametre funkcije jetre .....	88
4.3.4.4.	Efekti na koncentraciju bioelemenata .....	90
4.3.4.5.	Efekti na parametre oksidativnog stresa .....	91
4.3.5.	<i>Efekti na bubrege</i> .....	94
4.3.5.1.	Efekti na relativnu masu organa .....	94
4.3.5.2.	Efekti na parametre funkcije bubrega.....	94
4.3.5.3.	Efekti na koncentraciju bioelemenata .....	96
4.3.5.4.	Efekti na parametre oksidativnog stresa .....	97
4.3.6.	<i>Efekti na štitastu žlezdu</i> .....	101
4.3.6.1.	Efekti na relativnu masu organa .....	101
4.3.6.2.	Efekti na nivoe hormona štitaste žlezde.....	101
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>104</b>
5.1.	<b>TOKSIČNI EFEKTI KADMIJUMA.....</b>	<b>104</b>
5.1.1.	<i>Efekti na prirast telesne mase</i> .....	104
5.1.2.	<i>Efekti na hematološke parametre</i> .....	105
5.1.3.	<i>Efekti na jetru</i> .....	107
5.1.4.	<i>Efekti na bubrege</i> .....	113
5.1.5.	<i>Efekti na štitastu žlezdu</i> .....	119
5.2.	<b>TOKSIČNI EFEKTI POLIHLOOROVANIH BIFENILA .....</b>	<b>121</b>
5.2.1.	<i>Efekti na prirast telesne mase</i> .....	121

5.2.2.Efekti na hematološke parametre.....	122
5.2.3.Efekti na jetru .....	125
5.2.4.Efekti na bubrege.....	130
5.2.5.Efekti na štitastu žlezdu.....	135
5.3. TOKSIČNI EFEKTI SMEŠE KADMIJUMA I POLIHLOROVANIH BIFENILA .....	139
5.3.1.Efekti na prirast telesne mase.....	140
5.3.2.Efekti na hematološke parametre.....	140
5.3.3.Efekti na jetru .....	142
5.3.4.Efekti na bubrege.....	146
5.3.5.Efekti na štitastu žlezdu.....	149
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>152</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>158</b>
<b>8. PRILOZI .....</b>	<b>176</b>
BIOGRAFIJA AUTORA .....	176
IZJAVE .....	179

## 1. UVOD

### 1.1. KADMIJUM

Otkriven tek početkom dvadesetog veka, kadmijum (Cd) zbog svojih karakteristika ubrzo nalazi široku industrijsku upotrebu, ali odmah potom se dolazi i do saznanja da izloženost ovom metalu dovodi do oštećenja pluća, osteomalacije i oštećenja bubrega (Friberg, 1948). Nazvan "metalom dvadesetog veka", Cd ni do danas nije izgubio na aktuelnosti već je i dalje predmet brojnih istraživanja koja sve jasnije osvetljavaju mehanizme njegove toksičnosti po čoveka, ali i štetne efekte na životnu sredinu, do kojih dolazi već pri niskim dozama s obzirom na izraženi kumulativni efekat ovog metala. Ovaj toksični metal naveden je od strane Američke agencije za zaštitu životne sredine kao jedan od 126 zagađivača od značaja (EPA, 2009) i trenutno je na 7. mestu ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) prioritetne liste opasnih supstanci (ATSDR, 2013).

Značajna industrijska upotreba Cd otpočela je početkom XX veka sa proizvodnjom niki-Cd baterija, što je i danas najznačajniji izvor profesionalne izloženosti ovom metalu, iako do ekspozicije može doći i u rudnicima, prilikom proizvodnje ili prerade Cd i njegovih legura, usled upotrebe jedinjenja Cd kao pigmenata, boja i stabilizatora u industriji plastičnih masa, kao i pri recikliranju elektronskog otpada (Nordberg, 2009). Poslednjih decenija upotreba Cd u obliku nanočestica, poznatih kao CdSe ili CdTe-kvantne čestice, nalazi nove primene, posebno značajne u dijagnostici karcinoma, ali nosi i novi rizik po čoveka i životnu sredinu (Kirchner i sar, 2005).

U životnu sredinu, Cd dospeva kao rezultat antropogene aktivnosti, ali u manjoj meri i putem prirodnih izvora kao što su vulkanska aktivnost, šumski požari, abrazija stena, itd (ATSDR, 2012). Ne može se degradirati u životnoj sredini i ulazi u lanac ishrane, te je hrana glavni put unosa Cd za opštu populaciju (McLaughlin i sar, 2006). Prisutan je u gotovo svim tipovima namirnica, od kojih posebno visoke koncentracije sadrže iznutrice, riba i morski

plodovi, a od gajenih biljaka najbogatije su pirinač, pšenica, zeleno lisnato povrće i krompir u koje Cd dospeva iz zemljišta u kojem se nalazi usled atmosfere depozicije, otkopavanja ruda i upotrebe đubriva koje sadrži Cd. Prosečan unos Cd putem hrane varira između 8 i 25 µg na dan, iako su zabeleženi slučajevi znatno većeg unosa Cd putem hrane, od kojih je najpoznatiji slučaj trovanja Cd opšte populacije zabeležen u Japanu nakon II svetskog rata poznat pod imenom *Itai-itai* (jaoj-jaoj) bolest. Ova bolest praćena je frakturama kostiju i jakim bolovima, a trebalo je da prođe više od decenije da bi se *Itai-itai* bolest povezala sa povišenim unosom Cd usled konzumiranja pirinča sa polja navodnjavanih otpadnim vodama koje su sadržale povišene količine Cd.

Pušenje duvana predstavlja još jedan značajan izvor izloženosti opšte populacije ovom toksičnom metalu, jer se Cd akumulira u listovima biljke duvana *Nicotiana tabacum*, te se procenjuje da tokom dugogodišnjeg pušenja (20 godina) do 15 mg Cd dospe u pluća pušača (Martelli i sar, 2006).

#### 1.1.1. Toksikokinetika kadmijuma

Dominantan put unosa Cd za opštu populaciju je gastrointestinalni trakt (GIT). Novija istraživanja o transportu Cd ukazuju na značaj transportera poput DMT1-*divalent metal transporter 1* i MTP1-*metal transporter protein 1* (Ryu i sar, 2004). Kadmijum se, takođe može resorbovati iz GIT-a vezivanjem za -SH grupe cisteina i glutationa (GSH) (Zalups i Ahmad, 2003), a na stepen resorpcije Cd utiče i sadržaj proteina, kao i određenih bioelemenata u hrani.

Po ulasku u sistemsku cirkulaciju, Cd se inicijalno vezuje za albumine krvne plazme, a zatim ga tako vezanog preuzima jetra. Po jednokratnoj izloženosti, Cd se akumulira prvenstveno u jetri gde formira komplekse sa peptidima ili proteinima vezujući se za -SH grupe GSH i metalotioneina (MT) proteine male molekulske mase koji su posebno značajni za distribuciju i toksičnost Cd u organizmu. Nakon vezivanja za molekule MT ili GSH u jetri,

Cd prelazi u žuč, kao Cd-GSH ili Cd-MT kompleks i oslobađa se u cirkulaciju. Ove komplekse kao i slobodni Cd preuzimaju ćelije odnosno tkiva u kojima Cd ispoljava svoju toksičnost (Thévenod i Lee, 2013).

Dugotrajna izloženost niskim dozama Cd, pak, izaziva povećanu akumulaciju u bubrezima, posebno u korteksu bubrega. Naime, kompleks Cd-MT biva efikasno filtriran iz krvi u procesu glomerularne filtracije, a zatim reapsorbovan iz primarnog urina u proksimalne tubule bubrega. Reapsorpcija kompleksa Cd-MT dešava se endocitozom putem ZIP 8 transportera lociranih na apikalnoj površini renalnih tubularnih ćelija (Wang i sar, 2007). Nakon toga, Cd ulazi u lizosome gde biva oslobođen iz kompleksa sa MT, a slobodni joni Cd mogu izazvati oštećenja tkiva, ali i stimulirati sintezu MT u renalnim tubularnim ćelijama što rezultira ograničenom zaštitom renalnog korteksa.

Za kinetiku Cd od posebnog značaja je njegova akumulacija u organizmu, najvećim procentom u jetri i bubrezima, čime se objašnjava i činjenica da do toksičnih efekata može doći i pri izloženosti niskim dozama Cd tokom dužeg vremenskog perioda. Koncentracije Cd u jetri i bubrezima su nakon kratkotrajne izloženosti slične, dok se pri hroničnoj izloženosti Cd dominantno akumulira u bubregu koji je i ciljni organ hronične toksičnosti Cd. Poluvreme života Cd u organizmu čoveka se procenjuje na >26 godina, pri čemu je poluvreme života u bubrezima između 6 i 38 godina odnosno između 4 i 19 godina u jetri (ATSDR, 2012).

### 1.1.2. Mehanizmi toksičnosti

Tačni mehanizmi toksičnog delovanja Cd još nisu u potpunosti poznati, a uključuju brojne biohemijske, metaboličke i citotoksične mehanizme koji su međusobno povezani. Kao najznačajniji mehanizmi toksičnog delovanja Cd u literaturi se izdvajaju nastanak oksidativnog stresa, interakcije sa bioelementima, poremećaji u funkcionisanju mitohondrija, poremećaji u



ćelijskoj signalizaciji, a u novijoj literaturi sve aktuelniji je i epigenetski potencijal Cd.

Iako Cd nije redoks metal, eksperimentalne studije su pokazale da indukuje oksidativni stres u brojnim organima kao što su bubrezi, jetra, krv, pluća, pankreas, testisi, placenta i kosti (Buha i sar, 2012; Djukić-Ćosić i sar, 2007; Matović i sar, 2012, Matović i sar, 2015; Shaikh i sar, 1999; Ramirez i Gimenez, 2003). Smatra se da Cd indirektno dovodi do nastanka oksidativnog stresa preko dva nezavisna, ali međusobno povezana mehanizma (Jomova i Valko, 2011): izaziva nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) poput superoksidnog anjona ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), hidroksi radikala (OH $\cdot$ ) i reaktivnih azotnih vrsta (RNS), poput azot monooksida (NO), ali istovremeno ispoljava i negativni efekat na sistem antioksidativne zaštite. Povećanje produkcije reaktivnih vrsta u uslovima izloženosti Cd može se objasniti povećanom koncentracijom redoks aktivnih metala poput Fe koje je dokazano u datim uslovima (Casalino i sar, 1997; Wätjen i Beyersmann, 2004). Novija istraživanja pokazala su da do porasta produkcije slobodnih radikala pod uticajem Cd dolazi i usled povećanja intracelularnih nivoa Ca (Thévenod, 2009), kao i pokretanja inflamatorne reakcije od strane Cd. Naime, Kupferove ćelije bivaju aktivirane kao odgovor na velike količine Cd i oslobađaju različite medijatore inflamacije poput IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 koji stimulišu stvaranje slobodnih radikala u jetri (Yamano i sar, 2000). Sa druge strane, Cd ispoljava značajan efekat na enzimske komponente antioksidativne zaštite poput superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (Gpx) (Buha i sar, 2012; Nair i sar, 2013) čija inhibicija rezultira povećanjem reaktivnih vrsta. Kadmijum ispoljava svoje negativne efekte i na neenzimske komponente antioksidativne zaštite, pre svega smanjujući nivoe tripeptida GSH usled vezivanja za njegove -SH grupe (Djukić-Ćosić i sar, 2007; Matović i sar, 2012, Valko i sar, 2005), ali i inhibicijom enzima značajnih za održavanje njegovog nivoa u ćelijama-glutation reduktaze (GR), GPx i glutation-S-transfaze (GST) (Badisa i sar, 2007; Cuypers i sar, 2010).

O značaju oksidativnog stresa u toksičnosti Cd govori i činjenica da brojna istraživanja dovode u vezu nefrotoksičnost, hepatotoksičnost, imunotoksičnost, pa čak i karcinogenost sa poremećajem oksidativnog statusa u uslovima izloženosti Cd, o čemu će biti reči u sledećem poglavlju (1.1.3).

Dosadašnja istraživanja su ukazala da je jedan od značajnih mehanizama toksičnosti Cd i interakcija Cd sa bioelementima. Ekspozicija Cd izaziva disbalans esencijalnih metala poput Zn, Fe, Mg, Mn, Ca, Cu, Se, itd, najčešće u pravcu sekundarnog deficita, a posledično i do različitih funkcionalnih promena organizma (Matović i sar, 2010; Moulis, 2010; Tang i sar, 2014). Ove interakcije se mogu odigravati na nivou apsorpcije u GIT-u, tokom distribucije i eliminacije, pri čemu Cd može koristiti transportne sisteme koje koriste i drugi dvovalentni esencijalni katjoni, a do interakcija može doći i usled kompeticije za različita mesta endogenih supstrata, posebno proteinskih struktura. Interakcije Cd i Zn su verovatno do sada najviše istraživane, još od 1957. godine kada je Parizek dokazao da visoka doza Zn primenjena zajedno sa Cd može da spreči pojavu nekroze testisa (Parizek, 1957) pa do nalaza koji ukazuju da se deficitom Zn mogu objasniti neki od toksičnih efekata Cd, između ostalog na reproduktivni sistem i razvoj, pa čak i karcinogenost (Hu i sar, 2004). Dokazan je i uticaj Cd na veoma složen homeostatski sistem Fe, i time donekle objašnjena anemija koja se može konstatovati u uslovima trovanja Cd (Ryu i sar, 2004), brojne fiziološke promene se mogu pripisati deficitu Se, ali i Mg (Boujelben i sar, 2006; Buha i sar, 2012; Bulat i sar, 2008; Matović i sar, 2012), a izraženu toksičnost koju Cd ispoljava na kostima možemo objasniti i interakcijom Cd sa Ca (Martelli i sar, 2006). Iako proučavane već duži niz godina, razumevanje i tumačenje interakcija Cd i bioelemenata i dalje predstavlja izazov. No neophodno je istaći da, pored činjenice da se neki od toksičnih efekata Cd mogu objasniti njegovim interakcijama sa bioelementima, ove interakcije, posebno sa metalima poput Fe, Cu, Zn i Mn, mogu značajno doprineti i nastanku oksidativnog stresa kao značajnog mehanizma toksičnosti Cd (Moulis, 2010).

Kadmijum intereaguje i sa ćelijskim organelama, pre svega sa mitohondrijama, usled čega dolazi do ćelijske smrti, bilo pokretanjem apoptoze ili izazivanjem nekroze koja je praćena inflamacijom i fibrozom. Nakon ulaska u ove ćelijske organele kroz kanale za Ca, Cd, vezivanjem za tiolne grupe, dovodi do konformacionih promena u proteinima lokalizovanim na membrani ćelija usled čega dolazi do poremećaja u oksidativnoj fosforilaciji (Cd remeti respiratorni lanac, tačnije kompleks III) i promena u permeabilnosti membrane mitohondrija, aktivacije kaspaza, te nastanka apoptoze ili nekroze (Tang i Shaikh, 2001). Nastanak oksidativnog stresa se sa druge strane u brojnim studijama pominje kao još jedan od ključnih događaja u pokretanju apoptoze, što potkrepljuju i dokazi o inhibiciji Cd-indukovane apoptoze pod uticajem različitih antioksidanasa (Galán i sar, 2001). Prekomerni nastanak ROS-ova tako može dovesti do oštećenja fosfolipidne membrane mitohondrija i njene depolarizacije što je ključni događaj u intrinzičkom putu pokretanja apoptoze, jer u slučaju gubitka funkcije membrane mitohondrije citotoksični citohrom-c izlazi iz mitohondrija u citoplazmu gde učestvuje u aktivaciji kaspaznih puteva, pre svega kaspaze-9 što vodi nastanku apoptoze. Osim intrinzičkog puta pokretanja apoptoze koji se dešava preko efekata na mitohondrijama, apoptoza može biti pokrenuta i ekstrinzičkim putem koji podrazumeva aktivaciju "receptora smrti" na plazma membrani, nakon čega dolazi do aktivacije kaspaze-8 i kaspaze-10, te sledstvene apoptoze. Istraživanja su pokazala da Cd izaziva apoptozu putem oba ova puta (Eichler i sar, 2006), mada tačan mehanizam aktivacije ipak ostaje nepoznanica.

Najnovija istraživanja ukazuju i na delovanje Cd kao epigenetika. Promene DNK i histona koje menjaju strukturu hromatina bez promene sekvenca nukleotida, odnosno epigenetske promene, igraju značajnu ulogu u razvoju različitih vrsta karcinoma i hroničnih oboljenja, pa uloga Cd u ovim bolestima može, bar delimično biti objašnjena i preko njegovih epigenetskih efekata. Pokazano je da Cd izaziva metilaciju DNK (Huang i sar, 2008), dok dokaza o efektima Cd na modifikacije histona još uvek nema.

### 1.1.3. Toksični efekti

U zavisnosti od doze, puta unosa i dužine ekspozicije, Cd može izazvati oštećenja brojnih organa i sistema organa životinja i ljudi i to pluća, jetre, bubrega, kostiju, testisa, placente, hematopoetskog, nervnog i kardiovaskularnog sistema (ATSDR, 2012; Matović i sar, 2011).

Bez obzira na put unosa i dužinu izloženosti Cd, jetra predstavlja primarni organ deponovanja Cd tokom prvih sati nakon unosa i ciljni organ toksičnosti Cd pri akutnoj ekspoziciji. Ulazak Cd u hepatocite uključuje vezivanje za membrane i potom ulazak u ćeliju uz učešće kanala za Ca, kao i različitih transportera poput DMT1, ZIP8 i ZIP14 (Fujishiro i sar, 2009; Souza i sar, 1997).

Smatra se da akutna oštećenja hepatocita i nekroza jetre nastaju kao posledica direktnog toksičnog efekta metala, ishemije zbog oštećenja endotelnih ćelija i sledstvene inflamacije koja se razvija usled aktivacije Kupferovih ćelija i infiltracije neutrofila (Yamano i sar, 2000). Studije su pokazale da aktivirane Kupferove ćelije oslobađaju brojne medijatore inflamacije, poput ROS-ova, NO, citokina, koji mogu direktno oštetiti hepatocite. Pokazana je i značajna uloga tumorskog faktora nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) u hepatotoksičnosti Cd (Marth i sar, 2000). Nastanku hepatotoksičnih efekata doprinose i drugi mehanizmi toksičnog delovanja Cd poput poremećaja ćelijskog sistema antioksidativne zaštite i razvoja oksidativnog stresa, te poremećaja homeostaze esencijalnih elemenata. Brojni su dokazi koji upućuju da se jedan od mehanizama hepatoksičnosti Cd ostvaruje preko efekta koji Cd ima na mitohondrije. Naime, usled poremećaja procesa produkcije energije koji se dešavaju u mitohondrijama pod uticajem Cd dolazi do poremećaja osnovnih ćelijskih funkcija. Tako je pokazano da Cd u HepG2 ćelijama i izolovanim mitohondrijama jetre pacova modifikuje mitohondrijalnu funkciju tako što inhibira oksidativnu fosforilaciju i utiče na strukturu i funkciju membrane mitohondrija menjajući njen lipidno/fosfolipidni profil (Modi i Katyare, 2009). Ne treba zanemariti ni uticaj koji Cd ima na reparaciju DNK i ćelijsku

signalizaciju (Van Kerkhove i sar, 2010), te poremećaje ćelijske adhezije do kojih dolazi usled razgradnje kompleksa E-kaderin/beta-katenin (Bruscalupi i sar, 2009). Svi pomenuti efekti Cd na nivou hepatocita mogu dovesti do apoptoze ili nekroze hepatocita i različitih oštećenja jetre. Tako su eksperimentalne studije potvrdile povišene nivoe aspartat transaminaze (AST), alanin transaminaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP), laktat dehidrogenaze (LDH), gama glutamil transferaze (GGT) i ukupnog bilirubina u serumu, te histopatološke promene u jetri pacova subakutno izloženih Cd (El-Sokkary i sar, 2010; Renugadevi i Milton Prabu, 2010).

Specifična toksikokinetika Cd uzrok je njegovog deponovanja u bubrezima tokom hronične izloženosti ovom metalu kada bubrezi postaju i ciljni organ toksičnosti Cd. Pri hroničnoj izloženosti niskim dozama Cd dolazi do deponovanja Cd u proksimalnim tubulima i oksidativnog oštećenja transportnih proteina i mitohondrija što za posledicu ima apoptozu tubularnih ćelija (Fujiwara i sar, 2012) i gubitak reapsorptivnog potencijala tubula (Järup, 2003). Stoga se javlja prekomerno izlučivanje Zn ili Cu vezanog za MT, glukoze, aminokiselina, fosfata, kalcijuma, proteina male molekulske mase, poput  $\beta$ 2-mikroglobulina ( $\beta$ 2-M)/ $\alpha$ 1-mikroglobulina ( $\alpha$ 1-M), zatim retinol-vezujućeg proteina (RBP), kao i mokraćne kiseline, što podseća na Fankoni sindrom, genetsko oboljenje renalnog tubularnog transporta. I  $\beta$ 2-M i RBP se slobodno filtriraju u glomerulima i zatim kompletno reapsorbuju u proksimalnim tubulima, pa je detekcija  $\beta$ 2-M i RBP u urinu vrlo osetljiv pokazatelj poremećaja funkcije proksimalnih tubula. Kako se povreda tubula intenzivira, u urinu se pojavljuju i glukoza, aminokiseline, bikarbonati i fosfati. Smatra se da upravo pomenuti gubitak fosfata i poremećaj metabolizma vitamina D, tačnije inhibicija aktivnosti 1-hidroksiholekalciferol hidrosilaze, enzima odgovornog za konverziju  $25(\text{OH})\text{D}_3$  u  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , aktivnu formu vitamina D<sub>3</sub>, mogu indirektno doprineti renalnom gubitku Ca i bolestima kostiju, kao i formiranju kamena u bubregu (Kjellström, 1992). Dugotrajna izloženost Cd izaziva oštećenja glomerula dovodeći do albuminurije i progresivnog smanjenja

glomerularne filtracije, te konačno i do prestanka rada bubrega (Johri i sar, 2010).

Smatra se da u nefrotoksičnosti Cd najznačajniju ulogu ima nastanak oksidativnog stresa, kao i uticaj koji Cd ima na mitohondrije. Oštećenje mitohondrija i samo po sebi značajno doprinosi nastanku ROS-ova, a usled oštećenja membrane mitohondrija dolazi do oslobađanja citohroma-c, aktivacije kaspaza i apoptoze renalnih ćelija (Gobe i Crane, 2010). Takođe, distribucija intercelularnih vezujućih proteina N- i E-kaderina koji se nalaze u glomerulima i proksimalnim tubulima bubrega može biti poremećena pod uticajem Cd što doprinosi nefrotoksičnosti Cd (Prozialeck i sar, 2003).

Kadmijum može biti uzročnik ozbiljnih anemija delujući preko tri pretpostavljena mehanizma. Ovi mehanizmi uključuju indukciju hemolize kao posledice deformacije perifernih crvenih krvnih zrnaca, deficijenciju Fe usled kompeticije Cd sa Fe na nivou duodenalne apsorpcije i smanjenje produkcije eritropoetina u bubrezima, hormona koji reguliše volumen crvenih krvnih zrnaca (Horiguchi i sar, 2011).

Izloženost Cd, posebno hronična, dovodi i do poremećaja u funkcionisanju imunološkog sistema, pri čemu Cd ispoljava svoje toksične efekte na T ćelije, makrofage, B ćelije i NK ćelije. Imunotoksičnost Cd se, prema tome, ispoljava i na ćelijski i na humoralni imunitet (Krocova i sar, 2000; Fortier i sar, 2008). Osim na ćelijama hematopoetskog sistema, oštećenja imunološkog sistema pod uticajem Cd dešavaju se i na brojnim drugim nivoima ovog sistema. Tako istraživanja ukazuju na slezinu kao jedan od ciljnih organa toksičnosti Cd (Demenesku i sar, 2014), kao i na oštećenja u razvoju timusa usled prenatalne izloženosti Cd (Hanson i sar, 2010). Uočeno je i da Cd utiče na učestalost razvoja autoimunih oboljenja, usled povećane produkcije nespecifičnih antitela i smanjene produkcije antigen-specifičnih antitela (Ohsawa, 2009).

U epidemiološkim studijama sprovedenim u periodu 2007-2008. godine u SAD utvrđena je korelacija između nivoa Cd u krvi i supresije proizvodnje tireostimulišućeg hormona (TSH), dok su povećani nivoi Cd u urinu dovedeni

u vezu sa sniženim serumskim nivoima hormona trijodtironina ( $T_3$ ) i tiroksina ( $T_4$ ) (Yorita Christensen, 2013). Eksperimentalne studije su takođe potvrdile da Cd može dovesti do ometanja tireoidne funkcije. Prva eksperimentalna studija sprovedena je pre više od 20 godina i to na gravidnim ženkama pacova i ukazala na različita oštećenja štitaste žlezde kao i smanjene nivoe  $T_3$  i  $T_4$  hormona pod uticajem Cd (Yoshizuka i sar, 1991). Ispitivanja koja su usledila imala su za cilj da utvrde moguće mehanizme efekata Cd na funkciju tireoidne žlezde. Kadmijum dovodi do poremećaja u ravnoteži svih hipofiznih hormona, pa tako i hormona TSH (Badiei i sar, 2009, Jiménez-Ortega i sar, 2012) što bi moglo biti jedno od potencijalnih objašnjenja za smanjenu funkciju tireoidne žlezde u uslovima izloženosti Cd. Takođe, dokazan je i direktan toksični efekat Cd na strukturu tireoidne žlezde (Pilat-Marcinkiewicz i sar, 2003), te mogućnost Cd da poremeti homeostazu Se, metala koji je esencijalan za funkcionisanje tireoidne žlezde (Hammouda i sar, 2008), kao i ekstraplandularni efekti Cd, poput smanjenja aktivnosti enzima 5'-monodejodinaze (5'D-I) u jetri (Gupta i Kar, 1999).

Kadmijum se smatra metaloestrogenom, na šta ukazuju rezultati *in vitro* i *in vivo* studija (Silva i sar, 2012). Tako je većina istraživača pokazala u *in vitro* studijama da se Cd vezuje i aktivira nuklearne i membranske receptore za estrogene, te stimuliše transkripciju estrogenima regulisanih gena i proliferaciju ćelija karcinoma dojke. Dobijeni nalazi o Cd kao metaloestrogenu na ćelijskom i subćelijskom nivou dalje su potvrđeni inhibicijom ovih efekata Cd anti-estrogenima. I *in vivo* studije dale su jake dokaze da Cd zaista ima estrogeni efekat, jer su utvrđeni efekti Cd na matericu i mlečne žlezde uslovljeni aktivacijom receptora za estrogene. Iako epidemiološke studije nisu uspele da utvrde jasnu vezu između Cd i estrogen-zavisnih bolesti kod žena, Cd bi trebalo smatrati faktorom rizika za estrogen-zavisne karcinome, posebno za karcinom dojke.

Efekat Cd na kosti dugo se smatrao sekundarnom posledicom nefrotoksičnosti Cd, pre svega hiperkalcurije i poremećenog metabolizma

vitamina D, iako novija istraživanja pokazuju da Cd ispoljava i direktne toksične efekte na kostima. Dokazano je da Cd izaziva smanjenu apsorpciju Ca u GIT-u što može dovesti do demineralizacije kostiju, razvoja osteomalacije i osteoporoze (Nordberg i sar, 2007). Toksičnim efektima Cd na kostima doprinosi i stimulišući efekat Cd na faktor rasta fibroblasta 23 koji dovodi do fosfaturije i smanjenja preuzimanja fosfata (Kido i sar, 2012), kao i direktni toksični efekat Cd na MC3T3 osteoblaste nepoznatim mehanizmom i stimulišući efekat na osteoklaste (Chen i sar, 2012; Lizotte i sar, 2012). Takođe, povećani nivoi Cd u tubularnim ćelijama bubrega mogu dovesti do promene elektrohemijskog gradijenta duž luminalne membrane doprinoseći smanjenoj apsorpciji Ca iz primarnog urina.

Dokazan je i negativan efekat Cd na reproduktivnu funkciju. Tako, ekspozicija Cd primarno dovodi do poremećaja funkcije testisa usled oštećenja vaskularnog endotela, Lajdigovih i Sertolijevih ćelija, intraćelijskih veza što rezultira različitim morfološkim i funkcionalnim promenama, kao što su inhibicija sinteze testosterona i poremećaj spermatogeneze. Negativan uticaj ovog toksičnog metala uočen je i na nivou prostate, i to u vidu promene hormonske aktivnosti i sekrecije čime štetno utiče na plodnost mužjaka (Goyer i sar, 2004). Studije sprovedene na pacovima pokazale su da se neplodnost kao posledica ekspozicije Cd javlja usled oštećenja krvno-testisne barijere, smanjene sposobnosti adhezije germinativnih ćelija čime dolazi do smanjenja produkcije sperme, smanjenja ili čak potpunog gubitka plodnosti (Yan Cheng i Mruk, 2012). Studije na pacovima takođe su pokazale da Cd može indukovati produkciju prostaglandina  $F_{2\alpha}$  koji izaziva kavernožnu vazokonstrikciju i suprimira sintezu testosterona i njegovu sekreciju kod mužjaka (Gunnarsson i sar, 2004).

Utvrđeno je da Cd izaziva poremećaje membrana u CNS-u, smanjenje aktivnosti acetilholin (Ach)-esteraze i porast markera oksidativnog stresa u CNS-u (Shagirtha i sar, 2011). Takođe, uočeno je da ljudi sa povišenim nivoima Cd u krvi ili urinu imaju smanjenu pažnju i memoriju (Pacini i sar, 2012).



Novija istraživanja ukazala su da Cd predstavlja faktor rizika za razvoj insulinske rezistencije (Satarug i Moore, 2012). Jaka korelacija između nivoa Cd u ljudi i učestalost razvoja metaboličkog sindroma takođe je uspostavljena (Lee i Kim, 2012), pri čemu je mehanizam kojim Cd izaziva ovaj sindrom i dalje nepoznat, ali verovatno uključuje mehanička oštećenja insulinskih receptora.

#### 1.1.4. Karcinogenost

Utvrđeno je da postoji dovoljno dokaza da je Cd karcinogen za ljude. Kadmijum i jedinjenja Cd izazivaju karcinom pluća, a utvrđena je i veza između izloženosti Cd i jedinjenjima Cd sa razvojem karcinoma bubrega i prostate. Na osnovu ovih podataka Cd i njegova jedinjenja su od strane Međunarodne asocijacije za istraživanje karcinoma klasifikovani u grupu 1 odnosno kao karcinogeni za ljude (IARC, 2012).

Osim karcinoma pomenutih organa, izloženost Cd dovedena je u vezu i sa karcinomom dojke u žena (McElroy i sar, 2006), karcinomom pankreasa (Dobrića-Dintinjana i sar, 2012), a postoje i nešto slabiji dokazi o ulozi Cd u nastanku non-Hodžkinovog limfoma (Ramis i sar, 2012).

Mnogobrojni mehanizmi kojima Cd dovodi do karcinogeneze identifikovani su u brojnim toksikogenomskim studijama. Tako ROS mogu delovati kao sekundarni glasnici koji regulišu gensku ekspresiju i dovode do ćelijskih transformacija, ili doprineti inhibiciji popravke oštećene DNK do koje dovodi Cd (Gobe i Crane, 2010). Svakako da centralnu ulogu u nastanku karcinoma pod uticajem Cd ima inhibicija apoptoze koja predstavlja najznačajniji mehanizam uklanjanja transformisanih ćelija.

## 1.2. POLIHLOROVANI BIFENILI

Polihlorovani bifenili (PCB) su široko rasprostranjeni perzistentni sintetski zagađivači životne sredine koji se bioakumuliraju i biomagnifikuju u lancu ishrane, te imaju značajan udeo u ukupnom sadržaju organohlornih jedinjenja u organizmu čoveka (Longnecker i sar, 2001). Slično Cd, ova grupa organskih jedinjenja uvrštena je u ATSDR prioritetnu listu opasnih supstanci i to kao 5. na listi (ATSDR, 2013), a takođe se nalazi i na listi od 126 zagađivača od značaja koju daje Američka agencija za zaštitu životne sredine (EPA, 2009).

Polihlorovani bifenili su po svojoj hemijskoj strukturi bifenili sa 1 do 10 atoma hlora, te je stoga teoretski moguće postojanje 209 različitih kongenera, mada je za sada samo 130 kongenera identifikovano u komercijalnim smešama. Prvi put su sintetisani pre više od 100 godina, a komercijalna proizvodnja počela je tridesetih godina prošlog veka u Monsanto hemijskoj industriji SAD, pod nazivom Askarel. Ove sintetske organske hemikalije nemaju prirodne izvore u životnoj sredini već su komercijalno sintetisane zbog izuzetnih električnih izolacionih sposobnosti i male zapaljivosti. Bili su široko upotrebljavani u električnim transformatorima, usporivačima gorenja, adhezivima, lubrikantima, pesticidima, itd (ATSDR, 2000). Na tržištu su najrasprostranjenije bile komercijalne smeše pod nazivom Aroclor proizvođača Prodelec iz Francuske. Nakon otkrića nesumljive veze između izloženosti PCB i toksičnih efekata na životnu sredinu i čoveka, proizvodnja PCB u SAD prestala je 1979, dok je svetska zabrana proizvodnje PCB doneta na Stokholmskoj konvenciji o perzistentnim organskim zagađivačima 2001. godine uz zahtev zemljama potpisnicama da postepeno i bezbedno unište svu opremu koja sadrži PCB i to do 2028. godine (UNEP, 2001). Bez obzira na zabranu, zahvaljujući visokoj perzistentnosti, metaboličkoj inertnosti, lipofilnosti, ali i neodgovarajućem odlaganju električne opreme poput transformatora i kondenzatora proizvedenih pre zabrane, ove hemikalije su i dalje prisutne u životnoj sredini (Consonni i sar, 2012). Stoga su bez obzira na svetsku zabranu

proizvodnje, ove hemikalije i dalje značajne sa aspekta zdravlja opšte populacije, te su i detektovane u uzorcima krvi, masnog tkiva i mleku dojilja širom sveta (Bergkvist i sar, 2015; Schettgen i sar, 2015). Opšta populacija izložena je PCB prvenstveno putem konzumiranja hrane, posebno ribe, mesa i mlečnih proizvoda u koju PCB dospevaju u procesima bioakumulacije i biomagnifikacije (ATSDR, 2000). Značajan udeo u ukupnoj izloženosti ima i inhalacija PCB putem ambijentalnog vazduha i prašine (Hu i sar, 2012) u koje mogu dospeti pri radu električnih uređaja koji sadrže PCB kao dielektrične fluide, a koji su proizvedeni pre zabrane PCB.

### 1.2.1. Toksikokinetika

Studije ukazuju da se nakon oralne izloženosti, individualni kongeneri i njihove smeše brzo resorbuju iz GIT-a, a nakon ulaska u cirkulaciju PCB se prenose lipidnom frakcijom, pre svega LDL frakcijom holesterola i tako distribuiraju kroz organizam u zavisnosti od strukture i fizičko-hemijskih karakteristika individualnih kongenera. Dominantno dospevaju u jetru da bi se potom redistribuirali u masno tkivo i tkiva sa višim sadržajem masti gde se akumuliraju. Količina PCB koja se nalazi u masnom tkivu rezultat je akumulacije PCB tokom života jedinke, ali se u uslovima termogeneze, gubitka telesne mase (t.m) i stresa, usled lipolize, deo ovih PCB oslobađa u cirkulaciju (Crinnion, 2011). Procenjuje se da poluvreme života PCB u organizmu iznosi 10-15 godina (Roland Ritter, 2010).

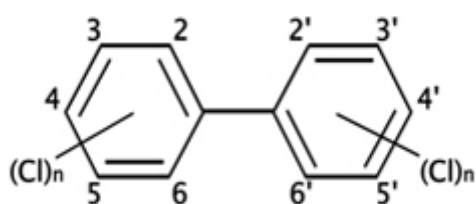
Metabolizam PCB odvija se prvenstveno preko jetrenih citohrom P-450-zavisnih monooksigenaznih sistema. Hidroksilovani produkti su najznačajniji metaboliti pri čemu se hidroksilacija dešava pre svega u *meta* i *para* pozicijama ukoliko ovi položaji nisu supstituisani Cl. Kao intermedijeri u metabolizmu PCB mogu nastati i epoksidi koji su reaktivni i mogu se spontano ili pod uticajem enzima konvertovati u produkte koji se potom eliminišu iz organizma ili pak, grade potencijalno toksična jedinjenja koja se kovalentno vezuju za

različite makromolekule, proteine, lipide ili molekule DNK, te je poznavanje metabolizma PCB neophodno i zbog činjenica da ovim procesima nastaju brojni aktivni metaboliti. Osim hidroksilovanih i potom konjugovanih metabolita, pre svega sa GSH i glukuronskom kiselinom, identifikovani su i drugi metaboliti poput onih koji sadrže sumpor, te parcijalno dehlorinovani metaboliti.

## 1.2.2. Mehanizmi toksičnosti

Usled mogućnosti vezivanja atoma Cl za različita mesta u molekulu bifenila n ispoljavaju se stereohemijske razlike koje utiču na planarnost molekula te i na mehanizme toksičnosti PCB.

### 1.2.2.1. Mehanizmi toksičnosti dioksinima sličnih PCB



Slika 1. Hemijska struktura PCB

Kvantitativne studije odnosa strukture i aktivnosti (QSAR studije) pokazale su da PCB kongeneri sa Cl kao supstituentom (Slika 1) u oba para (4 i 4') položaja, dva ili više meta položaja (3, 3', 5, 5') i nijednim ili samo jednim Cl u orto

položaju (2, 2', 6, 6') u organizmu deluju slično 2,3,7,8-TCDD, pa se ovi kongeneri često nazivaju dioksinima slični PCB (DL-PCB). Ovoj grupi pripadaju PCB 77, PCB 81, PCB 126, PCB 169 (nemaju Cl u orto položaju) i PCB 105, PCB 114, PCB 118, PCB 123, PCB 156, PCB 157, PCB 167 i PCB 189 (imaju jedan Cl u orto položaju), pri čemu su PCB 77, PCB 126 i PCB 169 najtoksičniji poznati PCB kongeneri. Kako u orto položaju nemaju glomazne supstituente koji bi sterno ometali rotaciju prstenova oko bifenilske veze često se ova grupa PCB kongenera u literaturi navodi kao koplanarni PCB, iako ova terminologija nije odgovarajuća s obzirom na to da ove molekule za razliku od dioksina i furana ne formiraju lako planarnu konfomaciju. Njihova struktura im omogućava

vezivanje za receptore za aromatične ugljovodonike (AhR), transkripcione faktore uključene u metabolizam ksenobiotika (Xiao i sar, 2015), koji nemaju afinitet za endogene ligande već za brojne ksenobiotike, poput dioksina i DL-PCB (Beischlag i sar, 2008). Ovaj receptor se nalazi u citoplazmi ćelija kao inaktivni kompleks sa heat-shock proteinima, kao i drugim proteinima poput p23 proteina (Cox i Miller, 2004). Nakon vezivanja za ligande, AhR ulazi u jedro ćelije, odvaja se od proteina za koje je bio vezan u citoplazmi i formira heterodimer sa aril hidrokarbon receptor nuklearnim translokatorom (ARNT). Kompleks AhR-ARNT vezuje se za promoter deo odgovarajućih gena (Korashy i El-Kadi, 2004; Schlezinger et al., 2006), pri čemu dolazi do indukcije velikog broja enzima, pre svega CYP enzima-metilholantren-tipa (CYP1A1 i 1A2) koji su uključeni u biotransformaciju ksenobiotika. Kao rezultat prekomerne ekspresije CYP1A1 enzima može doći do povećane ROS produkcije. Naime, relativno spora oksidacija izvesnih PCB dovodi do „otvaranja“ CYP1A1 katalitičkog kruga i „curenja“ ROS koji potom dovode do nastanka oksidativnog stresa (Schlezinger i sar, 2006). Osim do porasta oksidativnog stresa, DL-PCB vezivanjem za AhR mogu dovesti i do indukcije ćelijske inflamacije koja je u velikoj meri posredovana nuklearnim faktorom  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Wu i sar, 2014). Istraživanja su pokazala da aktivacija NF- $\kappa$ B izaziva ekspresiju gena koja dovodi do oslobađanja proinflamatornih citokina i adhezivnih molekula koji aktiviraju ćelije imunološkog odgovora i dovode do razvoja inflamacije (Baker i sar, 2011). Ispitivanja na eksperimentalnim životinjama pokazala su da kongeneri ove grupe PCB dovode do remećenja homeostaze bioelemenata poput Zn (Lai i sar, 2010), Cu (Lai i sar, 2013) i Se (Lai i sar, 2011), smanjenja nivoa GSH u jetri (Lai i sar, 2010), kao i do smanjenja aktivnosti enzima antioksidativnog sistema zaštite (Twaroski i sar, 2001).

### 1.2.2.2. Mehanizmi toksičnosti PCB koji nisu slični dioksinima

Kongeneri koji sadrže više od jednog atoma Cl u orto položaju, usled sternih interakcija između H i Cl atoma kao posledica stvaranja čvrste veze orto supstituenta sa prstenom, ne zauzimaju planarnu konformaciju u prostoru te se ne mogu vezati za AhR i stoga nemaju sličnost sa dioksinima. Ovi kongeneri, kojih ima 197, svoje efekte ispoljavaju drugim mehanizama toksičnosti, a pri tome im je toksičnost manja od toksičnosti DL-PCB (ATSDR, 2000; Van Den Berg i sar, 1998).

Mnoštvo sprovedenih istraživanja i procena rizika fokusirano je i na DL-PCB i NDL-PCB, premda su NDL-PCB, kao što su PCB 138, 153 i 180, znatno više zastupljeni u različitim uzorcima. Tako je WHO istraživanje sprovedeno u periodu od 2001. do 2002. godine na 102 uzorka mleka dojlja iz 26 zemalja širom sveta ukazalo da NDL-PCB čine 90% ukupnog sadržaja PCB (Eljarrat i sar, 2003). Novije studije pokazale su da upravo NDL-kongener PCB 153 ima najveći udeo u ukupnom sadržaju PCB kongenera u ljudskom organizmu (Agudo i sar, 2009, Axelrad i sar, 2009; Moon i sar, 2009). Rezultati ovih studija ukazuju na značaj ove grupe kongenera i na činjenicu da se procena rizika PCB po zdravlje ljudi bazirana samo na primeni TEF koncepta ne može prihvatiti.

Polihlorovani bifenili koji nisu slični dioksinima, prema dosadašnjim ispitivanjima, svoju toksičnost ispoljavaju aktiviranjem ekspresije enzima iz familije CYP enzima fenobarbital-tipa i to vezujući se za konstitutivne androstanske receptore (CAR) odnosno pregnanske X receptore (PXR). Nakon vezivanja za PXR, PXR formira heterodimer sa retinoidnim X receptorom i vezuje se za odgovarajuće gene, i to u promotorskoj regiji, regulišući njihovu transkripciju. Ovi geni kodiraju metaboličke enzime, poput CYP 3A4, UDP-glukuronosulfatrasferaze 1A1 i MDR 1 (Bao i sar, 2013). Postoje dokazi da toksičnost izazvana NDL-PCB može biti i rezultat pokretanja inflamacije preko aktivacije NF- $\kappa$ B (Kwon i sar, 2002), mada tačan mehanizam ostaje nepoznat.

### 1.2.3. Toksični efekti

Brojni toksični efekti PCB uočeni su na ljudima, eksperimentalnim životinjama i ćelijskim kulturama.

Najbolje opisani toksični efekti PCB na ljudima su efekti koji su se javili nakon konzumiranja pirinčanog ulja kontaminiranog PCB i PCDF u Japanu 1968. godine (*Yusho*) i na Tajvanu 1979. godine (*Yu-Cheng*). Uočeni simptomi i toksični efekti uključivali su hlorakne, hiperpigmentaciju i druge dermalne promene, zatim toksične efekte na jetru, hronični bronhitis, imunosupresiju, endokrine efekte, neuropatiju, indukciju različitih enzima, te endokrine i neurobihevijoralne efekte na novorođenčadima čije su majke bile izložene ovim hemikalijama (WHO, 2000).

Hepatotoksičnost je dokazana na životinjama izloženim komercijalnim smešama PCB ili pojedinačnim kongenerima pri različitim putevima ekspozicije, a jetra se smatra i ciljnim organom toksičnosti ovih hemikalija. U ovim studijama uočene su: indukcija mikrozomalnih enzima, povećani serumski nivoi jetrenih enzima i lipida, promene u metabolizmu porfirina i vitamina A, uvećana jetra, te histopatološki nalazi koji ukazuju na različita oštećenja hepatocita (Esteban i sar, 2014; Kutlu i sar, 2007; Roos i sar, 2011; Sekaran i sar, 2012). Studije sprovedene na izolovanim hepatocitima pacova, jetri pacova i ćelijskim subfrakcijama ljudskih hepatocita ukazale su da komercijalna smeša Aroclor 1254 ispoljava citotoksične efekte na hepatocite i njihovu mitohondrijalnu funkciju (Aly i Domènech, 2009; Scott Obach i Dobo, 2008). Smatra se da su za razvoj toksičnih efekata PCB na jetru odgovorni i zavisni i nezavisni AhR mehanizmi toksičnosti. Tako se nastanak toksičnih efekata u jetri objašnjava AhR zavisnim mehanizmima odnosno visokom ekspresijom jetrenog CYP 1A1 enzima, povećanom produkcijom ROS, promenama u redoks statusu jetre i pokretanjem oksidativnog stresa i inflamacije (Glauert i sar, 2008; Wang i sar, 2011), kao i AhR nezavisnim

mehanizmima koji uključuje pre svega aktivaciju CAR zavisnih mehanizama odnosno indukciju enzima CYP2B1 i UDP-glukuronoziltransferaze.

Neurotoksičnost se ispoljava suptilnim, ali dugoročnim neurološkim oštećenjima koja rezultuju različitim poremećajima u učenju, problemima u pamćenju, neurohemijskim i neurobihevijoralnim promenama (Roegge i sar, 2006; Schantz i sar, 2003). Epidemiološki i eksperimentalni podaci potvrđuju da ekspozicija PCB izaziva negativne efekte na neuropsihološke funkcije dovodeći do različitih kognitivnih i psihomotornih smetnji (Fonnum et al., 2006). Međutim, ćelijski i molekularni mehanizmi kojima PCB dovode do ovih poremećaja i dalje nisu u potpunosti ispitani. Pokazano je da PCB izazivaju porast ROS u ćelijskim kulturama neurona koji mogu dovesti do apoptoze (Dreiem i sar, 2009), kao i izraženu lipidnu peroksidaciju u hipokampusu (Selvakumar i sar, 2012) te promene u aktivnosti membranskih ATPaza i Ach-esteraze što dovodi do poremećaja ćelijske homeostaze i akumulacije Ach (Venkataraman i sar, 2008). Takođe, uočeno je i smanjenje nivoa dopamina u mozgu, posebno značajno za ND1-PCB, kao rezultat direktne ili indirektno inhibicije tirozin hidrosilaze, dekarboksilaze L-aromatičnih aminokiselina i/ili smanjenog preuzimanja dopamina u vezikule (ASTDR, 2000).

Brojni dokazi ukazuju da PCB ili njihovi metaboliti deluju kao endokrini ometači, odnosno da imitiraju, blokiraju ili menjaju normalnu hormonsku funkciju (De Coster i van Larebeke, 2012; Kretschmer i Baldwin, 2005).

Iako je sposobnost PCB da ometaju tireoidnu funkciju nagoveštena pre nekoliko decenija, detaljnija istraživanja o uticaju PCB na tireoidnu funkciju sprovedena su poslednjih nekoliko godina. Epidemiološke studije pokazale su da čak i niski nivoi PCB prisutni u životnoj sredini mogu uticati na nivo tireoidnih hormona (Schell i sar, 2008; Turyk i sar, 2007), što je pokazano i u studijama koje su uključile trudnice (Chevrier i sar, 2008). Eksperimentalne studije ukazuju da PCB utiču i na sintezu i na metabolizam tireoidnih hormona, te da najčešće dovode do smanjenja nivoa tireoidnih hormona, a posebno T4 hormona (Gauger i sar, 2004; Martin i Klaassen, 2010). Uočen je uticaj na



hipotalamusno-hipofizno-tiroidnu osovinu i to kao smanjenje odgovora hipofize na hipotalamusni tireotropni hormon, čime dolazi do smanjene sinteze TSH, pa samim tim i smanjene produkcije T4 hormona (Khan i Hansen, 2003). Histopatološke promene zabeležene su u samoj žlezdi kao i poremećaji u proizvodnji folikularnog koloida potrebnog za normalnu produkciju i sekreciju tireoidnih hormona (ATSDR, 2000). Osim u procesu sinteze hormona T4, pokazano je da PCB utiču i na periferni metabolizam hormona štitaste žlezde. Utvrđeno je da enzim UDP-glukuroniltransferaza, koji se nalazi u jetri i skraćuje poluživot T4 u serumu, može biti indukovano DL-PCB kongenerima preko AhR, kao i NDL-PCB kongenerima preko PXR ili CAR receptora (Craft i sar, 2002; Hood i Klaassen, 2000). Utvrđeno je da ometanju funkcije štitaste žlezde više doprinose kongeneri koji nisu slični dioksinima (Martin i Klaassen, 2010), ali i da dioksinima slični PCB imaju učešća u ometanju homeostaze ove žlezde (Chauhan i sar, 2000; Viluksela i sar, 2004). Perinatalna ekspozicija PCB se dovodi u vezu sa smanjenim nivoima tireoidnih hormona u mladuncima eksperimentalnih životinja i sa nastankom neurotoksičnih razvojnih efekata PCB na mozak mladunaca (Crofton, 2004).

Efekat PCB kao endokrinih ometača ispoljava se i preko njihovih efekata na estrogene i androgene receptore kojima se objašnjava i uloga PCB u poremećenom seksualnom razvoju mladunaca nakon perinatalne ekspozicije PCB. Na primer, za PCB 138, 153 i 180 je dokazano da se kompetitivno vezuju i za estrogene i za androgene receptore (Bonefeld-Jorgensen i sar, 2001). Tačnije, DL-PCB ponašaju se kao slabi estrogeni agonisti, dok se viši hlorovani kongeneri ponašaju kao slabi antagonisti estrogenih receptora. Osim efekata na estrogene receptore, ometanje endokrine funkcije može se dešavati i preko efekata PCB i njegovih metabolita na inhibiciju estrogen sulfotransferaze, pri čemu dolazi do povećanih nivoa estrogena (Diamanti-Kandarakis i sar, 2009) i estradiola (Kester i sar, 2000). Takođe, dokazano je da PCB ispoljavaju antiandrogene efekte (Bonefeld-Jorgensen i sar, 2001).

Postoje brojne studije koje potvrđuju vezu između povišenih nivoa PCB u serumu i razvoja metaboličkog sindroma, povećanja rezistencije na insulin i smanjenja sinteze insulina, ali tačna uloga PCB u nastanku *Diabetes mellitus*-a je još uvek nerazjašnjena (Everett i sar, 2011).

Epidemiološki podaci i studije na životinjama ukazuju na nesumljivu imunotoksičnost ovih hemikalija. Uočene su morfološke i funkcionalne promene kao što su atrofija timusa i slezine, smanjena produkcija antitela na organizmu strane antigene poput tetanusnog toksina i crvenih krvnih zrnaca ovaca, a primećena je i povećana osetljivost izloženih eksperimentalnih životinja na infekcije (ATSDR, 2000).

Epidemiološke studije sprovedene na profesionalno izloženim osobama pokazale su da PCB ne izazivaju hematotoksične efekte (ATSDR, 2000), ograničeni broj eksperimentalnih studija pak ukazuju na sposobnost PCB da izazovu anemiju praćenu smanjenim sadržajem hemoglobina (Hb), smanjenjem hematokrita, broja eritrocita (Er) i eozinofilijom (Chu i sar, 1998). Ovi efekti na hematološki sistem objašnjavaju se toksičnim efektima PCB na jetru, njihovom sposobnošću da ispoljavaju estrogenima slične efekte, te remećenjem homeostaze Fe (Wang et al., 2013). Međutim, imajući u vidu kontradiktorne rezultate dobijene u epidemiološkim i različitim eksperimentalnim studijama, hematotoksičnost PCB nije još uvek jasno potvrđena i objašnjena.

Ranije sprovedene studije nisu ukazale na toksične efekte PCB na bubrege eksperimentalnih životinja (Hansen i sar, 1995). Međutim, u subhroničnim eksperimentalnim studijama koje su usledile utvrđene su histopatološke promene bubrega, kao i promene nivoa biomarkera nefrotoksičnosti (Kutlu i sar, 2007). Pretpostavlja se da PCB utiču na fluidnost membrane kulture renalnih ćelija (López-Aparicio i sar, 1997), dok su studije na eksperimentalnim životinjama potvrdile oksidativni stres u bubrezima tretiranih pacova (Banudevi i sar, 2006), kao i indukciju enzima citohrom P450 u bubrezima (Beebe i sar, 1995).

#### 1.2.4. Karcinogenost

Prvi kongener klasifikovan 2012. godine, prema IARC-u, u grupu 1 (karcinogeni za ljude) je bio PCB 126 (IARC, 2012), a dve godine kasnije PCB su prebačeni iz grupe 2A – verovatno karcinogeni za ljude u grupu 1 – karcinogeni za ljude (IARC, 2014). Karcinogenost PCB u ljudi istraživana je u retrospektivnim kohortnim studijama sprovedenim na osobama koje su bile izložene PCB na radnom mestu, kao i u studijama koje su ispitivale povezanost nivoa PCB u serumu i masnom tkivu ljudi izloženih PCB u životnoj sredini i učestalosti javljanja karcinoma. Polihlorovani bifenili izazivaju maligni melanom kod ljudi, a utvrđena je i veza između izloženosti ovim hemikalijama i razvoja non-Hodžkinovog limfoma i raka dojke kod ljudi.

Smatra se da postoje brojni mehanizmi kojima PCB i njihovi metaboliti mogu dovesti do razvoja karcinoma. Kongeneri koji imaju manji broj atoma Cl dovode do razvoja oksidativnog stresa i genotoksični su, dok kongeneri sa većim brojem Cl atoma u molekulu su veoma perzistentni i intereaguju sa brojnim receptorima u ćelijskom jedru te se ponašaju pre svega kao ne-genotoksični karcinogeni i dovode do promocije tumora (IARC, 2014).

### 1.3. TOKSIKOLOGIJA SMEŠA

Evaluacija potencijalne opasnosti po zdravlje ljudi od izloženosti smešama različitih hemikalija predstavlja jedan od najvećih izazova u toksikologiji. Veliki broj supstanci se istovremeno nalazi u ekosistemima, lancima ishrane, a epidemiološka istraživanja ukazala su i na prisustvo velikog broja hemikalija u ljudskom organizmu. Tako je 2009. godine Centar za kontrolu i prevenciju bolesti objavio četvrti nacionalni izveštaj o izloženosti hemikalijama iz životne sredine (CDC, 2009) koji predstavlja najdetaljniju procenu izloženosti populacije SAD hemikalijama iz životne sredine. Tom prilikom utvrđeno je prisustvo 212 hemikalija u ljudskoj krvi ili urinu među

kojima su se nalazila brojna organohlorna jedinjenja i toksični metali. Naravno, sama detekcija ovih supstanci u organizmu ne znači nužno da će ove hemikalije u organizmu dovesti do toksičnih efekata, ali ovi podaci daju nedvosmisleno potvrdu značaja toksikološkog istraživanja „koktel efekta“ prisutnih smeša u našem organizmu.

Predloženo je više različitih koncepata u istraživanju toksičnosti smeša. Jedan od njih je „istraživanje celih smeša“ u kojem se istražuju kompleksne smeše kao celine dok se efekti pojedinačnih komponenata prisutnih u smešama ne razmatraju. Ovaj pristup koristan je za istraživanje specifičnih smeša, ali ne daje uvid u to kako pojedinačne komponente doprinose ukupnom efektu smeša. Da bi se razumeo doprinos pojedinačnih komponenata smeše ukupnom efektu smeše treba primeniti pristup koji razmatra i komponente smeše odnosno pristup kojim se predviđa efekat smeše na bazi znanja o efektima hemikalija koje ulaze u sastav smeše, pri čemu je neophodno odgovoriti na sledeća pitanja: 1. Da li je moguće predvideti efekte smeša na bazi podataka o toksičnosti pojedinačnih komponenata smeše?, 2. Može li se očekivati rizik pri ekpoziciji većem broju hemikalija prisutnih u niskim dozama?, 3. Kolike su šanse da će hemikalije intereagovati jedna sa drugom dovodeći do sinergizma ili antagonizma i koji su to faktori koji determinišu potencijal za interakcije?, itd.

Jedan od često upotrebljivanih metoda za procenu rizika od izloženosti smešama je metoda koja se bazira se na primeni koncepta aditivnosti i koja isključuje mogućnost pojave interakcije komponenata u smeši (ATSRD, 2004). Ovaj koncept uključuje primenu pristupa „sume aditivnosti“ ili „sume odgovor/efekat“. Za procenu toksičnosti i ekotoksičnosti pri izloženosti smešama različitih supstanci koje ne utiču jedna na drugu, odnosno ne stupaju u interakcije u osnovi se mogu primeniti dva pristupa: “suma doza/koncentracija” i “suma odgovora/efekata” (EC, 2012). Pristup “suma doza/koncentracija” može dati pouzdanu procenu kombinovanih efekata komponenata koje imaju sličan mehanizam delovanja, a nemaju uticaj jedna na

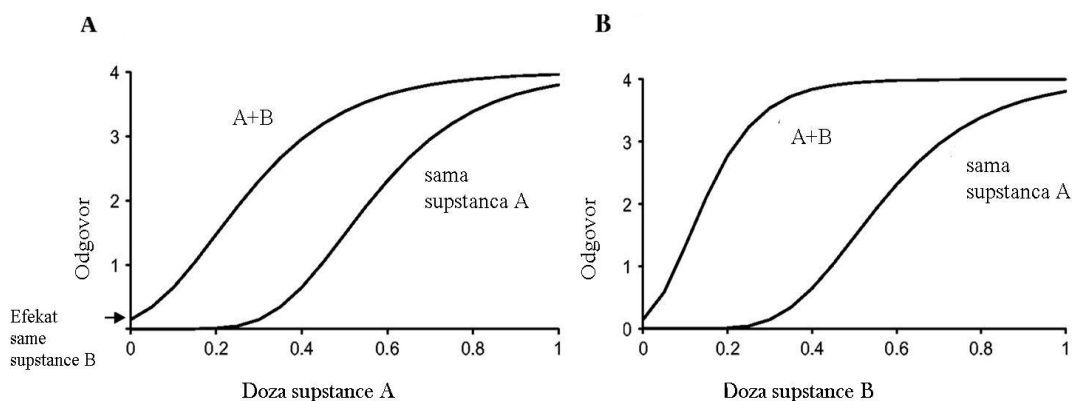
drugu na mestu efekta. Ovaj proces zasniva se na adiciji doza odnosno koncentracija komponenata smeše, pri čemu se u obzir uzima njihova različita potentnost korišćenjem faktora relativne toksičnosti. Ovaj princip pretpostavlja da svaka hemikalija prisutna u smeši, bez obzira na to u koliko maloj količini, doprinosi ukupnoj toksičnosti smeše. Pristup "suma odgovor/efekat" koristi se ukoliko hemikalije komponente smeše deluju različitim mehanizmima toksičnosti ne utičući jedna na drugu. Treba istaći da prema ovom pristupu procene toksičnosti smeša, komponente koje su u smeši prisutne u dozama koje ne daju efekte ne doprinose ukupnoj toksičnosti smeše. Međutim, ove dve metodologije mogu dovesti do različitih procenjenih rizika za istu smešu, što predstavlja problem u situacijama kada nije potpuno jasno za koji koncept se treba opredeliti. Osim toga, primena koncepta aditivnosti u potpunosti zanemaruje mogućnost javljanja interakcija među hemikalijama u smeši, tj. zanemaruje se mogućnost razvijanja jačih odnosno slabijih efekata od očekivanih na bazi adicije doza ili odgovora, kao i mogućnost razvijanja efekata koje pojedinačne komponente ne bi ispoljile. Stoga je razvijen objedinjen koncept koji je u skladu sa obe predložene forme aditivnosti a u obzir uzima i mogućnost nastanka interakcija između komponenata smeše, a koji koristi statistički model koji se bazira na osnovnoj definiciji aditivnosti koju je dao Berenbaum (1985). Prema ovoj definiciji:

$$\sum x_i/E_i=1$$

gde  $i$  ima vrednosti od 1 do  $c$  u kombinaciji  $c$  hemikalija,  $E_i$  predstavlja odnos koncentracija/doza  $i$ -te komponente koja dovodi do fiksnog odgovora, dok  $x_i$  predstavlja odnos koncentracija/doza  $i$ -te komponente u kombinaciji sa  $c$  hemikalijama koja daje isti takav odgovor. Prema tome, ako je leva strana jednaka 1, supstance ne stupaju u interakcije, ukoliko je  $<1$  radi se o odgovoru koji je veći od aditivnog odnosno o sinergizmu, a ako je  $>1$  u pitanju je odgovor manji od aditivnog odnosno radi se o antagonizmu.

Postoje brojne mogućnosti statističke obrade podataka pri proceni interakcija između komponenata smeše od kojih se izdvajaju faktorska analiza,

doza-efekat analiza površine i statističke metode za testiranje odstupanja od aditivnosti. Statistički modeli za testiranje odstupanja od aditivnosti korisni su u detekciji i karakterizaciji interakcija između komponenata smeše, a baziraju se na osnovnom konceptu da interakcije između komponenata smeše dovode do promena u nagibu krive doza-odgovor jedne komponente u prisustvu druge (Teuschler i sar, 2002). Ovaj koncept zasniva se na pretpostavci da ukoliko postoje interakcije između komponenata smeše, nagib krive odnosa doza-odgovor hemikalije se menja u prisustvu jedne ili više drugih hemikalija komponenata smeše. Obrnuto, ako se nagib krive doza odgovor ne menja u prisustvu druge supstance onda hemikalije ne intereaguju tj. kombinuju se aditivno (Gennings i sar 2005; Teuschler i sar, 2002). Grafički prikaz ovog koncepta dat je na Slici 2.



**Slika 2. A.** Odsustvo promena u nagibu između krive doza-odgovor za supstancu A i krive doza-odgovor za supstancu A u prisustvu jedne doze supstance B ukazuje na odsustvo interakcija. **B.** Promena u nagibu između krive doza-odgovor za supstancu A i krive doza-odgovor za supstancu A u prisustvu jedne doze supstance B ukazuje na interakcije između supstanci A i B.

Istovremeno prisustvo Cd i PCB u životnoj sredini, pri čemu Cd kao metal ne podleže biodegradaciji, dok su PCB perzistentne hemikalije, ukazuje na značaj istraživanja „koktel efekta“ ovih dveju supstanci. Osim toga, iako su ove dve supstance hemijski potpuno različite, kada su u pitanju toksični efekti, kao i mehanizmi tih toksičnih efekata ispoljavaju sličnosti te se može očekivati da u organizmu dolazi i do izvesnih interakcija u njihovom toksičnom delovanju. I pored toga, iako postoje istraživanja vezana za efekte Cd u

kombinaciji sa drugim toksičnim metalima, kao i istraživanja efekata PCB u kombinaciji sa drugim organohlorinim jedinjenjima, toksikološki profil smeše ove dve hemikalije još uvek nije istražen (ATSDR, 2004). Istraživanja toksičnosti smeše ove dve hemikalije od izuzetnog je značaja, naročito ako se u obzir uzme činjenica da se one zajedno mogu naći u životnoj sredini i hrani, kao i da se obe hemikalije nalaze na listama zagađivača od značaja o čemu je bilo reči u poglavljima 1.1. i 1.2. Takođe, ispitivanje tzv. koktel efekta supstanci koje se smatraju endokrinim ometačima, poput Cd i PCB, je od posebnog značaja budući da i dalje postoji nedovoljno saznanja o ovoj problematici te je procenarizika od istovremene izloženosti ovakvim supstancama ograničena (Kortenkamp, 2007). Još jedan problem vezan za ispitivanje toksičnosti smeša je činjenica da se studije toksičnosti smeše uglavnom bave ispitivanjima toksičnosti visokih doza smeše, dok je opšta populacija zapravo izložena smešama koje sadrže komponente u niskim koncentracijama. Stoga se prilikom ekstrapolacije podataka dobijenih u takvim studijama javljaju izvesne nepouzdanosti, a dodatni problem predstavlja činjenica da doze odnosno koncentracije komponentata smeše mogu uticati na pojavu interakcija između komponentata smeša, pa samim tim i na njenu toksičnost. Kako se na osnovu dostupnih literaturnih podataka može zaključiti da se značajne toksične interakcije između komponentata smeše mogu očekivati u dozama ispod nivoa efekata pojedinačnih komponentata, čak i pre nego pri visokim dozama (EFSA, 2008), od izuzetnog je značaja ispitati i toksičnost različitih doznih opsega smeša što je u ovom radu i primenjeno na Cd i PCB.

## 2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Rizik koji toksični metali i perzistentni organski zagađivači predstavljaju po zdravlje ljudi postaje sve značajniji globalni problem današnjice. Literaturni podaci ukazuju da njihovi značajni predstavnici, Cd i PCB, ispoljavaju toksične efekte na jetru, bubrege, hematopoetski sistem, te da mogu ispoljiti efekte endokrinih ometača na nivou štitaste žlezde, ali daju nedovoljno informacija o doznoj zavisnosti ovih efekata, posebno o toksičnim efektima niskih doza, doza koje odgovaraju nivoima izloženosti opšte populacije. Pretpostavka je da niske doze mogu izazvati toksične efekte na posebno osjetljivim tkivima organizma kao što je štitasta žlezde imajući u vidu visoku osjetljivost procesa hormonske regulacije u organizmu.

Prethodna istraživanja ukazuju da se toksični efekti Cd i PCB mogu delom objasniti istim mehanizmima toksičnosti, od kojih značajnu ulogu imaju nastanak oksidativnog stresa i poremećaj homeostaze bioelemenata, ali nema dovoljno podataka o dominantnim putevima nastanka ovih poremećaja, kao ni o doznoj zavisnosti parametara značajnih za ove mehanizme toksičnosti.

Poseban problem u okviru toksičnosti Cd i PCB, predstavlja istovremena izloženost ovim hemikalijama što je i realan scenario. Dosadašnja istraživanja ne daju odgovor na pitanje da li se pri istovremenoj izloženosti Cd i PCB mogu javiti toksični efekti različiti kako po prirodi tako i po intenzitetu od efekata izloženosti pojedinačnim supstancama. U okviru ispitivanja toksičnosti smeše Cd i PCB neophodno je utvrditi i da li će primena smeša različitih doza Cd i PCB rezultirati nastankom toksičnih efekata koji se pri primeni pojedinačnih agenasa ne javljaju. Za razliku od dostupnih podataka o toksičnosti pojedinačno primenjenih hemikalija prikupljenih iz brojnih eksperimentalnih studija, podaci o toksičnim efektima i mehanizmima toksičnosti smeše Cd i PCB vrlo su retki, dok studije u kojima se porede efekti pojedinačnih supstanci sa efektima njihove smeše, prema našim saznanjima, ne postoje.



Ciljevi ove doktorske disertacije bili su da se izvrši:

- ispitivanje toksičnih efekata Cd primenom šest različitih doza Cd ili PCB (opseg obuhvata i niske doze koje odgovaraju izloženosti opšte populacije) na prirast t.m, hematološke parametre, parametre funkcije jetre, bubrega i tireoidne žlezde i dozne zavisnosti tih efekata,
- ispitivanje uticaja Cd ili PCB na oksidativni status i interakcija Cd ili PCB sa bioelementima kao mogućih mehanizama njihove toksičnosti
- modelovanje odnosa doza–odgovor za ispitivane parametre pri primeni Cd ili PCB, te izračunavanje granične *Benchmark* doze (BMD<sub>5</sub>, odnosno BMD<sub>10</sub>) za kritične toksične efekte i poređenje dobijenih BMD vrednosti sa NOAEL vrednostima vrednostima procenjenim na osnovu rezultata ove studije,
- ispitivanje toksičnih efekata smeše različitih doza Cd i PCB (primenom 3x3 dizajna) na prirast t.m, hematološke parametre, parametre funkcije jetre, bubrega i tireoidne žlezde,
- ispitivanje uticaja smeša Cd i PCB na oksidativni status i i interakcija smeše Cd i PCB sa bioelementima kao mogućih mehanizama toksičnosti,
- utvrđivanje eventualnog prisustva i potom tipa interakcija Cd i PCB na nivou ispitivanih parametara pri primeni različitih smeša Cd i PCB i ispitivanje uticaja doznog režima na prisustvo i tip interakcija Cd i PCB,
- poređenje efekata smeša Cd i PCB i mehanizama njihove toksičnosti sa efektima i mehanizmima toksičnosti pojedinačno primenjenih agenasa Cd ili PCB.

Rezultati ove doktorske disertacije daće doprinos problematici toksičnosti dva značajna zagađivača životne i radne sredine, Cd i PCB, kao i pionirskim istraživanjima toksičnosti smeša ova dva agensa.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. EKSPERIMENT

##### 3.1.1. Hemikalije

- Kadmijum-hlorid,  $CdCl_2 \cdot xH_2O$ , čistoće 99,99% (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Komercijalna smeša PCB, Aroclor 1254 (Elektrodistribucija Beograd, Srbija)- jedna od najčešće upotrebljivanih komercijalnih smeša PCB koja sadrži oba tipa PCB kongenera (Kodavanti i sar, 2001)

##### 3.1.2. Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni mužjaci *Wistar* pacova, početne t.m. 200-240 g nabavljeni sa farme za uzgoj eksperimentalnih životinja Vojnomedicinske akademije, Beograd. Životinje su čuvane u plastičnim kavezima sa žičanom rešetkom na vrhu, u klimatski kontrolisanim uslovima, na temperaturi od 20-24°C, pri relativnoj vlažnosti vazduha 40-60% i kontrolisanom i konstantnom dan-noć ciklusu (svetlost/mrak; 12h/12h). Životinjama su tokom eksperimenta, hrana (smeša za ishranu laboratorijskih životinja, Veterinarski zavod „Subotica“) i voda bili na raspolaganju *ad libitum*. Sa eksperimentalnim životinjama se postupalo u skladu sa vodičem za studije na životinjama Etičkog komiteta VMA No. 9667-1/2011.

##### 3.1.3. Eksperimentalni protokol

Period prilagođavanja životinja trajao je 14 dana. U prvom delu eksperimenta, grupama od po sedam eksperimentalnih životinja oralno,

gastroičnom sondom svakog dana tokom 28 dana, su davani pojedinačni otrovi u zapremini od 1 ml/kg t.m. Kontrolnim grupama eksperimentalnih životinja davani su destilovana voda (kao rastvarač za Cd), odnosno kukuruzno ulje (kao rastvarač za PCB) takođe u zapremini od 1 ml/kg t.m. Šest grupa eksperimentalnih životinja je tretirano rastvorima CdCl<sub>2</sub> u destilovanoj vodi sledećih koncentracija Cd: 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5 i 10 mg Cd/kg t.m/dan, a šest grupa životinja tretirano je rastućim dozama PCB i to: 0,5; 1; 2; 4; 8 i 16 mg PCB/kg t.m/dan u obliku rastvora komercijalne smeše Aroclor 1254 u kukuruznom ulju. Doze toksičnih supstanci u eksperimentu su izabrane sa ciljem da odslikaju realnu sliku izloženosti ovim hemikalijama u životnom okruženju, ali i povišenu ekspoziciju (ATSDR, 2000, 2012; Martin i Klaassen, 2010; Wade i sar, 2002). U drugom delu eksperimenta nakon perioda prilagođavanja, devet eksperimentalnih grupa tretirano je, oralnom sondom svakodnevno tokom 28 dana, kombinacijama odabranih doza Cd i PCB (3x3 eksperimentalni dizajn) i to: 1,25 mg Cd/kg t.m/dan + 2 mg PCB/kg t.m/dan, 1,25 mg Cd/kg t.m/dan + 4 mg PCB/kg t.m/dan, 1,25 mg Cd/kg t.m/dan + 8 mg PCB/kg t.m/dan, 2,5 mg Cd/kg t.m/dan + 2 mg PCB/kg t.m/dan, 2,5 mg Cd/kg t.m/dan + 4 mg PCB/kg t.m/dan, 2,5 mg Cd/kg t.m/dan + 8 mg PCB/kg t.m/dan, 5 mg Cd/kg t.m/dan + 2 mg PCB/kg t.m/dan, 5 mg Cd/kg t.m/dan + 4 mg PCB/kg t.m/dan, 5 mg Cd/kg t.m/dan + 8 mg PCB/kg t.m/dan. Odabir doza pojedinačnih toksičnih supstanci koje su korišćene u drugom delu eksperimenta vršen je nakon analize rezultata dobijenih u prvom delu eksperimenta. U toku perioda ekspozicije svakodnevno su praćeni telesna masa životinja i unos hrane i vode.

Dvadeset osmog dana životinje su izmerene i izračunat je prinos mase životinja prema formuli:  $(m_f - m_i) / m_i$ , gde je  $m_f$ -masa životinje na dan žrtvovanja, a  $m_i$ -masa životinje prvog dana eksperimenta. Po završetku eksperimenta životinje su žrtvovane dekapitacijom i prikupljena je krv i sledeći organi: jetra, bubrezi i štitasta žlezda. Iz pune krvi određivani su hematološki parametri, sadržaj Cd i bioelemenata, iz seruma su ispitivani biohemijski

parametri funkcije jetre i bubrega, kao i parametri funkcije štitaste žlezde. Uzorci jetre i bubrega korišćeni su za određivanje koncentracije ispitivanih toksičnih supstanci, bioelemenata i odabranih parametara oksidativnog stresa. Odmah po žrtvovanju eksperimentalnih životinja, izmerene su mase jetre, bubrega i štitaste žlezde i izračunata relativna masa ovih organa korišćenjem formule: relativna masa (%)=(masa organa/konačna masa životinje)\*100. Puna krv za ispitivanje hematoloških parametara i serum uzeti su odmah u rad, delovi organa za ispitivanje parametara oksidativnog stresa odmah su zamrznuti u tečnom azotu, a zatim čuvani na -80°C, dok su ostali uzorci čuvani na -20°C do početka odgovarajućih analiza.

## 3.2. BIOHEMIJSKA ISPITIVANJA

### 3.2.1. Određivanje hematoloških parametara

Hematološki parametri određivani su u uzorcima pune krve, uz dodatak 6% K<sub>2</sub>EDTA kao antikoagulansa. Broj Er, leukocita (Leu) i trombocita (Tr) određen je metodom protočne citometrije, dok je sadržaj Hb određen standardnom kolorimetrijskom metodom. Sve korišćene metode akreditovane su prema standardima Sistema Menadžmenta Kvalitetom Laboratorije ISO/IEC 17025:2006. Analize su rađene na hematološkom analizatoru (*Advia 120 Hematology System, Siemens, Erlangen, Nemačka*). Broj Er predstavljen je kao 10<sup>12</sup>/L, Leu kao 10<sup>9</sup>/L, a Hb u g/L.

### 3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima funkcije jetre i koncentracije albumina u serumu

U uzorcima seruma pacova određivane su aktivnosti enzima ALT, AST i ALP korišćenjem standardnih spektrofotometrijskih metoda po preporukama *International Federation of Clinical Chemistry* (Schumann i sar, 2011, 2002a, 2002b).

Koncentracija albumina određivana je metodom sa bromkrezol-zelenom bojom koja se zasniva na promeni apsorpcionog maksimuma boje kada se za nju veže albumin, pri čemu se ovaj reagens specifično vezuje za albumin u prisustvu drugih proteina seruma, a nastala boja se meri na 628 nm (Robertson, 1981). Sva merenja vršena su na automatskom analizatoru (*Cobas® 6000 Analyzer Series, Roche Diagnostics, SAD*), a sve korišćene metode akreditovane su prema standardima Sistema Menadžmenta Kvalitetom Laboratorije ISO/IEC 17025:2006. Vrednosti albumina u serumu su izražene u g/L, a ispitivanih enzima u U/L.

### 3.2.3. Određivanje parametara funkcije bubrega u serumu

U uzorcima seruma pacova određivana je koncentracija uree korišćenjem kinetičko-spektrofotometrijske metode koja se zasniva na dvostrukoj enzimskoj katalizi i primeni *Warburg-Christianov*-og optičkog testa. U ovoj metodi koristi se sistem koji sadrži ureazu i glutamat dehidrogenazu uz NAD ili NADP kao koenzime, pri čemu se optički test bazira na osobini redukovanih oblika piridin-koenzima (NADH<sub>2</sub> ili NADPH<sub>2</sub>) da apsorbuju svetlost talasnih dužina 340–360 nm, dok njihovi oksidovani oblici (NAD ili NADP) ne apsorbuju svetlost u ovom području (Hallett i Cook, 1971). Koncentracija kreatinina određivana je korišćenjem kinetičke *Jaffe* metode koja se zasniva na reakciji kreatinina sa alkalnim pikratom pri čemu nastaje crveno-narandžasti Janovski kompleks čija se apsorbanacija meri na 520 nm. Oba merenja vršena su na automatskom analizatoru (*Cobas® 6000 Analyzer Series, Roche Diagnostics, SAD*), a metode su akreditovane prema standardima Sistema Menadžmenta Kvalitetom Laboratorije ISO/IEC 17025:2006. Vrednosti uree u serumu su izražene u mmol/L, a kreatinina u μmol/L.

### 3.2.4. Određivanje hormona štitaste žlezde u serumu

U uzorcima seruma pacova određivane su koncentracije T4, T3, slobodnog tiroksina (FT4), i slobodnog trijodtironina (FT3) korišćenjem elektro hemiluminiscentnog imunoeseja (ECLIA) na automatskom analizatoru (*Cobas® 6000 Analyzer Series, Roche Diagnostics, SAD*). Metode su akreditovane prema standardima Sistema Menadžmenta Kvalitetom Laboratorije ISO/IEC 17025:2006. Vrednosti za T3 i T4 se izražavaju u nmol/l, za FT3 i FT4 u pmol/l.

### 3.3. ODREĐIVANJE METALA U UZROCIMA JETRE, BUBREGA I KRVI

Koncentracija Cd, Cu, Zn, Mn, Se i Fe određivana je iz rastvora razorenih uzoraka jetre, bubrega i krvi metodom masene spektrometrije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) na instrumentu *iCap Q (Thermo Scientific, Bremen, Nemačka)*.

#### 3.3.1. Reagensi i standardi

Nitratna kiselina (HNO<sub>3</sub>) 64% p.a. (*Merck, KGaA, Darmstadt, Nemačka*) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% p.a. (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, SAD*) su nabavljeni iz komercijalnih izvora, kao i osnovni standardni rastvori ispitivanih elemenata za plazma emisionu spektrometriju koncentracije 1000±10 mg/L u 2% HNO<sub>3</sub> (*Reagecon Diagnostic Ltd., Shanon Free Yone, Shanon, Co. Clare, Irska*). Od osnovnih standardnih rastvora metala do radnih standardnih rastvora za kalibraciju pravljena su razblaženja sa 5% HNO<sub>3</sub>. Tačnost metode proverena je primenom sertifikovanih referentnih materijala (*Standard Reference Material 1577c-Bovine liver, NIST, NY, SAD* i *Seronam™ Trace Elements Whole Blood, Sero AS, Billingstad, Norveška*). Interni standard više elemenata u 2% HNO<sub>3</sub> Bi, Ga, I, Tb (*VHG Labs part of LGC Standards, SAD*) i *tuning* rastvor (*Tune B iCAP q, Analytica, Prag, Češka*) takođe su nabavljeni iz komercijalnih izvora.

### 3.3.2. Priprema uzoraka

Uzorci od oko 1 g tkiva (jetre ili bubrega), odnosno 1 ml heparizovane pune krvi odmeravani su na analitičkoj vagi, odnosno odpipetirani u teflonsku posudu aparata za mikrotalasnu digestiju (*Ethos One, Milestone, Sorisole, Italija*), a zatim je dodavana smeša oksidacionih sredstava za digestiju: 7 ml konc. HNO<sub>3</sub> i 1 ml konc. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uslovi za mineralizaciju ispitivanog uzorka su postignuti podešavanjem sledećih parametara programa digestije: postizanje temperature od 200 °C tokom 15 min, te održavanje postignute temperature narednih 15 min i ventilacija u trajanju od 15 min.

### 3.3.3. Određivanje koncentracije metala

Uzorci pripremljeni na prethodno opisan način kvantitativno su prenošeni u normalne sudove i razblaživani korišćenjem dejonizovane vode (*ELGA PURELAB Prima, Bucks, Velika Britanija*), a zatim je u tim rastvorima određivana koncentracija metala metodom ICP-MS na instrumentu *iCap Q*, opremljenim kolizionom ćelijom u KED (*kinetic energy discrimination*) sistemu rada. Određivani su <sup>111</sup>Cd i sledeći bioelementi: magnezijum (<sup>24</sup>Mg), mangan (<sup>55</sup>Mn), gvožđe (<sup>57</sup>Fe), bakar (<sup>63</sup>Cu), cink (<sup>66</sup>Zn) i selen (<sup>77</sup>Se). Osnovni uslovi rada instrumenta prikazani su u Tabeli 1.

**Tabela 1. Uslovi rada instrumenta *iCap Q***

Snaga radiofrekventnog generatora	1550 W
Brzina protoka hladećeg gasa	14 L/min
Brzina unošenja uzorka	1 L/min
Brzina protoka gasa za rasprašivanje	1 mL/min
Operativni mod	KED
Rezidualno vreme	10 ms (Mn, Fe, Cu, Zn, Mg, Ca, Se); 100 ms (Cd)
<i>Sampling cone</i>	Platina, 1 mm dijametar otvora
<i>Skimmer cone</i>	Platina, 0.75 mm dijametar otvora

Pozicija plazmenog plamenika, optička podešavanja i podešavanja detektora rađena su na dnevnom nivou upotrebom rastvora koji sadrži Ba, Bi,

Ce, Co, In, Li, U u koncentracijama  $1,00 \pm 0,05 \mu\text{g/L}$  pri  $20^\circ\text{C}$  (*tuning solution*) kako bi se optimizirala merenja i smanjile moguće interferencije.

Za ispitivane elemente urađene su kalibracione krive (koje su uključivale 0) i to u koncentracionim opsezima  $0,1\text{--}2,0 \mu\text{g/L}$  za  $^{111}\text{Cd}$  i  $0,1\text{--}2,0 \text{mg/L}$  za  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{44}\text{Ca}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$  i  $^{77}\text{Se}$ . Dodatna linija peristaltičke pumpe korišćena je za interni standard ( $^6\text{Li}$ ,  $^{45}\text{Sc}$  –  $10 \text{ng/mL}$ ;  $^{71}\text{Ga}$ ,  $^{89}\text{Y}$ ,  $^{209}\text{Bi}$  –  $2 \text{ng/mL}$ ) dobijen rastvaranjem osnovnog internog rastvora sa  $2\% \text{HNO}_3$ ,  $c=100 \mu\text{g/L}$  i izabran tako da pokriva širok spektar masa. Koncentracija svakog merenog elementa je korigovana za faktor većeg i manjeg internog standarda interpolacijom. Tačnost i preciznost analiza je potvrđena analizom standardnog referentnog materijala SRM 1577c (*NIST, Gaithersburg, MD, SAD*). Referentni materijal pripremljen je na isti način kao i uzorci i analiziran na početku, na sredini i na kraju svakog niza odgovarajućih uzoraka. Izmerene koncentracije bile su u okvirima sertifikovanih vrednosti za sve ispitivane elemente (Tabela 2).

**Tabela 2. Sertifikovane i izmerene koncentracije u sertifikovanom referentnom materijalu korišćenom za proveru kvaliteta merenja. Vrednosti su date sa standardnom nesigurnošću.**

Elementi	Sertifikovane vrednosti $\pm U$	Izmerene vrednosti $\pm U$
Cd, $\mu\text{g/kg}$	$97 \pm 1,4$	$97,9 \pm 2,6$
Cu, $\text{mg/kg}$	$275,2 \pm 4,6$	$271,9 \pm 5,7$
Fe, $\text{mg/kg}$	$197,94 \pm 0,65$	$197,43 \pm 5,21$
Zn, $\text{mg/kg}$	$181,1 \pm 1,0$	$180,9 \pm 1,8$
Mn, $\text{mg/kg}$	$10,46 \pm 0,47$	$10,55 \pm 0,25$
Se, $\text{mg/kg}$	$2,031 \pm 0,045$	$2,055 \pm 0,066$
Ca, $\text{mg/kg}$	$840 \pm 74$	$874 \pm 39$
Mg, $\text{mg/kg}$	$2570 \pm 150$	$2470 \pm 190$

### 3.4. ODREĐIVANJE POLIHLOROVANIH BIFENILA U UZORCIMA JETRE I BUBREGA

Sadržaj PCB, tačnije pojedinačnih kongenera (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 138, PCB 153 i PCB 180) je određivan metodom gasne hromatografije sa detektorom elektronskog zahvata (GC-ECD). Za detekciju



ispitivanih kongenera PCB kao parametar je korišćeno retenciono vreme, dok je kao parametar kvantifikacije korišćena površina pika.

#### 3.4.1. Reagensi i standardi

Za pripremu uzoraka korišćen je acetonitril čistoće za GC (*Chromasolv*, *Sigma-Aldrich*, *St. Louis, MA, SAD*), dok su kao osnovni standardni rastvori korišćeni rastvori sledećih kongenera u izooktanu i u koncentracijama  $c=10$  ng/ $\mu$ L: PCB No. 28, PCB No. 52, PCB No. 101, PCB No. 118, PCB No. 138, PCB No. 153 i PCB No. 180 (*Dr. Ehrenstorfer Standards*, *Augsburg*, Nemačka).

#### 3.4.2. Priprema uzoraka

Homogenizovan uzorak mase 1 - 5 g je prenesen je u veliku tubu QuEChERS sistema (*Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*, roQ dSPE, *Phenomenex*, *Torrance, SAD*) zapremine 50 ml koja sadrži 4 g MgSO<sub>4</sub> i 1 g NaCl i po dodatku 10 ml acetonitrila vršeno je mućkanje i centrifugiranje na 4000 obrtaja tokom 10 minuta (centrifuga Centurion K2 seria). Dalje prečišćavanje uzorka, tačnije 1 ml dobijenog supernatanta, vršeno je tečno-čvrstom ekstrakcijom na QuEChERS sistemima zapremine 2 ml koji sadrže 150 mg MgSO<sub>4</sub> i 25 mg PSA. Po mućkanju je smeša centrifugirana na 3000 obrtaja tokom 5 minuta, a potom je supernatant injektovan u gasni hromatograf.

#### 3.4.3. Određivanje koncentracije polihlorovanih bifenila

Za potrebe identifikacije i određivanja PCB nakon pripreme uzoraka, primenjena je metoda GC-ECD.

Od osnovnih rastvora pojedinačnih kongenera PCB pravljena su razblaženja u n-heksanu (*Sigma-Aldrich*, *St.Louis, MA, SAD*) do radnih kalibracionih rastvora čije su koncentracije prikazane u Tabeli 3.

**Tabela 3. Koncentracije radnih kalibracionih rastvora pojedinačnih kongenera PCB**

Kongener	c <sub>1</sub> , µg/mL	c <sub>2</sub> , µg/mL	c <sub>3</sub> , µg/mL	c <sub>4</sub> , µg/mL	c <sub>5</sub> , µg/mL
PCB No. 28	0,001	0,002	0,004	0,005	0,006
PCB No. 52	0,003	0,006	0,010	0,013	0,016
PCB No. 101	0,004	0,007	0,011	0,014	0,018
PCB No. 118	0,008	0,016	0,024	0,032	0,040
PCB No. 138	0,003	0,006	0,008	0,011	0,014
PCB No. 153	0,004	0,009	0,013	0,018	0,022
PCB No. 180	0,003	0,006	0,008	0,011	0,014

Merenje je vršeno na gasnom hromatografu (*Varian CP-3380, Mulgrave, Australija*) sa *autosampler*-om CP-8400 i ECD detektorom <sup>63</sup>Ni. Injektovana zapremina uzorka je bila 1 µl. Razdvajanje je vršeno na koloni (*Zebtron ZB-1 Phenomenex, Torrance, SAD*), dužine 30 m, unutrašnjeg promera 0,25 mm i debljine filma 0,25 µm. Gas nosač je bio azot visoke čistoće, a na instrumentu su podešeni sledeći operativni uslovi: temperatura injektora – 250°C, temperatura detektora – 300°C, temperatura kolone inicijalna 80°C tokom 10 minuta, povećavanje do 230°C brzinom od 5°C/min i održavanje 20 minuta na 230°C. Podaci su obrađivani STAR softverom (*Varian, Mulgrave, Australija*). U procesu validacije metode, utvrđena je donja granica kvantifikacije od 0,001 mg/kg masti. Linearnost je potvrđena za ispitivani opseg koncentracija ( $r^2 > 0,99$ ). Koeficijent varijacije iznosio je 11–17,2%, a prinos metode 76–91%.

Kontrola kvaliteta primenjene analitičke metode je postignuta korišćenjem sertifikovanog referentnog materijala (*CIL-EDF-2524 Clean Fish (slurry) - Organic contaminants, LGC standards, Teddington, Middlesex, Velika Britanija*).

### 3.5. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA

#### 3.5.1. Hemikalije

Za ispitivanje odabranih parametara oksidativnog stresa korišćene su sledeće hemikalije: kalijumhidrogen-fosfat ( $K_2HPO_4$ ) p.a. (*Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, SAD*), kalijumdihidrogen-fosfat ( $KH_2PO_4$ ) p.a. (*Merck, Darmstadt, Nemačka*), natrijumhidrogen-karbonat ( $NaHCO_3$ ) p.a. (*Acros Organics, Geel, Belgija*), natrijum-karbonat ( $Na_2CO_3$ ) p.a. (*Merck, Darmstadt, Nemačka*), natrijumhidrogen-fosfat ( $Na_2HPO_4 \cdot xH_2O$ ) p.a. (*Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, SAD*), hlorovodonična kiselina (HCl), 37% (*Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, SAD*), sirupasta fosforna kiselina ( $H_3PO_4$ ), 85% (*Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, SAD*), 5-sulfosalicilna kiselina ( $C_7H_6O_6 \cdot xH_2O$ ), (*Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, SAD*), 2-tiobarbiturna kiselina (TBA), (*Sigma-Aldrich, St Louis, MA, SAD*), trihlorsirćetna kiselina ( $CCl_3COOH$ ) p.a. (*Sigma-Aldrich, St Louis, MA, SAD*), 5,5'-ditiobis-(2-nitro)-benzoeva kiselina (DTNB) (*Sigma-Aldrich, St Louis, MA, SAD*), etilendiamintetrasirćetna kiselina ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ) (*Sigma-Aldrich, St Louis, MA, SAD*), Brilliant Blue G (*Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, SAD*), albumin fraction V, goveđi serum (*Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, SAD*), 97% malondialdehid (MDA) standard (*Acros Organics, New Jersey, SAD*), GSH standard (*Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, SAD*) i epinefrin-hidrohlorid (*Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemačka*).

#### 3.5.2. Priprema homogenata tkiva

Nakon nepotpunog odmrzavanja, brzim postupkom na ledu (0–4 °C) priprema tkiva za analize vršena je homogenizacijom 0,2–0,4 g uzorka na ledu, u 9 puta većem volumenu 0,1 M fosfatnog pufera, pH=7,4 (bazna komponenta –  $K_2HPO_4$ , kisela komponenta –  $KH_2PO_4$ ) koji sadrži 1,15% KCl u epruveti za homogenizaciju na homogenizatoru (*Tehtnica, Zelezniki, Slovenija*) sa teflonskim

tučkom (*Arthur H. Thomas, Philadelphia, SAD*) na 800 obrtaja/min (Pawa i Ali, 2004). Deo homogenata prebacivan je u ependorf posude i ovako dobijeni *crude* homogenat korišćen je za određivanje sadržaja MDA i GSH u ispitivanim uzorcima. Ostatak homogenata podvrgnut je diferencijalnom centrifugiranju i to 10 minuta na 800 rcf (*relative centrifugal force*), a potom 20 minuta na 9500 rcf pri temperaturi 4°C (centrifuga 5415R, *Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka*). Supernatant je izdvojen i prebačen u ependorf posude, a ovako dobijeni postmitohondrijalni supernatant korišćen je za ispitivanje aktivnosti SOD i sadržaja ukupnih -SH grupa.

### 3.5.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa

#### 3.5.3.1. Određivanje koncentracije proteina

U pripremljenim homogenatima tkiva određivani su proteini metodom po *Bradford-u*, koja se zasniva na praćenju promene apsorpcionog maksimuma kiselog rastvora Komazi brilliant Blue G-250 sa 465 nm na 595 nm nakon vezivanja proteina (Bradford, 1976). Do promene boje dolazi usled hidrofobnih i jonskih interakcija koje stabilizuju anjonsku formu ove boje dovodeći do vidljive promene boje i promene apsorpcionog maksimuma.

U epruvetu je odpipetirano 10 µL uzorka (*crude* homogenata tkiva), a zatim dodavano 2,5 ml *Bradford*-ovog reagensa (Comassie Brilliant Blue G-250, 95% etanol, 85% fosforna kiselina) i mešano na vorteksu. Uzorci su potom inkubirani 5 minuta, a zatim je merena apsorbanacija na 595 nm na spektrofotometru (*Carry 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD*) u odnosu na slepu probu (fiziološki rastvor). Za konstruisanje regresione jednačine korišćeni su merni standardni rastvori koncentracija: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 i 1,5 g/L i svaki od pripremljenih rastvora je odmeren u količini od 10 µL te je po dodatku 2,5 ml pripremljenog *Bradford*-ovog reagensa izmerena apsorbanacija (A) mernih standardnih rastvora. Koncentracija proteina se

izračunava iz regresione jednačine:  $y = 0,051 x + 0,356$  ( $r^2 = 0,9966$ ) gde je  $x$  – koncentracija proteina (g/L homogenata), a  $y$  – A.

### 3.5.3.2. Određivanje koncentracije malondialdehida

Malondialdehid je određivan kao tiobarbiturna reagujuća supstanca (TBARS) spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na apsorpcionom maksimumu kompleksa MDA i ostalih TBARS sa TBA reagensom (15%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  i 0,389% TBA, 2,2% konc. HCl u destilovanoj vodi) na 523 nm (Girotti i sar, 1991).

U centrifušku epruvetu je odmeravano 0,3 ml homogenata i 0,6 ml TBA reagensa, te zagrevano 15 minuta na 100 °C u vodenom kupatilu. Nakon hlađenja u kadici sa ledom u trajanju od 5 minuta, epruvete su centrifugirane na 3000 obrtaja tokom 10 minuta (centrifuga LC-320, *Tehtnica, Zelezniki, Slovenija*). Supernatant je potom prebačen u ependorfe i centrifugiran 10 minuta na 1000 rcf (*relative centrifugal force*) (centrifuga 5415R, *Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka*). Apsorbancija supernatanta je merena prema slepoj probi (0,3 mL destilovane vode i 0,6 mL TBA reagensa) na talasnoj dužini 523 nm spektrofotometru (*Carry 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD*). Od osnovnog standarda MDA (1 mmol/L) napravljen je radni rastvor koncentracije 0,1 mmol/L, a zatim serija mernih standardnih rastvora koncentracija 0,5; 1; 3; 5; 7 i 10  $\mu\text{mol/L}$  uz pomoć kojih je konstruisana regresiona jednačina:  $y = 0,0546x + 0,0081$  ( $r^2 = 0,9976$ ), gde je  $y$  – apsorbancija, a  $x$  – koncentracija MDA ( $\mu\text{mol/L}$  homogenata). Dobijeni rezultati za MDA se izražavaju po mg proteina homogenata ( $\mu\text{mol/mg}$  proteina).

### 3.5.3.3. Određivanje aktivnosti ukupne superoksid-dismutaze

Aktivnost SOD (EC 1.15.1.1.) u homogenatima tkiva je određivana kinetičkom metodom Misra i Fridovich (1972), koja se zasniva na sposobnosti

SOD da inhibira spontanu autoksidaciju adrenalina u baznoj sredini na pH=10,2. Reakciona smeša za određivanje aktivnosti ukupne SOD je sadržala 10 µL uzorka (kao kontrola je korišćen rastvor karbonatnog pufera), 0,69 mL karbonatnog pufera pH=10,2 (bazna komponenta – Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i kisela komponenta – NaHCO<sub>3</sub>) i 50 µL adrenalina (10 mmol/L rastvor adrenalina u 15 mmol/L HCl).

Reakcija počinje dodavanjem adrenalina u reakcionu smešu. Po dodatku adrenalina i mešanja na vorteksu smeša se inkubira na 25°C, tokom 3 minuta. U naredna 3 minuta apsorbancija se očitava na 480 nm svakog minuta na spektrofotometru (*Carry 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD*) korišćenjem aplikacije *Kinetics*. Aktivnost SOD se izražava u internacionalnim jedinicama (U) koje se dobijaju merenjem apsorbancije nastalog crvenog proizvoda oksidacije adrenalina na 480 nm, bez prisustva enzima (kontrola) i u prisustvu enzima (analiza). Relativna jedinica aktivnosti SOD je definisana kao ona aktivnost koja dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina pod određenim uslovima. Izabrana je ona koncentracija adrenalina koja će u kontroli dati promenu apsorbancije u minuti od 0,025 (polazi se od koncentracije adrenalina od 10 mmol/L, a zatim se on razblažuje sve dok se ne postigne ΔA/min od 0,025). Izabrana je promena apsorbancije u minuti od 0,025, jer je utvrđeno da SOD tada postiže najviši procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Aktivnost SOD u relativnim jedinicama se izračunava preko sledeće proporcije:  $0,0125 : 1U = [0,025 - (\Delta A \text{ analize} / \text{min})] : X$ . Dobijeni rezultati za aktivnost SOD se izražavaju u U/mg proteina.

#### 3.5.3.4. Određivanje koncentracije redukovano glutationa

Ova metoda se zasniva na reakciji DTNB sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini, pri čemu se stvara jedan mol p-nitrofenol anjona po molu tiola. Kako je ovaj anjon u baznoj sredini jako žuto obojen, merenje njegove apsorbancije je moguće na 412 nm (Ellman, 1959). U modifikovanoj

metodi se koristi 0,3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, DTNB reagens (DTNB rastvoren u fosfatnom puferu, pH=7, kisela komponenta – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i bazna komponenta – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) i 5% SSA (rastvor sulfosalicilne kiseline u vodi).

U ependorfe se odmeri 0,6 mL uzorka i 0,6 mL 5% SSA u cilju taloženja proteina koji sadrže -SH grupe i ependorfe potom hlade 10 minuta u kadici sa ledom. Nakon toga, centrifugiranje se vrši 2 minuta na 10000 rcf (centrifuga 5415R, Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka). U epruvete se potom odmere sledeći reagensi 300 µL supernatanta, 800 µL 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 100 µL DTNB. Kao slepa proba koristi se 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Nakon mešanja na vorteksu, inkubiranja 25 min na 25°C na tamnom mestu, očitavana je apsorbancija na spektrofotometru (*Carry 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD*). Koncentracija redukovanog GSH se izračunava uz upotrebu standardne krive dobijene korišćenjem vodenog rastvora redukovanog GSH kao standarda. Pravi se koncentrovani osnovni standard koncentracije 1 mmol/L GSH, pa potom radni rastvor GSH koncentracije 1 µmol/l, a od radnog rastvora se dalje prave razblaženja, (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 µmol/l). Koncentracija redukovanog GSH se u analiziranim tkivima izračunava iz standardne krive:  $y = 0,3556x - 0,1196$  ( $r^2 = 0,9984$ ), gde je y – apsorbancija na 412 nm, a x – koncentracija GSH (µmol/L homogenata). Dobijeni rezultati za koncentraciju GSH se izražavaju u µmol/mg proteina.

#### 3.5.3.5. Određivanje koncentracije ukupnih -SH grupa

Metoda se takođe zasniva na reakciji DTNB sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini (Ellman, 1959). U metodi za određivanje ukupnih -SH grupa se međutim, ne vrši deproteinizacija sa 5% SSA, a od reagenasa se koriste pufer, pH=9 koji od komponenata sadrži 0,2 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 2 mmol/L EDTA, te DTNB reagens koji se pravi na isti način kao u metodi za određivanje sadržaja GSH.

U epruvete se odmeri 0,9 mL pufera, 50  $\mu$ L uzorka i 20  $\mu$ L DTNB reagensna, a kao slepa proba koristi se pufer. Nakon mešanja na vorteksu, inkubiranja 25 min na 25°C na tamnom mestu, očitavana je apsorbancija na 412 nm prema slepoj probi na spektrofotometru (*Carry 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD*). Koncentracija ukupnih -SH grupa se izračunava uz upotrebu standardne krive korišćenjem vodenog rastvora redukovano GSH kao standarda. Pravi se koncentrovani osnovni standard od 1 mmol/L GSH, pa potom radni rastvor GSH 1  $\mu$ mol/L, a od njega se dalje prave razblaženja, (0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 i 1  $\mu$ mol/L). Koncentracija ukupnih -SH se u analiziranim tkivima izračunava iz standardne krive:  $y = 0,708x + 0,011$ , ( $r^2 = 0,9991$ ), gde je y – apsorbancija na 412 nm, a x – koncentracija ukupnih -SH ( $\mu$ mol/L homogenata). Dobijeni rezultati za koncentraciju ukupnih -SH se izražavaju u nmol/mg proteina.

### 3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statističkom obradom podataka, odnosno *Kolmogorov-Smirnov* testom ispitivano je da li je raspodela rezultata ispitivanih parametara normalna. U zavisnosti od toga da li su dobijeni podaci za pojedine parametre pratili normalnu raspodelu ili ne značajnost razlika između vrednosti parametara između različitih grupa ispitivana je upotrebom različitih statističkih testova. U slučaju normalne raspodele korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA test) praćena naknadnim, *post hoc*, *Fisher*-ovim LSD testom (*Least Significant Difference*), dok je ukoliko podaci nisu pratili normalnu raspodelu značajnost razlika između grupa ispitivana neparametarskim *Kruskal-Vol*is testom praćenim *post hoc* testom razlike između medijana. Nivo statističke značajnosti za sve testove je bio  $P < 0,05$ . Takođe, vršeno je i ispitivanje postojanja i smera korelacije između parametara koji su mereni. Kada su ispitivane varijable pratile normalnu raspodelu računat je *Pearson*-ov koeficijent korelacije (r), a ukoliko ne, računat je *Spearman*-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ). Za



sve pomenute statističke tehnike primenjen je program softver SPSS verzija 11.5, osim za *Kruskal-Volison test* & *Median test* koji je rađen u softveru Statistica 7.

Za utvrđivanje odnosa doza–odgovor i izračunavanje BMD i donje granice pouzdanosti BMD doze (BMDL) za svaki ispitivani efekat primenjen je program PROAST (Institut RIVM, *Bilthoven*, Holandija) (Slob, 2002). Termin doza kritičnog efekta (*critical effect dose-CED*) može se upotrebiti umesto termina BMD ukoliko su ispitivane promenljive kontinuirane. Izračunavan je  $CED_{10}$ , odnosno  $BMD_{10}$ , jer se upotrebom kritičnog efekta od 10% minimalizuju varijacije koje potiču od razlika među jedinkama u eksperimentalnoj grupi (van der Ven i sar, 2008), kao i  $CED_5$ , odnosno  $BMD_5$  budući da EPA u svom vodiču (2012) preporučuje upotrebu kritičnog efekta u nivou jedne kontrolne standardne devijacije (SD) koja je za većinu ispitivanih parametara iznosila 5%.

Za utvrđivanje tipa interakcija između Cd i PCB korišćen je koncept razlike u nagibu krive odnosa doza-odgovor (Gennings i sar. 2005; Teuschler i sar. 2002). Za ispitivanja razlika u nagibima krivih doza-odgovor korišćen je softver GraphPad Prism 6.

## 4. REZULTATI

### 4.1. TOKSIČNI EFEKTI KADMIJUMA

#### 4.1.1. Efekti na prirast telesne mase

Primenom testa *Kolmogorov-Smirnov* utvrđena je normalna raspodela podataka, a potom je primenom ANOVA testa praćenog *post hoc* LSD testom utvrđena statistički značajna razlika između grupa eksperimentalnih životinja. Prirast t.m. bio je značajno smanjen u odnosu na kontrolnu grupu u svim grupama koje su primale Cd u dozama  $\geq 1,25$  mg/kg t.m. (Tabela 4). Kadmijum je doveo do dozno zavisnog smanjenja prirasta t.m. životinja i odgovarajuća izračunata CEDL<sub>10</sub> je iznosila 1,74 mg Cd/kg t.m./dan, a CEDL<sub>5</sub> svega 0,06 mg Cd/kg t.m./dan, dok je NOAEL vrednost procenjena na 0,6 mg Cd/kg t.m./dan.

Tabela 4. Efekat različitih doza Cd na prinos mase *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti različitim dozama Cd

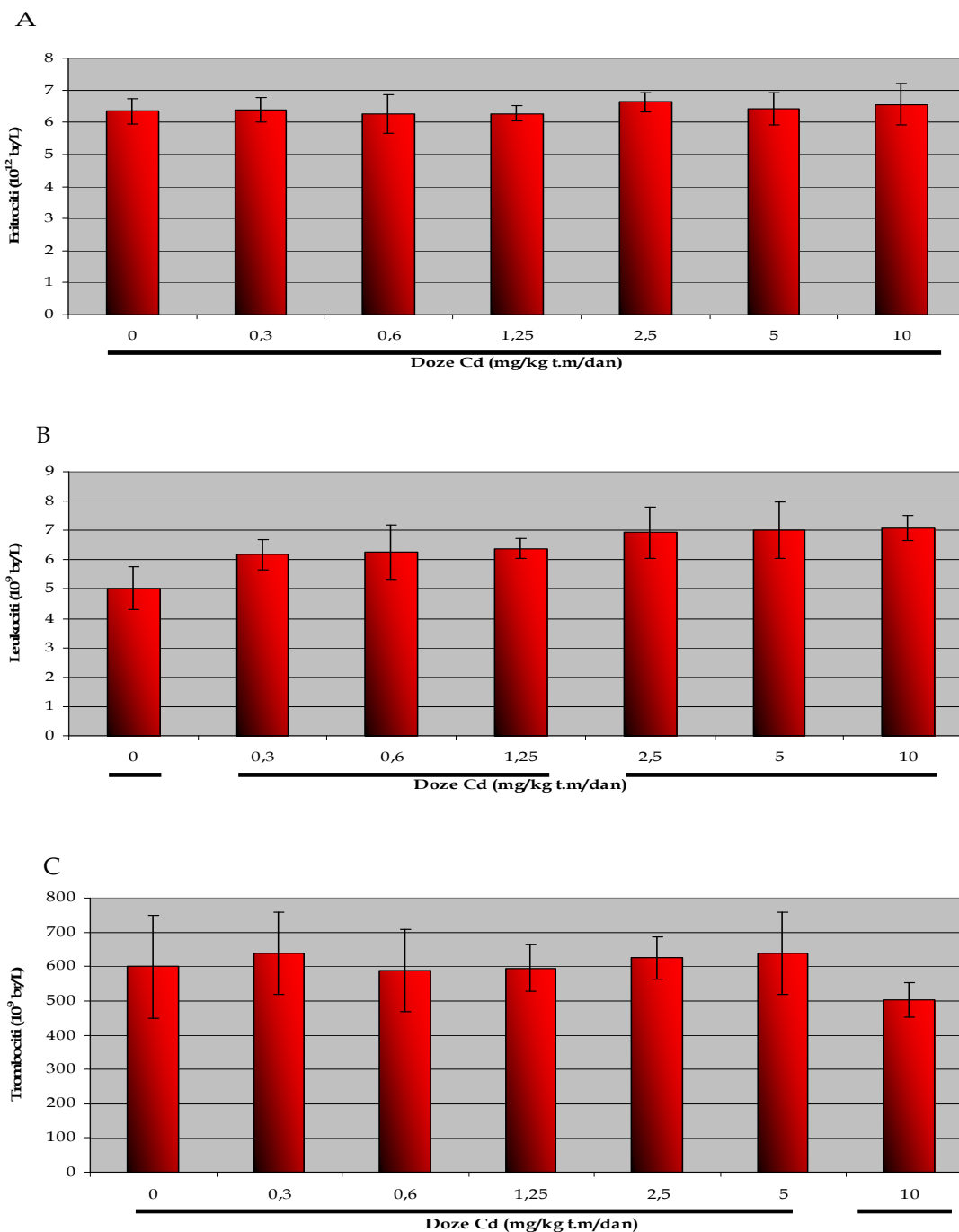
Doze Cd (mg/kg t.m/dan)	Prirast telesne mase
0	1,006±0,318 <sup>a</sup>
0,3	0,922±0,223 <sup>a</sup>
0,6	1,001±0,152 <sup>a</sup>
1,25	0,644±0,102 <sup>b</sup>
2,5	0,653±0,152 <sup>b</sup>
5	0,545±0,188 <sup>b</sup>
10	0,431±0,193 <sup>c</sup>

Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

#### 4.1.2. Efekti na hematološke parametre

U serumu pacova izloženih Cd, kao i pacova kontrolne grupe ispitivani su sledeći hematološki parametri: broj Er, Leu, Tr, i sadržaj Hb. Rezultati testa normalnosti ukazali su da broj Er, Leu i Tr prate normalnu raspodelu, dok sadržaj Hb odstupa od pretpostavke normalnosti. U skladu sa tim, birani su i testovi kojima je ispitan uticaj različitih doza Cd na hematološke parametre.

Kadmijum nije imao značajan uticaj na broja Er u krvi (Slika 3A), dok je primena Cd u svim dozama dovela je do statistički značajnog rasta broja Leu (Slika 3B). Najviša doza Cd izazvala je statistički značajan pad broja Tr tretiranih pacova (Slika 3C).



**Slika 3. Uticaj različitih doza Cd na broj eritrocita (A), broj leukocita (B) i broj trombocita (C) u krvi *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).**

Kako bi se objasnio efekat Cd na ispitivane hematološke parametre utvrđena je i relativna masa slezine kao organa skladištenja izvesnog dela Er i Tr i organa koji značajno učestvuje u odbrambenom odgovoru organizma. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 5, a može se uočiti da je najviša doza Cd dovela do statistički značajnog porasta mase slezine u pacova.

**Tabela 5. Efekat različitih doza Cd na relativnu masu slezine Wistar pacova izloženih Cd tokom 28 dana.**

Doze Cd (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa slezine
0	0,21±0,02 <sup>a</sup>
0,3	0,19±0,02 <sup>a</sup>
0,6	0,20 ±0,04 <sup>a</sup>
1,25	0,19±0,02 <sup>a</sup>
2,5	0,20±0,02 <sup>a</sup>
5	0,22±0,07 <sup>a</sup>
10	0,29±0,03 <sup>b</sup>

Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test; P<0,05).

Nisu uočene statistički značajne promene sadržaja Hb pod uticajem primenjenih doza Cd (Tabela 6).

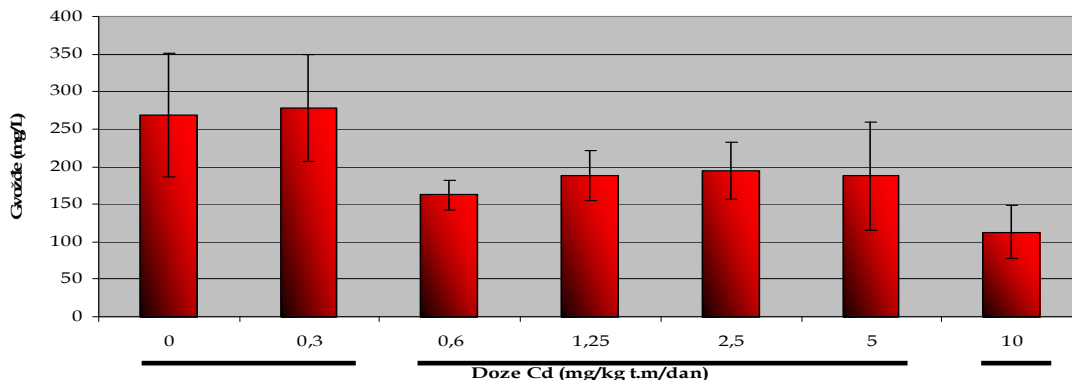
**Tabela 6. Efekat različitih doza Cd na sadržaj hemoglobina u krvi Wistar pacova izloženih Cd tokom 28 dana.**

Doze Cd (mg/kg t.m/dan)	Hemoglobin (g/L)	
	Medijana	Opseg
0	119 <sup>a</sup>	17
0,3	120 <sup>a</sup>	22
0,6	119 <sup>a</sup>	27
1,25	114 <sup>a</sup>	18
2,5	119 <sup>a</sup>	17
5	111 <sup>a</sup>	29
10	109 <sup>a</sup>	26

Vrednosti su predstavljene kao medijana uz opseg vrednosti i date u g/L. Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (Kruskal-Volisonov test, test razlike između medijana; P<0,05). Doze Cd date su u mg/kg t.m/ dan.

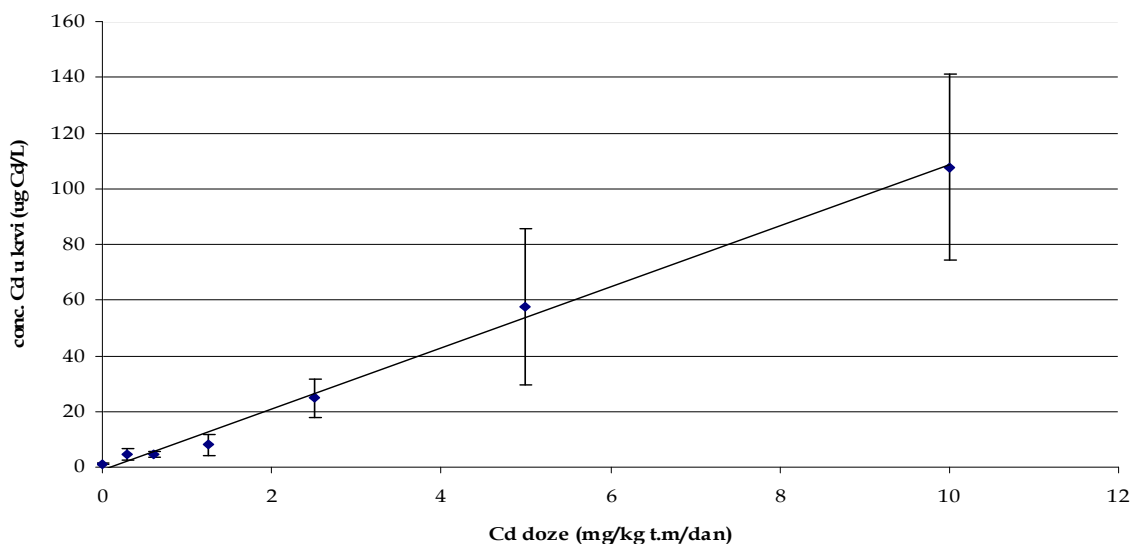
Izmerene su i koncentracije Fe u krvi, a dobijeni rezultati predstavljeni su na Slici 4. Može se uočiti da su doze Cd  $\geq 0,6$  mg/kg t.m/dan dovele do

značajnog sniženja koncentracije Fe u krvi, te da je do još izraženijeg pada došlo primenom najviše doze Cd.



**Slika 4. Uticaj različitih doza Cd na koncentraciju Fe u krvi Wistar pacova izloženih Cd tokom 28 dana.** Vrednosti su predstavljene kao  $\bar{X}_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

Pre ispitivanja veze između doze i uočenih efekata Cd na hematološke parametre, utvrđena je jaka korelacija između primenjene (eksterne) doze i izmerenih koncentracija Cd u krvi (Slika 5). Izračunati *Pearson*-ov koeficijent korelacije iznosio je  $r=0,928$ ,  $n=26$ ,  $P < 0,0001$ , pri čemu visoke eksterne doze prate visoki nivoi Cd u krvi. Prema *Cohen*-ovim kriterijumima za veličinu korelacije (Cohen, 1988) ova veličina korelacije može se smatrati velikom.



**Slika 5. Odnos primenjene eksterne doze Cd i koncentracije Cd u krvi Wistar pacova izloženih Cd tokom 28 dana.**

Povećanje broja Leu bilo je dozno zavisno i izračunata CEDL<sub>10</sub> je iznosila 0,23 mg Cd/kg t.m./dan, a CEDL<sub>5</sub> 0,20 mg Cd/kg t.m./dan što je ujedno i najniža vrednost CEDL<sub>5</sub> dobijena za efekte Cd na hematološke parametre. NOAEL vrednost za ovaj parametar nije mogla biti procenjena na osnovu podataka dobijenih u ovom eksperimentu. Efekat Cd na broj Tr i sadržaj Hb je takođe bio dozno zavisn, dok za efekat na broj Er nije pokazana dozna zavisnost (Tabela 7). Kao mera statističke pouzdanosti izračunat je CED/CEDL odnos koji je u svim slučajevima bio ispod 10 što ukazuje da se dobijeni podaci mogu smatrati relevantnim.

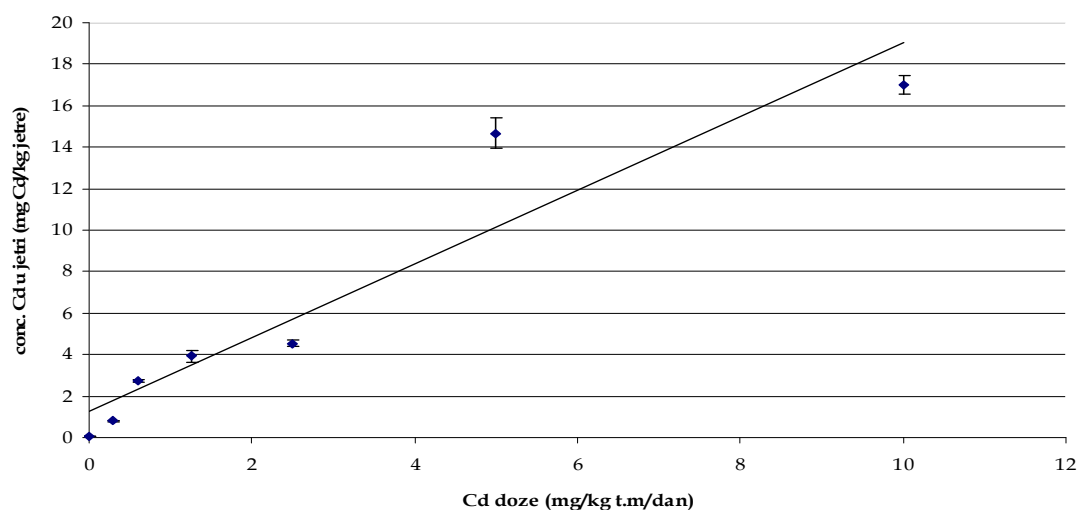
Tabela 7. Dozna zavisnost, izračunate CED doze Cd i procenjene vrednosti NOAEL za efekte Cd na posmatrane hematološke parametre.

Parametar	Dozna zavisnost	CED <sub>5</sub>	CEDL <sub>5</sub>	CED <sub>10</sub>	CEDL <sub>10</sub>	NOAEL
Eritrociti	-					
<b>Leukociti</b>	<b>+</b>	<b>1,49</b>	<b>0,20</b>	<b>2,52</b>	<b>0,23</b>	<b>&lt;0,3</b>
Trombociti	+	3,02	1,68	5,91	3,28	>10
Hemoglobin	+	3,68	6,05	12,4	7,56	>10

CED - granična *Benchmark* doza/kritična doza; CED<sub>5</sub>-kritična doza dovodi do 5% promene efekta; CEDL<sub>5</sub>-statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 5% promene efekta; CED<sub>10</sub>-kritična doza dovodi do 10% promene efekta; CEDL<sub>10</sub>-statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 10% promene efekta; NOAEL- doza koja ne dovodi do štetnog efekta procenjena na osnovu rezultata eksperimenta; (-) ne postoji dozna zavisnost efekta; (+) postoji dozna zavisnost efekta. Vrednosti su dobijene upotrebom programa PROAST. Sve doze date su u mg Cd/kg t.m./dan.

#### 4.1.3. Efekti na jetru

Utvrđena je jaka korelacija između eksterne doze Cd i izmerene koncentracije Cd u jetri ( $r=0,84$ ,  $n=45$ ,  $P<0,001$ ), pri čemu visoke doze Cd prate visoki nivoi Cd u jetri (Slika 6).



Slika 6. Odnos primenjene eksterne doze Cd i koncentracije Cd (interne doze) u jetri *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana.

#### 4.1.3.1. Efekti na relativnu masu organa

Primenom *Kolmogorov-Smirnov* testa utvrđena je normalna raspodela podataka za relativnu masu jetre. Daljom statističkom analizom utvrđeno je da sve primenjene doze Cd dovode do statistički značajnog povišenja relativne mase jetre u odnosu na kontrolnu (netretiranu) grupu (Tabela 8). Ipak, nije utvrđena dozna zavisnost za ovaj parametar, te bi i dobijene rezultate uticaja Cd na relativnu masu ovog organa trebalo razmatrati sa izvesnom rezervom.

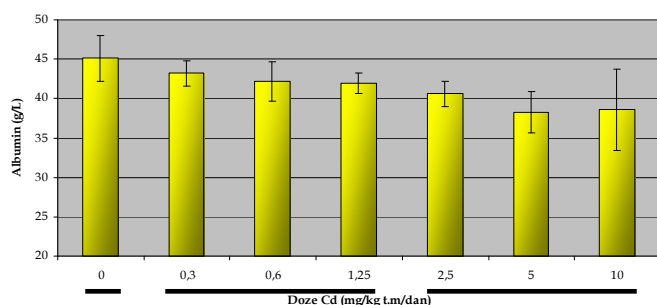
Tabela 8. Efekat različitih doza Cd na relativnu masu jetre *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana.

Doze Cd (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa jetre
0	2,763±0,191 <sup>a</sup>
0,3	3,435±0,313 <sup>b</sup>
0,6	3,474±0,090 <sup>b</sup>
1,25	3,494±0,385 <sup>b</sup>
2,5	3,670±0,293 <sup>b</sup>
5	3,389±0,269 <sup>b</sup>
10	3,276±0,307 <sup>b</sup>

Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test; P<0,05).

#### 4.1.3.2. Efekti na nivoe albumina u serumu

Nakon što je utvrđena normalna raspodela za ovaj parametar, ANOVA test praćen LSD *posthoc* testom je pokazao statistički značajno smanjenje nivoa albumina u krvi pacova tretiranih svim dozama Cd (Slika 7). Najviše doze Cd (5 i 10 mg/kg t.m./dan) dovele su do smanjenja sadržaja albumina za skoro 15% u odnosu na netretiranu grupu.



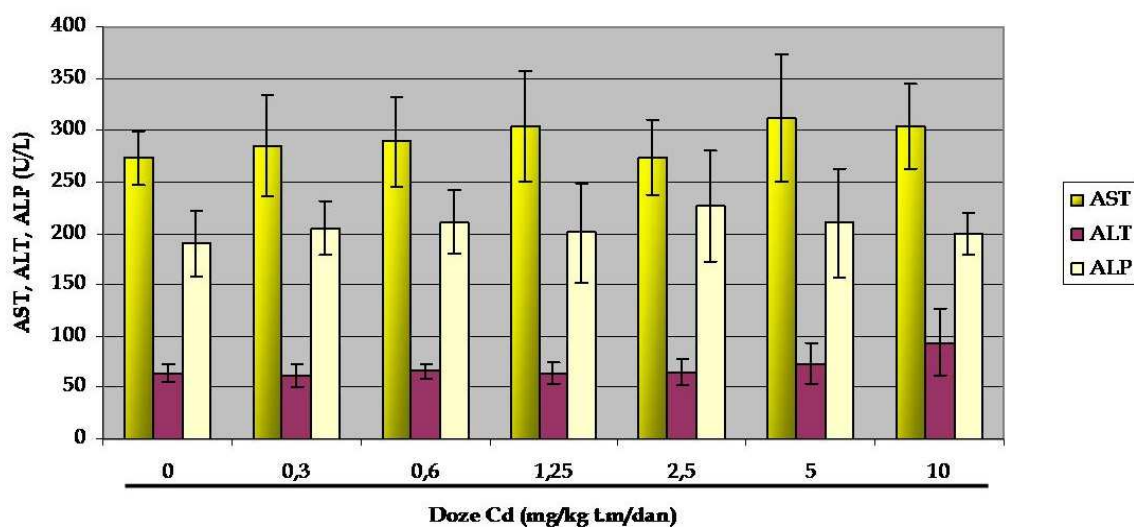
**Slika 7. Uticaj različitih doza Cd na koncentraciju albumina u serumu *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  ( $n=7$ ). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).**

Donja granica pouzdanosti kritične doze koja dovodi do 10% efekta iznosila je 0,69 mg Cd/kg t.m./dan, dok je izračunata donja granica pouzdanosti kritične doze koja dovodi do 5% efekta 0,04 mg/kg t.m./dan. Na osnovu rezultata dobijenih u eksperimentu NOAEL vrednost nije mogla biti procenjena odnosno može se samo zaključiti da je  $< 0,3$  mg Cd/kg t.m./dan.

#### 4.1.3.3. Efekti na parametre funkcije jetre u serumu

Iako se mogu uočiti izvesni skokovi u vrednosti enzima pokazatelja funkcije jetre pod uticajem Cd, intoksikacija Cd nije dovela do statistički značajnih promena u sadržaju AST, ALT i ALP u serumu (Slika 8). Dozna zavisnost utvrđena je samo za porast nivoa AST i izračunate  $CEDL_{10}$  i  $CEDL_5$  vrednosti bile su 1,01 mg Cd/kg t.m./dan odnosno 0,87 mg Cd/kg t.m./dan.





Slika 8. Uticaj različitih doza Cd na nivoe AST, ALT i ALP u krvi *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $\bar{X}_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

#### 4.1.3.4. Efekti na koncentraciju bioelemenata

Primena različitih doza Cd uticala je na nivoe Fe, Zn i Se u jetri. Tako je primena doza Cd  $\geq 1,25$  mg/kg t.m./dan dovela do statistički značajnog povećanja nivoa Fe u jetri, a primena najviše doze dovela je do porasta sadržaja Fe u jetri za gotovo dva puta. Promene u sadržaju Se bile su nešto manje izražene, pa je tako do statistički značajnog sniženja nivoa Se došlo samo u grupama koje su tretirane dozama 5 odnosno 10 mg Cd/kg t.m, pri čemu je smanjenje u grupi tretirano najvišom dozom Cd iznosilo gotovo 60% u odnosu na izmereni nivo Se u kontrolnoj grupi. Samo najviša doza Cd dovela je do statistički značajnog pada sadržaja Zn u jetri i to za oko 15% u odnosu na sadržaj Zn u jetri pacova iz netretirane grupe (Tabela 9).

Tabela 9. Efekat različitih doza Cd na nivoe Fe, Zn i Se u jetri *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana.

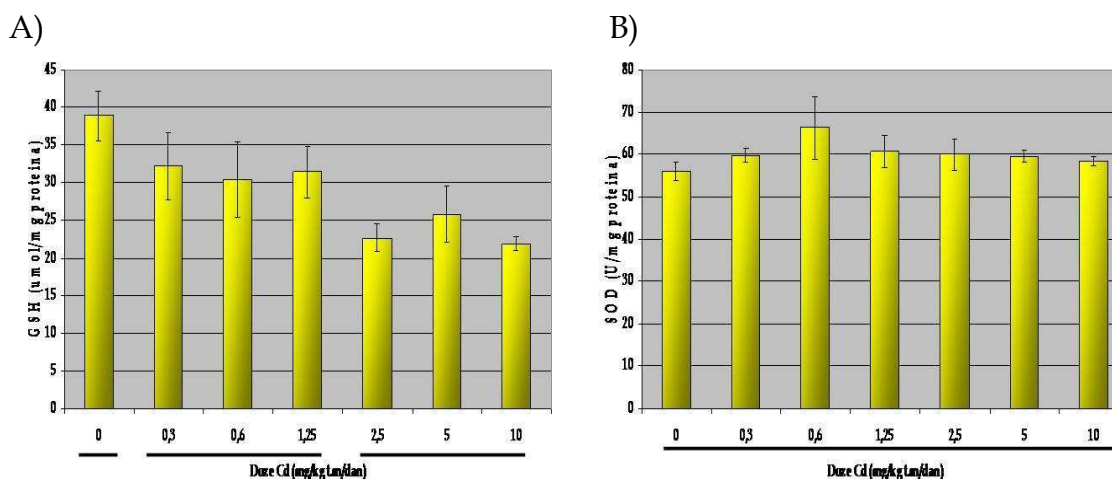
Cd doze (mg/kg t.m./dan)	Fe (mg/kg jetre)	Zn (mg/kg jetre)	Se (mg/kg jetre)
0	114,09 $\pm$ 18,55 <sup>a</sup>	47,41 $\pm$ 5,53 <sup>a</sup>	1,35 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>
0,3	115,29 $\pm$ 14,26 <sup>a</sup>	47,31 $\pm$ 2,59 <sup>a</sup>	1,39 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
0,6	112,67 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup>	45,70 $\pm$ 4,98 <sup>a</sup>	1,30 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>
1,25	139,27 $\pm$ 5,18 <sup>b</sup>	46,10 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>	1,36 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>

Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Fe (mg/kg jetre)	Zn (mg/kg jetre)	Se (mg/kg jetre)
2,5	140,94 ± 3,71 <sup>b</sup>	46,45 ± 3,15 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,18 <sup>a</sup>
5	163,30 ± 3,23 <sup>c</sup>	46,97 ± 11,88 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,16 <sup>b</sup>
10	187,83 ± 2,40 <sup>c</sup>	40,39 ± 2,77 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,05 <sup>c</sup>

Koncentracije bioelemenata su predstavljene kao  $\bar{X}_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

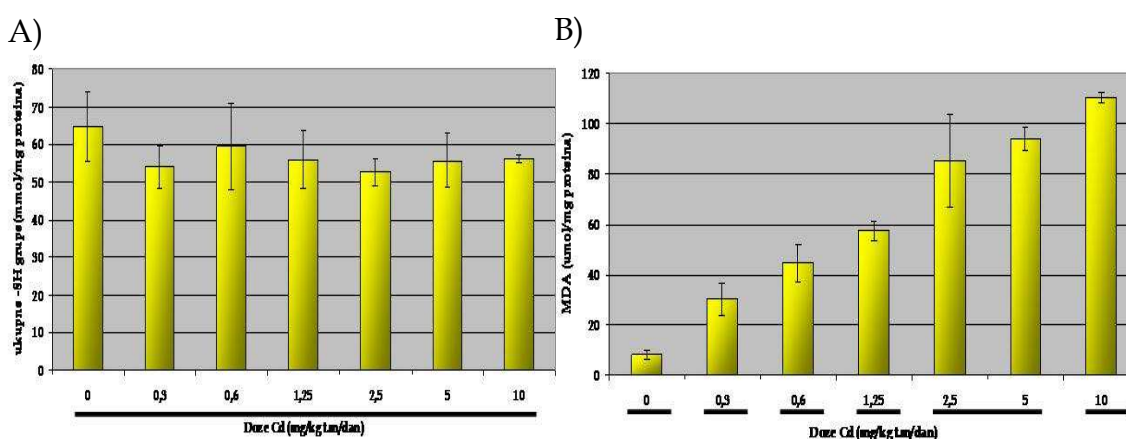
#### 4.1.3.5. Efekti na parametre oksidativnog stresa

Efekti šest različitih doza Cd na komponentu enzimskog sistema antioksidativne zaštite u jetri – CuZnSOD, kao i efekat na neenzimsku komponentu antioksidativne zaštite – GSH prikazani su na Slici 9. Kako su oba parametra pratila normalnu raspodelu, primenom parametarskog ANOVA testa, praćenog LSD *posthoc* testom utvrđen je statistički značajan pad nivoa GSH u homogenatima jetre pacova koji su tretirani svim primenjenim dozama Cd, pri čemu je taj pad bio posebno izražen u grupama pacova koje su tretirane dozama  $\geq 2,5$  mg Cd/kg t.m/dan. Nivoi GSH u grupi tretiranoj najvišom dozom Cd bili su za skoro 44% manji u odnosu na nivoe u homogenatima jetre kontrolnih pacova (Slika 9A). Nisu uočene statistički značajne promene u aktivnosti enzima CuZnSOD ni u jednoj od tretiranih grupa (Slika 9B).



Slika 9. Uticaj različitih doza Cd na nivoe GSH (A) i CuZnSOD (B) u homogenatima jetre *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $\bar{X}_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

Nije bilo ni statistički značajnih promena u nivoima parametra ukupnih -SH u homogenatima jetre trovanih pacova u odnosu na sadržaj -SH grupa u kontrolnoj grupi. Sa druge strane uočen je statistički značajan skok nivoa MDA u homogenatima jetre pacova u svim grupama, pri čemu su se grupe mahom statistički razlikovale kako u odnosu na kontrolnu grupu tako i među sobom. Gotovo 4 puta više vrednosti izmerene su u grupi koja je primala najnižu dozu Cd u odnosu na nivoe izmerene u homogenatima jetre pacova iz kontrolne grupe. Najveći skok zabeležen je u grupi koja je primala najvišu dozu Cd, a izmereni nivoi MDA u ovoj grupi bili su čak skoro 14 puta viši nego srednji nivoi MDA izmereni u kontrolnoj grupi (Slika 10).



Slika 10. Uticaj različitih doza Cd na nivoe ukupnih -SH grupa (A) i MDA (B) u homogenatima jetre *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $\bar{X}_{Sr} \pm SD$  ( $n=7$ ). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

Dozna zavisnost utvrđena je upravo za parametre kod kojih su i uočene statistički značajne razlike među grupama, odnosno za MDA i GSH. Izračunate CED vrednosti, kao i procenjene NOAEL vrednosti na bazi podataka dobijenih u eksperimentu prikazane su u Tabeli 10. Kao mera statističke pouzdanosti izračunat je CED/CEDL odnos koji je u svim slučajevima bio ispod 10 što ukazuje da se dobijeni podaci mogu smatrati relevantnim.

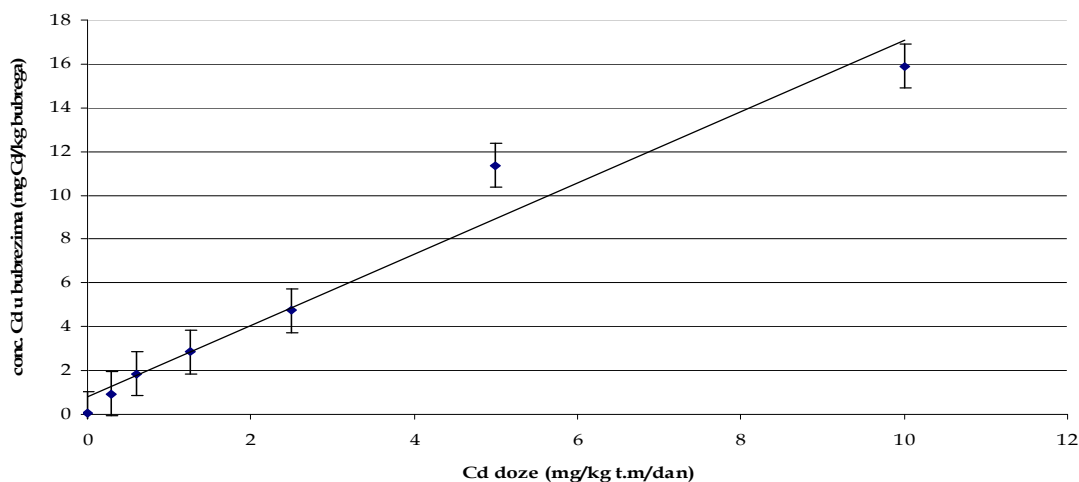
Tabela 10. Dozna zavisnost, izračunate CED doze Cd i procenjene vrednosti NOAEL za efekte Cd na ispitivane parametre oksidativnog stresa u jetri.

Parametar	Dozna zavisnost	CED <sub>5</sub>	CEDL <sub>5</sub>	CED <sub>10</sub>	CEDL <sub>10</sub>	NOAEL
MDA	+	0,004	0,003	0,003	0,008	<0,3
SOD	-					
GSH	+	0,238	0,025	0,477	0,104	<0,3
TSH	-					

CED - granična Benchmark doza/kritična doza; CED<sub>5</sub>-kritična doza dovodi do 5% promene efekta; CEDL<sub>5</sub>-statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 5% promene efekta; CED<sub>10</sub>-kritična doza dovodi do 10% promene efekta; CEDL<sub>10</sub>-statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 10% promene efekta; NOAEL- doza koja ne dovodi do štetnog efekta procenjena na osnovu rezultata eksperimenta; (-) ne postoji dozna zavisnost efekta; (+) postoji dozna zavisnost efekta. Vrednosti su dobijene upotrebom programa PROAST. Sve doze date su u mg Cd/kg t.m./dan.

#### 4.1.4. Efekti na bubrege

I u bubrezima je utvrđena jaka korelacija između eksterne doze Cd i koncentracije ovog toksičnog metala u bubrezima ( $r=0,87$ ,  $n=28$ ,  $P<0,0001$ ), pri čemu su visoke doze Cd pratili visoki nivoi Cd u bubrezima (Slika 11).



Slika 11. Odnos primenjene eksterne doze Cd i koncentracije Cd (interne doze) u bubrezima Wistar pacova izloženih Cd tokom 28 dana.

##### 4.1.4.1. Efekti na relativnu masu organa

Primenom *Kolmogorov-Smirnov* testa utvrđena je normalna raspodela podataka za relativnu masu bubrega, a daljom statističkom analizom nisu

utvrđene statistički značajne promene u relativnoj masi bubreza pod uticajem izloženosti Cd (Tabela 11), kao ni dozna zavisnost ovog parametra.

**Tabela 11. Efekat različitih doza Cd na relativnu masu bubrega *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana**

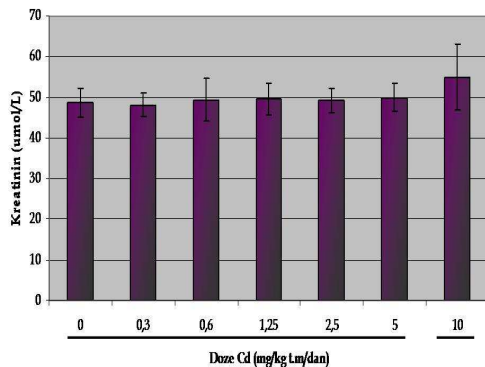
Doze Cd (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa bubrega
0	0,707±0,086 <sup>a</sup>
0,3	0,704±0,017 <sup>a</sup>
0,6	0,645±0,041 <sup>a</sup>
1,25	0,633±0,046 <sup>a</sup>
2,5	0,683±0,067 <sup>a</sup>
5	0,644±0,064 <sup>a</sup>
10	0,689±0,115 <sup>a</sup>

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (n=6-7). Vrednosti koje su označene različitim slovima u istoj koloni se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test; P<0,05).

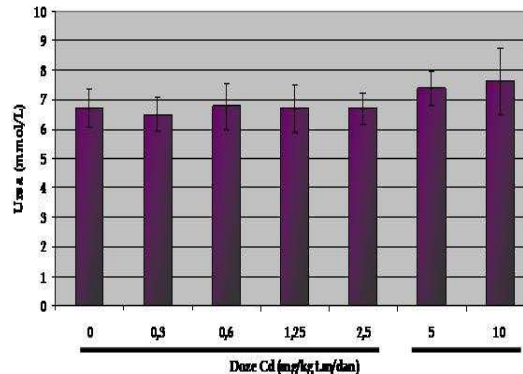
#### 4.1.4.2. Efekti na parametre funkcije bubrega u serumu

Nakon što je potvrđena normalna raspodela za kreatinin i ureu kao parametre bubrežne funkcije, ANOVA test praćen LSD *posthoc* testom je pokazao da intoksikacija Cd izaziva statistički značajan efekat na ove parametre (Slika 12). Tako je najviša doza Cd dovela do statistički značajnog rasta nivoa kreatinina u krvi u odnosu na kontrolnu grupu i ostale eksperimentalne grupe tretirane nižim dozama Cd. Doze Cd od 5 i 10 mg/kg t.m/dan dovele su do statistički značajnog rasta nivoa uree u serumu. Oba parametra pokazala su doznu zavisnost. Izračunata CED<sub>10</sub> za nivo kreatinina u serumu iznosila je 8,09 mg/kg t.m/dan uz donju granicu pouzdanosti koja je iznosila 5,27 mg/kg t.m/dan, dok je CED<sub>5</sub> iznosila 4,14 mg/kg t.m/dan uz donju granicu pouzdanosti 2,70 mg/kg t.m/dan. Procenjena NOAEL vrednost za ovaj parametar bila je 2,5 mg/kg t.m/dan. Doza koja dovodi do 10% smanjenja nivoa uree je 10,5 mg/kg t.m/dan uz donju granicu pouzdanosti od 5,77 mg/kg t.m/dan, dok je CED<sub>5</sub> iznosio 5,14 mg/kg t.m/dan sa donjom granicom pouzdanosti od 2,81 mg/kg t.m/dan. Procenjeni NOAEL za efekat na serumski nivo uree je 5 mg/kg t.m/dan.

A)



B)



Slika 12. Uticaj različitih doza Cd na koncentraciju kreatinina (A) i uree (B) u krvi *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  ( $n=7$ ). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

#### 4.1.4.3. Efekti na koncentraciju bioelemenata

Primena Cd dovela je do promene sadržaja Fe, Mn, Se, Mn i Cu u bubrezima. Statistički značajan pad nivoa Fe u bubrezima uočen je pri primeni najviše doze Cd i to za 32% u odnosu na nivoe ovih bioelemenata u kontrolnoj grupi. Doze Cd  $\geq 5$  mg/kg t.m./dan dovele su do statistički značajnog sniženja nivoa Mn u bubrezima. Jedini bioelement čiji se nivo u bubrezima pod uticajem Cd povećao je Cu, pri dozama  $\geq 1,25$  mg/kg t.m./dan. Nivoi Zn i Se nisu se statistički značajno menjali pod uticajem Cd (Tabela 12).

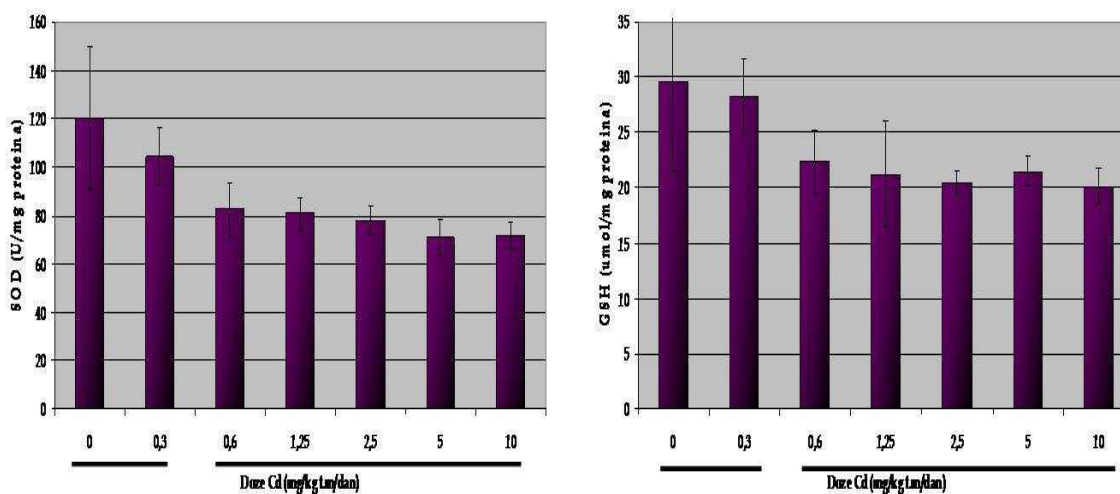
Tabela 12. Efekat različitih doza Cd na nivoe Fe, Zn, Se, Mn i Cu u bubrezima *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana.

Cd (mg/kg t.m./dan)	Fe (mg/kg bubrega)	Zn (mg/kg bubrega)	Se (mg/kg bubrega)	Mn (mg/kg bubrega)	Cu (mg/kg bubrega)
0	50,33±13,56 <sup>a</sup>	29,52±4,46 <sup>a</sup>	1,23±0,18 <sup>a</sup>	1,33±0,34 <sup>a</sup>	6,54±0,89 <sup>a</sup>
0,3	47,65±7,27 <sup>a</sup>	25,52±3,95 <sup>a</sup>	1,25±0,09 <sup>a</sup>	1,25±0,11 <sup>a</sup>	6,53±0,82 <sup>a</sup>
0,6	49,08±2,44 <sup>a</sup>	25,84±0,69 <sup>a</sup>	1,24±0,09 <sup>a</sup>	1,29±0,09 <sup>a</sup>	6,85±0,23 <sup>a</sup>
1,25	47,10±3,91 <sup>a</sup>	26,76±2,06 <sup>a</sup>	1,28±0,04 <sup>a</sup>	1,19±0,02 <sup>a</sup>	7,15±0,98 <sup>b</sup>
2,5	46,85±6,06 <sup>a</sup>	26,06±1,82 <sup>a</sup>	1,27±0,05 <sup>a</sup>	1,27±0,09 <sup>a</sup>	7,56±0,97 <sup>b</sup>
5	44,67±2,63 <sup>a</sup>	26,95±4,24 <sup>a</sup>	1,21±0,08 <sup>a</sup>	1,07±0,08 <sup>b</sup>	7,22±0,6 <sup>b</sup>
10	34,22±5,19 <sup>b</sup>	25,07±7,90 <sup>a</sup>	1,02±0,47 <sup>a</sup>	0,95±0,05 <sup>b</sup>	7,97±1,77 <sup>b</sup>

Koncentracije bioelemenata su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  ( $n=7$ ). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

#### 4.1.4.4. Efekti na parametre oksidativnog stresa

Efekti ispitivanih doza Cd na komponente antioksidativne zaštite u bubregu i to komponentu enzimskog sistema antioksidativne zaštite – CuZnSOD, i neenzimsku komponentu antioksidativne zaštite – GSH prikazani su na Slici 13. Utvrđen je statistički značajan pad aktivnosti CuZnSOD, kao i nivoa GSH u homogenatima bubrega pacova tretiranih dozama  $\geq 0,6$  mg Cd/kg t.m./dan. Aktivnosti CuZnSOD enzima u grupama u kojima je došlo do statistički značajnog pada aktivnosti enzima kretale su se između 69-59% aktivnosti enzima u kontrolnoj grupi pacova. Sadržaj GSH u bubrezima je u grupi koja je tretirana najvišom dozom Cd bio gotovo dvostruko niži nego sadržaj u kontrolnoj grupi.

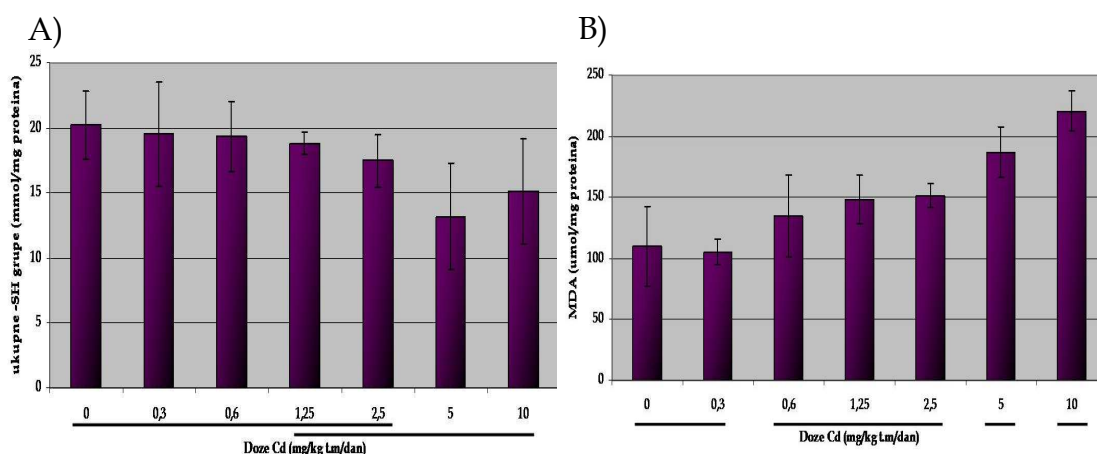


Slika 13. Uticaj različitih doza Cd na nivoe CuZnSOD (levo) i GSH (desno) u homogenatima bubrega *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $\bar{X}_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

Za razliku od izostanka efekta na isti parametar u jetri, Cd je ispoljio efekat na nivoe ukupnih -SH grupa u bubrezima. Pod uticajem doza 5 i 10 mg Cd/kg t.m./dan došlo je do statistički značajnog pada nivoa ukupnih -SH grupa u homogenatima bubrega u odnosu na kontrolne nivoe, kao i na nivoe u bubrezima pacova tretiranih dvema najnižim dozama Cd korišćenim u

eksperimentu. Zabeležen je i statistički značajan porast nivoa MDA, i to u svim tretiranim grupama osim u grupi tretiranoj najnižom dozom Cd. Najizrazitiji porast nivoa MDA uočen je u grupi koja je tretirana najvišom dozom Cd. Naime, nivoi MDA u ovoj grupi bili su dvostruko viši nego u kontrolnoj grupi pacova, a nivoi MDA izmereni u ovoj grupi bili su statistički viši i od nivoa MDA u svim drugim tretiranim eksperimentalnim grupama (Slika 14).

Takođe, utvrđena je jaka negativna korelacija između aktivnosti CuZnSOD i MDA  $r=-0,891$ ,  $n=36$ ,  $P<0,0001$ , kao i nivoa GSH i MDA,  $r=-0,785$ ,  $n=36$ ,  $P<0,0001$ . Izračunata je i jaka negativna korelacija između nivoa Cu i aktivnosti enzima CuZnSOD,  $r=-0,843$ ,  $n=40$ ,  $P<0,005$ .



Slika 14. Uticaj različitih doza Cd na nivoe ukupnih -SH grupa (A) i MDA (B) u homogenatima bubrega *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $\bar{X}_{\pm SD}$  ( $n=7$ ). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P<0,05$ ).

Dozna zavisnost utvrđena je za sve ispitivane parametre oksidativnog stresa u bubrezima. Izračunate CED vrednosti, kao i procenjene NOAEL vrednosti na bazi podataka dobijenih u eksperimentu prikazane su u Tabeli 13. Najniža vrednost CEDL<sub>5</sub> utvrđena je za aktivnost enzima CuZnSOD. Procenjene NOAEL vrednosti su nešto više od izračunatih vrednosti donjih granica pouzdanosti za 5% i 10% efekta. Kao mera statističke pouzdanosti izračunat je CED/CEDL odnos koji je u svim slučajevima bio ispod 10 što ukazuje da se dobijeni podaci mogu smatrati relevantnim.



Tabela 13. Dozna zavisnost, izračunate CED doze Cd i procenjene vrednosti NOAEL za efekte Cd na ispitivane parametre oksidativnog stresa u bubrezima.

Parametar	Dozna zavisnost	CED <sub>5</sub>	CEDL <sub>5</sub>	CED <sub>10</sub>	CEDL <sub>10</sub>	NOAEL
MDA	+	0,101	0,051	0,246	0,178	0,3
SOD	+	<b>0,079</b>	<b>0,067</b>	<b>0,171</b>	<b>0,103</b>	<b>0,3</b>
GSH	+	0,372	0,131	0,447	0,229	0,3
ukupne -SH grupe	+	0,748	2,010	1,263	2,450	2,5

CED - granična Benchmark doza/kritična doza; CED<sub>5</sub>-kritična doza dovodi do 5% promene efekta; CEDL<sub>5</sub>-statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 5% promene efekta; CED<sub>10</sub>-kritična doza dovodi do 10% promene efekta; CEDL<sub>10</sub>-statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 10% promene efekta; NOAEL- doza koja ne dovodi do štetnog efekta procenjena na osnovu rezultata eksperimenta; (-) ne postoji dozna zavisnost efekta; (+) postoji dozna zavisnost efekta. Vrednosti su dobijene upotrebom softvera PROAST. Sve doze izražene su u mg Cd/kg t.m./dan.

#### 4.1.5. Efekti na štitastu žlezdu

##### 4.1.5.1. Efekti na relativnu masu organa

Primena Cd nije dovela do stastički značajnih promena relativne mase štitaste žlezde (Tabela 14). Takođe nije uočena ni dozna zavisnost ovog parametra.

Tabela 14. Efekat različitih doza Cd na relativnu masu štitaste žlezde *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana

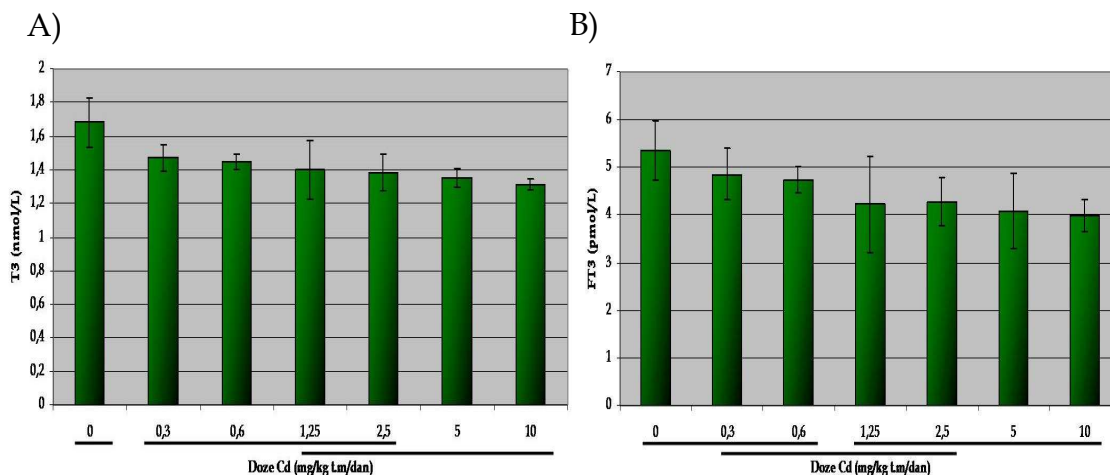
Cd doze (mg/kg t.m./dan)	Relativna masa štitaste žlezde
0	0,161±0,026 <sup>a</sup>
0,3	0,177±0,020 <sup>a</sup>
0,6	0,161±0,032 <sup>a</sup>
1,25	0,174±0,032 <sup>a</sup>
2,5	0,157±0,029 <sup>a</sup>
5	0,154±0,029 <sup>a</sup>
10	0,139±0,026 <sup>a</sup>

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (n=6-7). Vrednosti koje su označene različitim slovima u istoj koloni se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test; P<0,05).

##### 4.1.5.2. Efekti na nivoe hormona štitaste žlezde u serumu

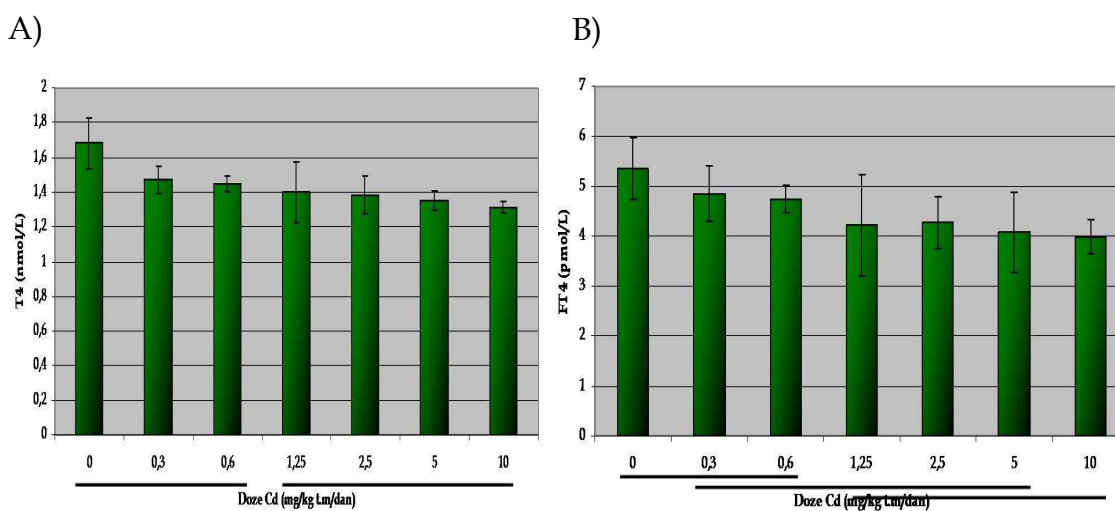
Uočeno je statistički značajno smanjenje nivoa T3 u svim eksperimentalnim grupama koje su primale Cd u odnosu na nivoe T3 u netretiranoj kontrolnoj grupi. Smanjenje je bilo najizraženije u grupi koja je primala najvišu dozu Cd i iznosilo je gotovo 12%. Pod istim eksperimentalnim

uslovima uočeno je i smanjenje nivoa slobodne forme ovog hormona FT3 pri dozama  $\geq 1,25$  mg/kg t.m/dan (Slika 15). Nivoi slobodne forme i forme ovog hormona vezane za proteine plazme pokazali su jaku pozitivnu korelaciju ( $r=0,780$ ,  $P<0,001$ ).



Slika 15. Uticaj različitih doza Cd na nivoe T3 (A) i FT3 (B) u serumu *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  ( $n=7$ ). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P<0,05$ ).

Nivoi T4 i FT4 hormona takođe su sniženi u odnosu na kontrolnu grupu, iako statistički značajno sniženje nije uočeno za doze  $\leq 0,6$  mg Cd/kg t.m/dan (Slika 16). Takođe, izračunata je jaka pozitivna korelacija između slobodnih i vezanih nivoa T4 hormona ( $r=0,824$ ,  $P<0,001$ ).



Slika 16. Uticaj različitih doza Cd na nivoe T4 (A) i FT4 (B) u serumu *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  ( $n=7$ ). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P<0,05$ ).

Ispitano je i eventualno postojanje korelacije između nivoa MDA u jetri, kao i nivoa Se u jetri sa nivoima T3 hormona, s obzirom na to da se preko ovih parametara može tumačiti uticaj Cd na nivoe ovog hormona u serumu. Utvrđena je jaka negativna korelacija između nivoa T3 u serumu i nivoa MDA u jetri ( $r=-0,931$ ,  $P<0,0001$ ), kao i srednja jačina korelacije između nivoa Se u jetri i nivoa T3 hormona u serumu ( $r=0,523$ ,  $P<0,001$ ).

Dozna zavisnost potvrđena je u slučaju sva četiri ispitivana hormona štitaste žlezde. Vrednosti  $CED_5$  i  $CED_{10}$  izračunate iz *fitovanih* krivih dobijenih za svaki od ispitivanih hormona. Izračunate CED vrednosti, kao i procenjene NOAEL vrednosti na bazi podataka dobijenih u eksperimentu prikazane su u Tabeli 15. Na osnovu parametara ispitivanih u ovoj studiji, može se zaključiti da je kritični efekat na funkciju štitaste žlezde efekat koji Cd ispoljava na serumske nivoe T3, dok su toksični efekti na nivo T4 hormona manje izraženi, budući da izračunate vrednosti  $CEDL_5$  i  $CEDL_{10}$  koje su više u odnosu na vrednosti izračunate za efekat na T3 hormon. Procenjene NOAEL vrednosti su nešto više od izračunatih vrednosti donjih granica pouzdanosti za 5% i 10% efekta. Kao mera statističke pouzdanosti izračunat je CED/CEDL odnos koji je u svim slučajevima bio ispod 10 što ukazuje da se dobijeni podaci mogu smatrati relevantnim.

**Tabela 15. Dozna zavisnost, izračunate CED doze Cd i procenjene vrednosti NOAEL za efekte Cd na ispitivane hormone tireoidne žlezde.**

Parametar	Dozna zavisnost	$CED_5$	$CEDL_5$	$CED_{10}$	$CEDL_{10}$	NOAEL
T3	+	0,129	0,059	0,122	0,101	<0,3
FT3	+	0,414	0,141	0,401	0,007	0,6
T4	+	0,635	0,365	0,642	0,389	0,6
FT4	+	0,895	0,354	0,484	0,096	0,6

CED - granična Benchmark doza/kritična doza;  $CED_5$ -kritična doza dovodi do 5% promene efekta;  $CEDL_5$ -statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 5% promene efekta;  $CED_{10}$ -kritična doza dovodi do 10% promene efekta;  $CEDL_{10}$ -statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 10% promene efekta; NOAEL- doza koja ne dovodi do štetnog efekta procenjena na osnovu rezultata eksperimenta; (-) ne postoji dozna zavisnost efekta; (+) postoji dozna zavisnost efekta. Vrednosti su dobijene upotrebom softvera PROAST. Sve doze izražene su u mg Cd/kg t.m/dan.

## 4.2. TOKSIČNI EFEKTI POLIHLOOROVANIH BIFENILA

### 4.2.1. Efekti na prirast telesne mase

Primena PCB dovela je, u svim primenjenim dozama, do smanjenja prirasta t.m. pacova tokom eksperimenta u odnosu na kontrolnu grupu pacova koja je primala samo kukuruzno ulje oralnom gavažom (Tabela 16). Međutim, uočeno smanjenje prirasta t.m. nije bilo dozno zavisno.

Tabela 16. Efekat različitih doza PCB na prinos mase *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti PCB

Doze PCB (mg/kg t.m/dan)	Prirast telesne mase
0	1,088±0,288 <sup>a</sup>
0,5	0,503±0,116 <sup>b</sup>
1	0,577 ±0,113 <sup>b</sup>
2	0,615 ±0,150 <sup>b</sup>
4	0,536 ±0,069 <sup>b</sup>
8	0,609±0,141 <sup>b</sup>
16	0,657 ±0,264 <sup>b</sup>

Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test; P<0,05).

### 4.2.2. Efekti na hematološke parametre

U serumu pacova izloženih PCB rastvorenim u kukuruznom ulju, kao i pacova kontrolne grupe odnosno grupe izložene samo kukuruznom ulju kao vehikulumu, ispitani su sledeći hematološki parametri: broj Er, Leu, Tr, te sadržaj Hb (Tabela 17).

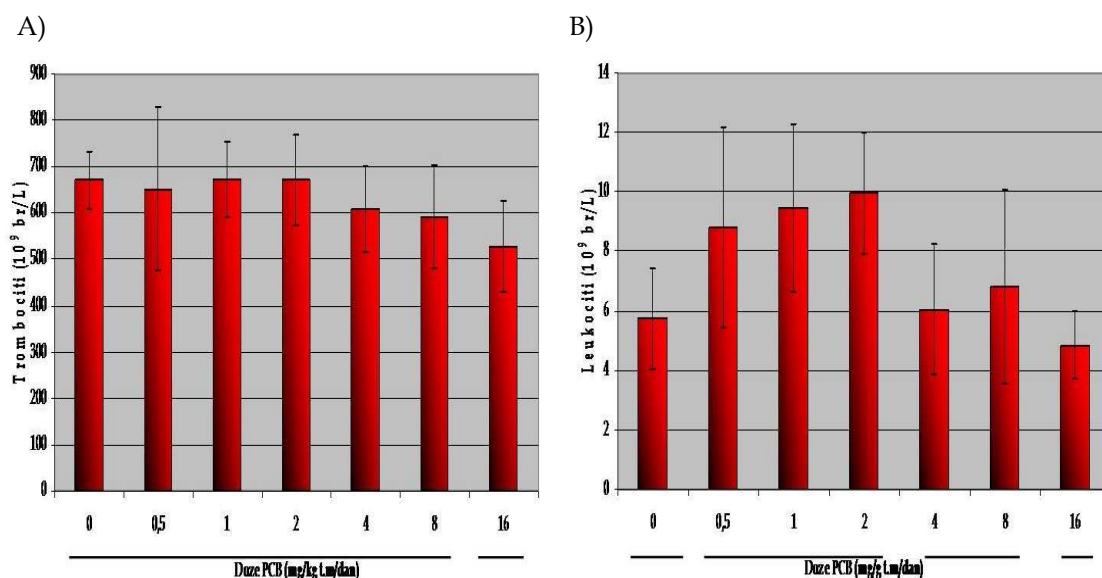
Tabela 17. Efekat različitih doza PCB na broj eritrocita i sadržaj hemoglobina u krvi *Wistar* pacova izloženih PCB tokom 28 dana.

PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Eritrociti ( $10^{12}$ broj/L)		Hemoglobin (g/L)	
	Medijana	Opseg	Medijana	Opseg
0	6,13 <sup>a</sup>	0,99	119 <sup>a</sup>	15
0,5	6,58 <sup>a</sup>	2,15	126 <sup>a</sup>	33
1	6,81 <sup>a</sup>	1,38	124 <sup>a</sup>	25
2	6,53 <sup>a</sup>	1,88	118 <sup>a</sup>	28
4	6,61 <sup>a</sup>	1,5	122 <sup>a</sup>	16
8	6,6 <sup>a</sup>	1,61	122 <sup>a</sup>	20
16	6,38 <sup>a</sup>	0,58	123 <sup>a</sup>	10

Vrednosti su predstavljene kao medijana uz opseg vrednosti. Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (Kruskal-Volisov test, test razlike između medijana; P<0,05).

Uočava se izostanak efekta PCB na broj Er i sadržaj Hb u punoj krvi tretiranih pacova. Takođe, nije utvrđena ni dozna zavisnost ovih parametara od PCB.

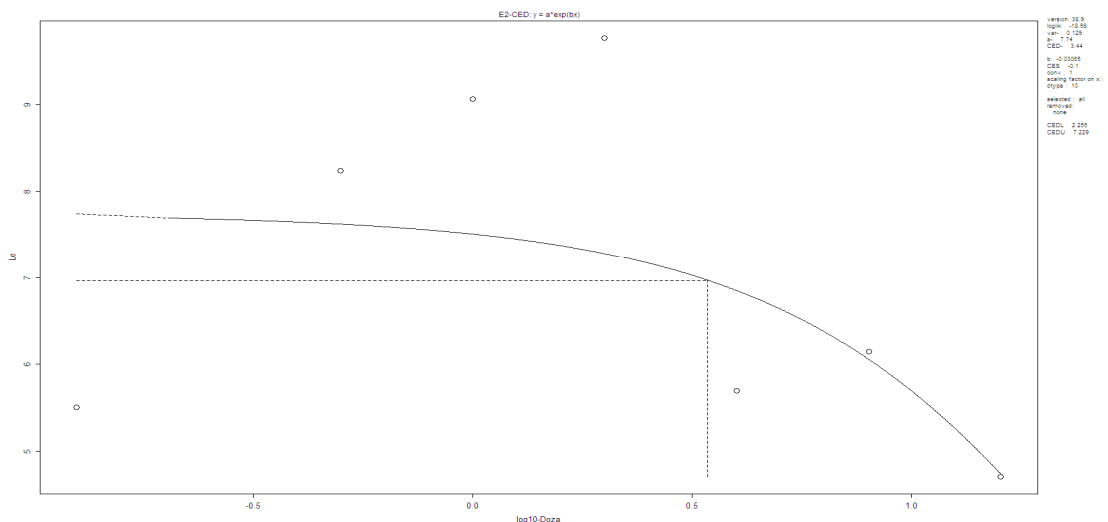
Suprotno tome, PCB je ispoljio efekte na sadržaj Tr i Leu u krvi. Najviša primenjena doza PCB dovela je do statistički značajnog sniženja nivoa Tr u odnosu na kontrolnu grupu i ostale grupe koje su tretirane nižim dozama PCB (Slika 17A). Takođe, došlo je i do interesantnog efekta na nivo Leu. Naime, u nižim dozama (0,5-2 mg/kg t.m./dan) PCB su doveli do porasta broja Leu, da bi u najvišoj dozi došlo do sniženja broja Leu u krvi za oko 15% u odnosu na kontrolne vrednosti (Slika 17B).



Slika 17. Uticaj različitih doza PCB na broj tromboocita (A) i broj leukocita (B) u krvi *Wistar* pacova izloženih PCB tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su obuhvaćene istom linijom se ne razlikuju statistički značajno (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

Ispitivanje odnosa doza-odgovor pokazalo je da ovaj parametar dozno zavisn od PCB. Utvrđeno je da se uticaj na sniženje nivoa Leu može smatrati predominantnim efektom PCB, pri čemu je izračunata  $CEDL_{10}$  2,25 mg PCB/kg t.m./dan (Slika 18). Izračunata donja granica pouzdanost doze za efekat 5% iznosila je 1,09 mg PCB/kg t.m./dan.

Dozna-zavisnost utvrđena je i za efekat PCB na broj Tr. Izračunata donja granica pouzdanosti doze za efekat 10% smanjenja Tr je 3,28 odnosno za 5% efekta 1,68 mg PCB/kg t.m./dan.



**Slika 18. Analiza odnosa doza-odgovor za nivoe leukocita u krvi pacova tretiranih različitim dozama PCB.** Podaci su fitovani korišćenjem PROAST softvera. Zadana veličina kritičnog efekta (CES) bila je 10% (horizontalna tačkasta linija). Odgovarajuća doza (CED) predstavljena je vertikalnom tačkastom linijom. CEDL i CEDU predstavljaju donju i gornju granicu 95% intervala pouzdanosti. Doze PCB predstavljene su kao log<sub>10</sub>.

Ispitan je i uticaj PCB na relativnu masu slezine. Kako dobijeni podaci o relativnoj masi nisu pratili normalnu raspodelu prikazani su kao medijane i opsezi (Tabela 18). Primenom odgovarajućeg statističkog testa utvrđeno je značajno smanjenje relativne mase slezine koje je posebno bilo izraženo pri primeni najviših doza PCB (5 i 10 mg/kg t.m./dan).

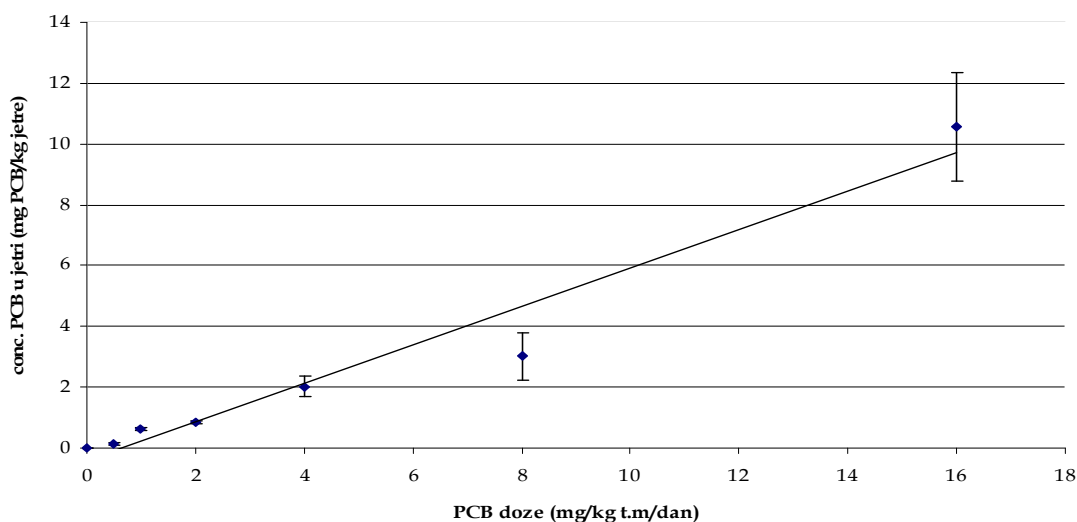
**Tabela 18. Efekat različitih doza PCB na relativnu masu slezine Wistar pacova izloženih PCB tokom 28 dana.**

PCB doze (mg/kg t.m./dan)	Relativna masa slezine	
	Medijana	Opseg
0	0,106 <sup>a</sup>	0,039
0,5	0,105 <sup>a</sup>	0,065
1	0,180 <sup>b</sup>	0,055
2	0,189 <sup>b</sup>	0,059
4	0,191 <sup>b</sup>	0,097
8	0,167 <sup>c</sup>	0,080
16	0,169 <sup>c</sup>	0,080

Vrednosti su predstavljene kao medijana uz opseg vrednosti. Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (Kruskal-Volisov test, test razlike između medijana; P<0,05).

#### 4.2.3. Efekti na jetru

Pre ispitivanja uticaja PCB na parametre funkcije jetre, kao i parametre oksidativnog stresa u jetri, ispitana je korelacija između eksternih i internih doza odnosno koncentracije PCB u jetri. Nakon primene doza 0,5; 1; 2; 4; 8 i 16 mg/kg t.m./dan nivoi PCB u jetri bili su 0,136; 0,623; 0,885; 2,026; 3,023; 10,567 mg PCB/kg vlažne mase jetre (Slika 19). U kontrolnoj grupi nivoi PCB bili su ispod limita kvantifikacije. Utvrđena je jaka korelacija između eksterne doze PCB i koncentracije PCB u jetri ( $r=0,88$ ,  $n=48$ ,  $p<0,001$ ), pri čemu su visoke doze PCB bila praćene visokim nivoima PCB u jetri.



Slika 19. Odnos primenjene eksterne doze PCB i koncentracije PCB (interne doze) u jetri Wistar pacova izloženih PCB tokom 28 dana.

##### 4.2.3.1. Efekti na relativnu masu organa

Sve primenjene doze PCB dovode do statistički značajnog povišenja relativne mase jetre u odnosu na kontrolnu (netretiranu) grupu, pri čemu su doze  $\geq 2$  mg/kg t.m./dan dovele do povećanja koje je bilo značajno i u odnosu na prve dve tretirane eksperimentalne grupe (Tabela 19). Takođe, utvrđena je dozna zavisnost ovog parametra i izračunate su sledeće vrednosti:  $CED_{10}$  0,56 mg PCB/kg t.m./dan uz donju granicu pouzdanosti 0,11 mg PCB/kg t.m./dan i

CED<sub>5</sub> 0,13 uz donju granicu pouzdanosti 0,05 mg PCB/kg t.m/dan, dok je NOAEL vrednost procenjena na <0,5 mg PCB/kg t.m/dan.

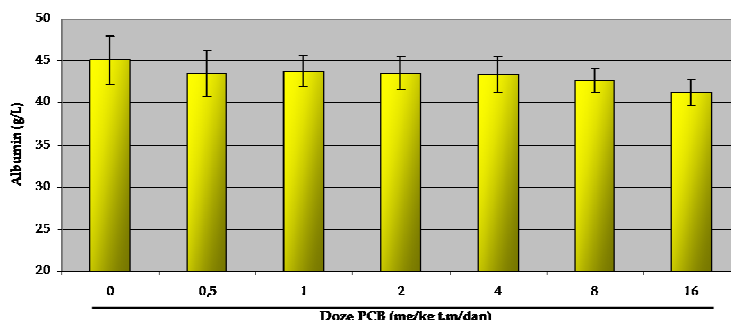
Tabela 19. Efekat različitih doza PCB na relativnu masu jetre *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana

PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa jetre
0	2,779±0,181 <sup>a</sup>
0,5	3,689±0,293 <sup>b</sup>
1	3,802±0,305 <sup>b</sup>
2	4,286±0,462 <sup>c</sup>
4	4,012±0,369 <sup>c</sup>
8	4,351±0,716 <sup>c</sup>
16	4,553±0,560 <sup>c</sup>

Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test; P<0,05).

#### 4.2.3.2. Efekti na nivoe albumina u serumu

Ne uočava se statistički značajna promena nivoa albumina u serumu pacova pod uticajem različitih doza PCB (Slika 20). Ipak, utvrđena je dozna zavisnost ovog parametra, pri čemu su izračunate CED vrednosti bile relativno visoke u odnosu na vrednosti izračunate za druge parametre (CED<sub>10</sub>=27 mg PCB/kg t.m/dan; CEDL<sub>10</sub>=18,18 mg PCB/kg t.m/dan; CED<sub>5</sub>=13,1 mg PCB/kg t.m/dan; CEDL<sub>5</sub>=8,85 mg PCB/kg t.m/dan), a NOAEL vrednost procenjena je na >16 mg PCB/kg t.m/dan.

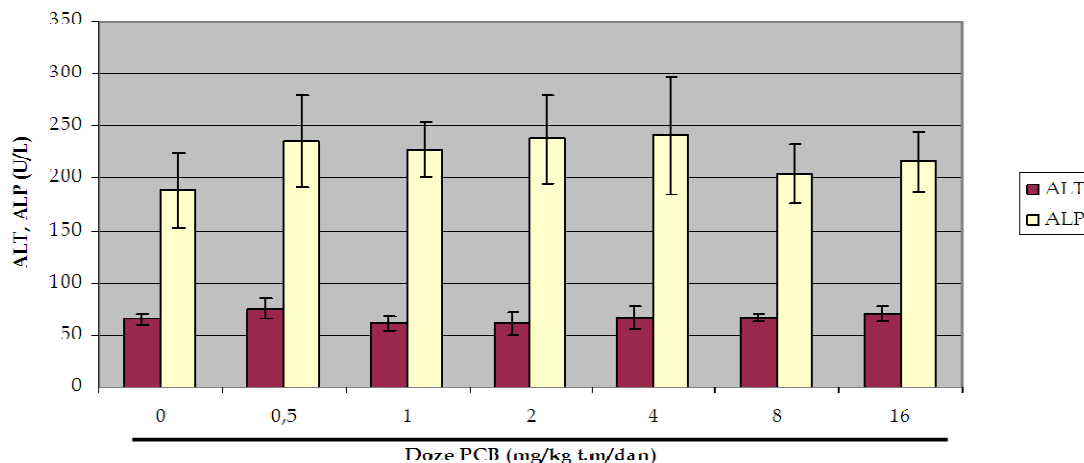


Slika 20. Uticaj različitih doza PCB na koncentraciju albumina u krvi *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test; P<0,05).



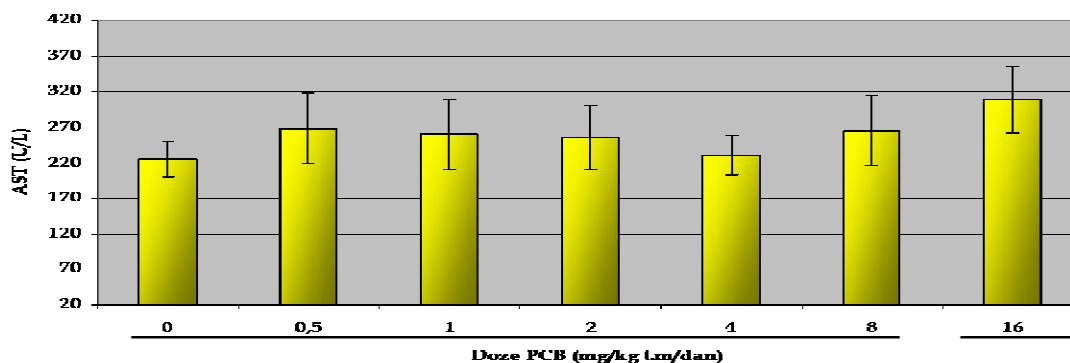
#### 4.2.3.3. Efekti na parametre funkcije jetre u serumu

Intoksikacija PCB nije dovela do statistički značajnih promena u nivoima enzima ALT i ALP (Slika 21), a nije utvrđena ni dozna zavisnost ovih parametara.



**Slika 21. Uticaj različitih doza PCB na nivoe ALT i ALP u krvi Wistar pacova izloženih PCB tokom 28 dana.** Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

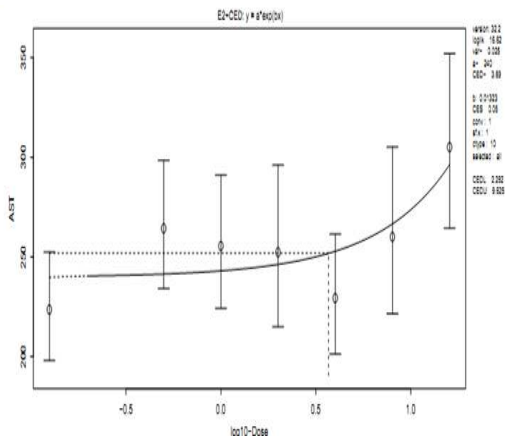
U slučaju nivoa enzima AST u serumu uočava se statistički značajan efekat PCB. Naime, najviše doza dovela je do statistički značajnog povišenja nivoa ovog enzima u serumu (Slika 22). Takođe, utvrđena je i dozna zavisnost



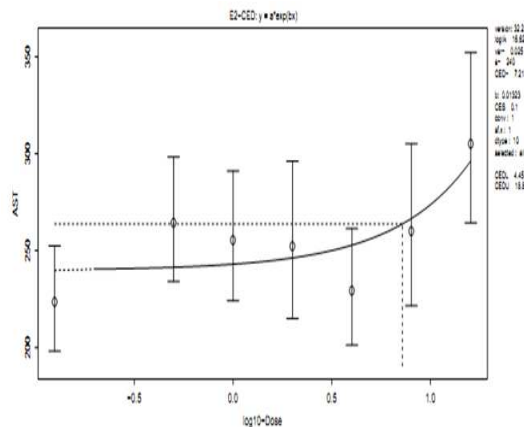
**Slika 22. Uticaj različitih doza PCB na nivoe AST u krvi Wistar pacova izloženih PCB tokom 28 dana.** Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

ovog parametra. Izračunata kritična doza za 5% efekta na ovaj enzim bila je 3,69 mg PCB/kg t.m/dan sa donjom granicom pouzdanosti 2,28 mg PCB/kg t.m/dan, a za 10% efekta 7,21 mg PCB/kg t.m/dan uz donju granicu pouzdanosti 4,46 mg PCB/kg t.m/dan (Slika 23).

A)



B)



**Slika 23. Analiza odnosa doza-odgovor za nivoe AST u serumu pacova tretiranih različitim dozama PCB.** Podaci su fitovani korišćenjem PROAST softvera. Zadata veličina CES bila je 5% (A) odnosno 10% (B) (horizontalna tačkasta linija). Odgovarajuća doza (CED) predstavljena je vertikalnom tačkastom linijom. CEDL i CEDU predstavljaju donju i gornju granicu 95% intervala pouzdanosti. Doze PCB predstavljene su kao log<sub>10</sub>.

#### 4.2.3.4. Efekti na koncentracije bioelemenata

Primena PCB dovela je do statistički značajnih promena u nivoima Fe i Se u jetri i to samo najviša upotrebljena doza u studiji, pri čemu je uočen pad sadržaja za oba ispitivana bioelementa u odnosu na nivoe ovih bioelemenata izmerenih u kontrolnoj (netretiranoj) grupi, kao i u grupama koje su trovane nižim dozama PCB. Primena doza od 8 i 16 mg/kg t.m/dan dovela je do statistički značajnog smanjenja nivoa Zn u jetri tretiranih pacova u odnosu na kontrolne nivoe (Tabela 20).

Tabela 20. Efekat različitih doza PCB na nivoe Mg, Fe, Zn i Se u jetri *Wistar* pacova izloženih PCB tokom 28 dana.

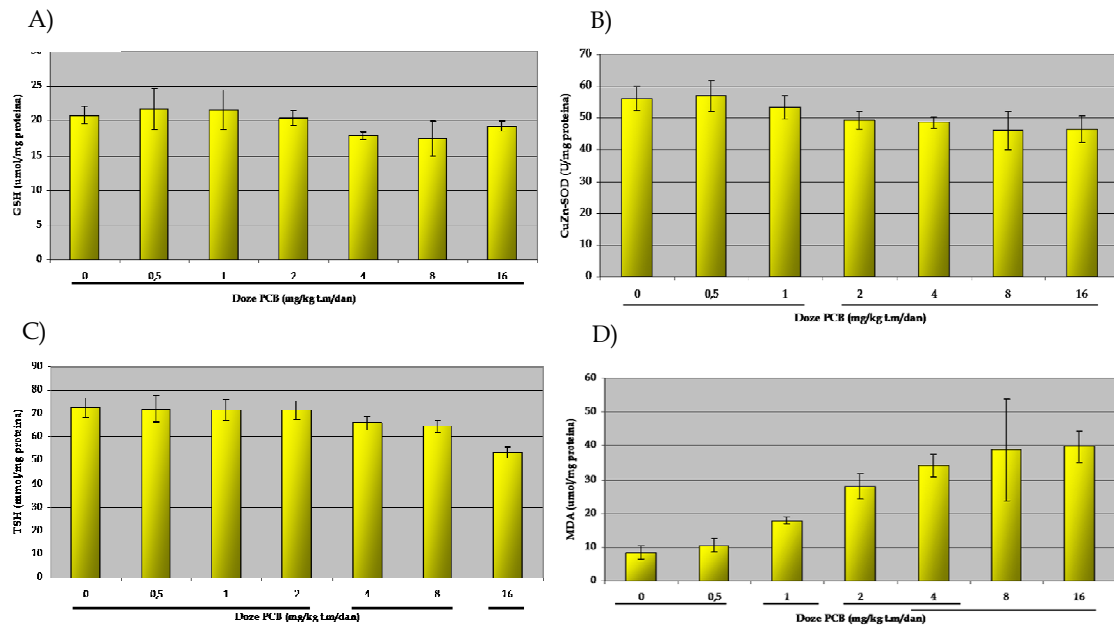
PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Fe (mg/kg jetre)	Zn (mg/kg jetre)	Se (mg/kg jetre)
0	24,19±11,35 <sup>a</sup>	51,21±3,53 <sup>a</sup>	0,85±0,30 <sup>a</sup>
0,5	25,29±12,46 <sup>a</sup>	50,11±1,59 <sup>a</sup>	0,89±0,20 <sup>a</sup>
1	22,77±24,66 <sup>a</sup>	50,70±2,98 <sup>a</sup>	0,83±0,33 <sup>a</sup>
2	27,27±4,18 <sup>a</sup>	49,10±3,73 <sup>a</sup>	0,86±0,13 <sup>a</sup>
4	20,94±1,71 <sup>a</sup>	49,45±4,13 <sup>a</sup>	0,82±0,20 <sup>a</sup>
8	23,30±1,23 <sup>a</sup>	45,97±10,02 <sup>b</sup>	0,98±0,26 <sup>a</sup>
16	17,83±1,40 <sup>b</sup>	45,89±11,77 <sup>b</sup>	0,55±0,05 <sup>b</sup>

Koncentracije bioelemenata su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ). Doze PCB date su u mg/kg t.m/dan.

#### 4.2.3.5. Efekti na parametre oksidativnog stresa

Kako bi se ispitaio uticaj subakutnog tretmana PCB na enzimske i neenzimske komponente antioksidativne zaštite, ispitana je aktivnost citosolne izoforme enzima SOD (CuZnSOD) i sadržaj GSH u jetri. Na Slici 24A može se uočiti da intoksikacija PCB nije dovela do statistički značajnih poremećaja u sadržaju GSH. Aktivnost CuZnSOD bila je značajno smanjena pod uticajem doza  $\geq 2$  mg PCB/kg t.m/dan uz skoro 20% manju aktivnost CuZnSOD u jetri pacova koji su tretirani najvišom dozom ukoliko se upoređi sa aktivnošću ovog enzima u kontrolnoj grupi (Slika 24B).

Da bi se utvrdio razvoj oksidativnog stresa u jetri pacova pod uticajem PCB ispitan je nivo MDA i ukupnih -SH grupa (Slike 24 C i D). Primena PCB tokom 28 dana u dozama  $\geq 1$  mg/kg t.m/dan dovela je do statistički značajnog povećanja nivoa MDA u jetri. Ovo povećanje bilo je najizraženije pri primeni najviše doze kada su detektovani nivoi MDA 2,5 puta viši u odnosu na kontrolne nivoe. Nivoi ukupnih -SH grupa bili su smanjeni za 3-36% u uslovima primene PCB, iako je taj pad bio statistički značajan samo u dozama  $\geq 4$  mg/kg t.m/dan.



Slika 24. Uticaj različitih doza PCB na nivoe GSH (A), CuZnSOD (B), ukupne -SH (C) i MDA (D) u homogenatima jetre *Wistar* pacova izloženih PCB tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $\bar{X}_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

Doza–odnos odgovor potvrđen je za sve ispitivane parametre. Vrednosti  $CED_5$  i njihove donje granice pouzdanosti izračunate su iz *fitovanih* kriva koje su dobijene za svaki od parametara, a iste kalkulacije su urađene i kada je kritični efekat podešen na 10%. Najniža doza PCB izračunata je za MDA i iznosila je 0,16 mg PCB/kg t.m./dan sa donjom granicom pouzdanosti 0,07 mg PCB/kg t.m./dan za 5% efekta i 0,26 i 0,12 mg PCB/kg t.m./dan za  $CED_{10}$  odnosno  $CEDL_5$ . Efekat na CuZnSOD aktivnost okarakterisan je vrednošću  $CED_5$  0,66 mg PCB/kg t.m./dan uz  $CEDL_5$  0,33 mg PCB/kg t.m./dan odnosno  $CED_{10}$  0,78 mg PCB/kg t.m./dan uz  $CEDL_{10}$  0,78 mg PCB/kg t.m./dan. Ako se posmatraju izračunate CED vrednosti, efekti PCB na GSH i ukupne nivoe -SH grupa su manje izraženi nego efekti na MDA nivoe i aktivnost CuZnSOD enzima. Kao mera statističke nesigurnosti izračunat je CED/CEDL odnos koji je u svim slučajevima bio ispod 10 što ukazuje da se dobijeni podaci mogu smatrati relevantnim.

**Tabela 21. Dozna zavisnost, izračunate CED doze PCB i procenjene vrednosti NOAEL za efekte PCB na ispitivane parametre oksidativnog stresa u jetri.**

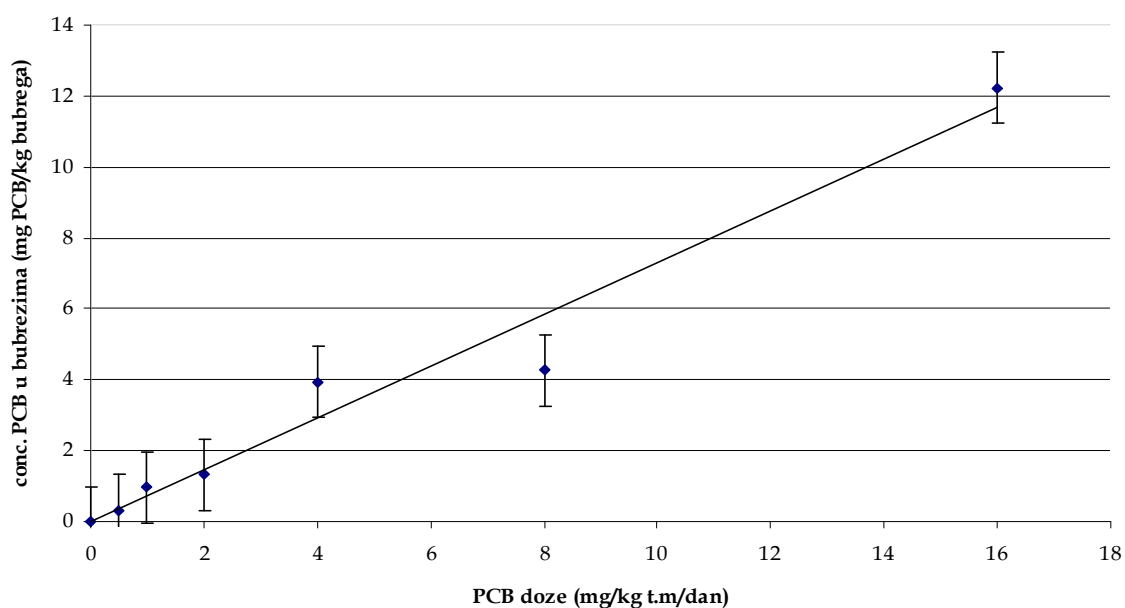
Parametar	Dozna zavisnost	CEDL <sub>5</sub>	CEDL <sub>5</sub>	CED <sub>10</sub>	CEDL <sub>10</sub>	NOAEL
MDA	+	0,16	0,07	0,26	0,12	1
CuZnSOD	+	0,66	0,33	1,6	0,78	1
GSH	+	2,11	1,26	2,59	1,82	>16
TSH	+	2,71	2,38	5,57	4,88	4

CED - granična Benchmark doza/kritična doza; CED<sub>5</sub>-kritična doza dovodi do 5% promene efekta; CEDL<sub>5</sub>-statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 5% promene efekta; CED<sub>10</sub>-kritična doza dovodi do 10% promene efekta; CEDL<sub>10</sub>-statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 10% promene efekta; NOAEL- doza koja ne dovodi do štetnog efekta procenjena na osnovu rezultata eksperimenta; (-) ne postoji dozna zavisnost efekta; (+) postoji dozna zavisnost efekta. Vrednosti su dobijene upotrebom softvera PROAST. Sve doze izražene su u mg PCB/kg t.m./dan.

Tačna NOAEL vrednost za parametar GSH ne može biti procenjena na osnovu ovog eksperimenta, može se samo reći da je ova vrednost >16 mg PCB/kg t.m./dan. Za ostala tri parametra procenjene su NOAEL vrednosti koje su bile više od izračunatih CEDL<sub>5</sub> i CEDL<sub>10</sub>, osim u slučaju CEDL<sub>10</sub> za ukupne -SH grupe koja je bila viša od procenjene NOAEL vrednosti. Razlike između vrednosti CED<sub>5</sub> i NOAEL vrednosti su bile izraženije od razlika između vrednosti CED<sub>10</sub> i NOAEL. Najveća razlika između izračunatih CED vrednosti i procenjenih NOAEL vrednosti uočena je za MDA sadržaj gde je CEDL<sub>10</sub> bio 8,3 puta niži i CEDL<sub>5</sub> bio 14 puta niži od procenjene NOAEL vrednosti za ovaj parametar. Vrednosti NOAEL i CED doza date su u Tabeli 21.

#### 4.2.4. Efekti na bubrege

Nakon primene doza 0,5; 1; 2; 4; 8 i 16 mg/kg t.m./dan izmereni nivoi PCB u bubrezima bili su 0,334; 0,962; 1,318; 3,994; 4,272; 12,225 mg PCB/kg vlažne mase bubrega (Slika 25). U kontrolnoj grupi nivoi PCB u bubrezima bili su ispod limita kvantifikacije. Utvrđena je jaka pozitivna korelacija ( $r=0,92$ ,  $n=48$ ,  $P<0,0001$ ) između eksternih i internih doza PCB na osnovu čega se može zaključiti da je procena uticaja različitih doza PCB na parametre funkcije bubrega, kao i parametre oksidativnog stresa u bubrezima moguća.



Slika 25. Odnos primenjene eksterne doze PCB i koncentracije PCB (interne doze) u bubrezima *Wistar* pacova izloženih različitim dozama PCB tokom 28 dana.

#### 4.2.4.1. Efekti na relativnu masu organa

Kako podaci nisu pratili normalnu raspodelu, relativne mase bubrega predstavljene su kao medijane uz odgovarajući opseg vrednosti (Tabela 22). Odgovarajućom statističkom analizom nisu utvrđene statistički značajne promene u relativnoj masi bubrega pod uticajem PCB, kao ni dozna zavisnost ovog parametra.

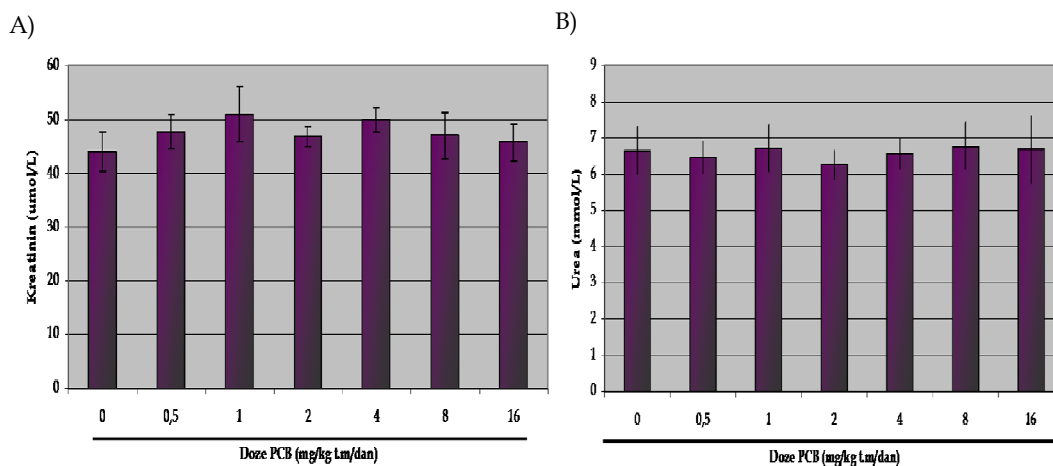
Tabela 22. Efekat različitih doza PCB na relativnu masu bubrega *Wistar* pacova izloženih PCB tokom 28 dana

PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa bubrega	
	Medijana	Opseg
0	0,689 <sup>a</sup>	0,183
0,5	0,736 <sup>a</sup>	0,346
1	0,681 <sup>a</sup>	0,205
2	0,651 <sup>a</sup>	0,11
4	0,594 <sup>a</sup>	0,136
8	0,671 <sup>a</sup>	0,403
16	0,683 <sup>a</sup>	0,286

Vrednosti su predstavljene kao medijane uz opseg vrednosti. Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (Kruskal-Volison test, test razlike između medijana;  $P < 0,05$ ).

#### 4.2.4.2. Efekti na parametre funkcije bubrega u serumu

Ispitivani su urea i kreatinin kao parametri funkcije bubrega i utvrđeno je da primenjene doze PCB nisu dovele do statistički značajnih promena u serumskim nivoima ovih parametara (Slika 26). Dozna zavisnost utvrđena je za uticaj PCB na ureu. Izračunate vrednosti bile su 12,5 mg PCB/kg t.m./dan za CED<sub>5</sub> uz donju granicu pouzdanosti 8,28 mg PCB/kg t.m./dan i 14,4 mg PCB/kg t.m./dan za CED<sub>10</sub> uz donju granicu pouzdanosti 11,68 mg PCB/kg t.m./dan. Procenjena NOAEL vrednost na osnovu ovog eksperimenta bila je >16 mg PCB/kg t.m./dan odnosno nije bilo moguće proceniti tačnu NOAEL vrednost na osnovu podataka dobijenih u eksperimentu.



Slika 26. Uticaj različitih doza PCB na koncentraciju kreatinina (A) i uree (B) u krvi *Wistar* pacova izloženih različitim dozama PCB tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $\bar{X}_{sr} \pm SD$  ( $n=7$ ). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

#### 4.2.4.3. Efekti na koncentracije bioelemenata

Primena PCB nije dovela je do statistički značajnih promena u sadržaju Fe, Se, Mn i Cu. Statistički značajan pad uočen je u slučaju Zn, pri čemu su vrednosti Zn u grupi koja je tretirana najvišom dozom PCB bile za oko 24% niže u odnosu na nivoe Zn u bubrezima pacova kontrolne grupe (Tabela 23). Statistički

značajan pad nivoa Zn u bubrezima javio se već pri dozama PCB  $\geq 2$  mg/kg t.m./dan.

Tabela 23. Efekat različitih doza PCB na nivoe Mg, Fe, Zn, Se, Mn i Cu u bubrezima Wistar pacova izloženih PCB tokom 28 dana.

PCB doze (mg/kg t.m./dan)	Fe (mg/kg bubrega)	Zn (mg/kg bubrega)	Se (mg/kg bubrega)	Mn (mg/kg bubrega)	Cu (mg/kg bubrega)
0	40,53 $\pm$ 3,23 <sup>a</sup>	26,12 $\pm$ 1,33 <sup>a</sup>	1,20 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	1,23 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	7,05 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>
0,5	40,11 $\pm$ 4,33 <sup>a</sup>	25,11 $\pm$ 2,15 <sup>a</sup>	1,20 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,24 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	7,00 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
1	41,22 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>	25,34 $\pm$ 2,22 <sup>a</sup>	1,21 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,22 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	7,02 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
2	39,10 $\pm$ 2,10 <sup>a</sup>	27,00 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>	1,22 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	1,23 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	7,00 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>
4	40 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	27,93 $\pm$ 0,72 <sup>b</sup>	1,21 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,22 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	7,16 $\pm$ 1,07 <sup>a</sup>
8	40,7 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	28,22 $\pm$ 1,14 <sup>b</sup>	1,21 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,21 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	7,02 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>
16	40,12 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	30,07 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>	1,22 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,20 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	7,07 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>

Koncentracije bioelemenata su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test; P<0,05).

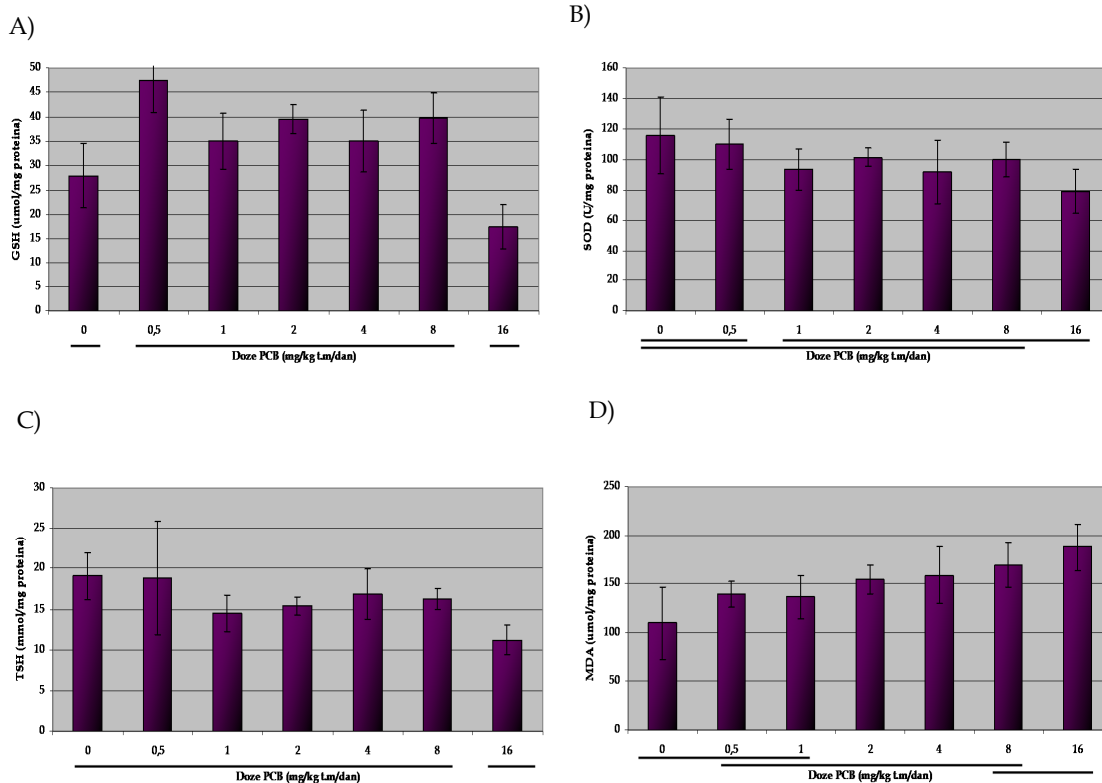
#### 4.2.4.4. Efekti na parametre oksidativnog stresa

Efekti ispitivanih doza Cd na komponente antioksidativne zaštite u bubregu kao i na parametre oksidativnog stresa u bubrezima prikazan je na Slici 27. Efekat PCB na GSH bio je dvojak. Naime, doze PCB od 0,5 do 8 mg/kg t.m./dan izazvale su značajan porast nivoa GSH u odnosu na kontrolne nivoe, dok je primena najviše doze PCB dovela do statistički značajnog pada vrednosti GSH. Efekti na aktivnost CuZnSOD bili su jasniji za tumačenje, s obzirom na to da je samo najviša doza dovela do značajnog sniženja aktivnosti ove izoforme enzima kada se upoređi sa aktivnošću enzima u kontrolnoj grupi, pri čemu je aktivnost enzima u ovoj grupi u proseku iznosila 68% aktivnosti kontrolne grupe. Koncentracija ukupnih -SH grupa bila je snižena usled primene najviše doze PCB za gotovo 42% u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj grupi. Značajan porast nivoa MDA u bubrezima uočen je pri dozama  $\geq 2$  mg/kg t.m./dan, pri čemu je najviša doza dovela do nivoa MDA koji su bili viši za oko 1,7 puta u odnosu na srednje nivoe MDA izmerene u kontroli.

Utvrđena je jaka negativna korelacija između nivoa CuZnSOD i MDA,  $r=-0,769$ ,  $n=30$ ,  $P<0,0001$ , tako što je niska aktivnost CuZnSOD bila praćena



visokim nivoima MDA u homogenatima bubrega. Između ostalih ispitivanih parametara oksidativnog stresa nije uočena značajna korelacija. Negativna korelacija srednje jačine utvrđena je za nivoe Zn u bubrezima i aktivnost CuZnSOD ( $r=0,41$ ,  $n=30$ ,  $P<0,005$ ).



**Slika 27.** Uticaj različitih doza Cd na nivoe GSH (A), CuZnSOD (B), ukupnih -SH (C) i MDA (D) u homogenatima bubrega *Wistar* pacova izloženih PCB tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $\bar{X}_{sr} \pm SD$  ( $n=7$ ). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test;  $P<0,05$ ).

Za sve ispitivane parametre oksidativnog stresa u bubrezima utvrđena je dozna zavisnost. Izračunate CED vrednosti, kao i procenjene NOAEL vrednosti na bazi podataka dobijenih u eksperimentu prikazane su u Tabeli 24. Izračunate CED<sub>5</sub> i CED<sub>10</sub> vrednosti odnose se na pad nivoa GSH. Najniža vrednost CED<sub>L5</sub> utvrđena je za parametar MDA, dok su izračunate vrednosti donjih granica pouzdanosti za efekte od 5% i 10% niže za efekat PCB na aktivnost CuZnSOD enzima, nego na sadržaj GSH, pa se može zaključiti da PCB ispoljavaju izraženiji efekat na enzimsku komponentu antioksidativne zaštite. Procenjena NOAEL vrednost bila je niža nego CED vrednosti izračunate za GSH, jer se pri

proceni NOAEL doze posmatra efekat porasta ovog parametra, dok je pri izračunavanju CED doze prilikom *fitovanja* krive odnosa doza–odgovor efekat na sniženje sadržaja uzet kao primarni efekat. Ostale procenjene NOAEL vrednosti bile su više od izračunatih CED vrednosti, sem u slučaju CED<sub>10</sub> i CEDL<sub>10</sub> izračunate za efekat na MDA koje su bile nešto više od procenjene NOAEL vrednosti za ovaj parametar. Kao mera statističke nesigurnosti izračunat je CED/CEDL odnos koji je u svim slučajevima bio ispod 10 što ukazuje da se dobijeni podaci mogu smatrati relevantnim.

**Tabela 24. Dozna zavisnost, izračunate CED doze Cd i procenjene vrednosti NOAEL za efekte PCB na ispitivane parametre oksidativnog stresa u bubrezima.**

Parametar	Dozna zavisnost	CED <sub>5</sub>	CEDL <sub>5</sub>	CED <sub>10</sub>	CEDL <sub>10</sub>	NOAEL
MDA	+	0,96	0,82	1,60	1,87	1
SOD	+	2,93	2,04	4,19	6,01	8
GSH	+	12,20	6,53	13,10	8,27	2
TSH	+	2,08	1,53	4,27	3,13	8

CED – granična Benchmark doza/kritična doza; CED<sub>5</sub>–kritična doza dovodi do 5% promene efekta; CEDL<sub>5</sub>–statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 5% promene efekta; CED<sub>10</sub>–kritična doza dovodi do 10% promene efekta; CEDL<sub>10</sub>–statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 10% promene efekta; NOAEL- doza koja ne dovodi do štetnog efekta procenjena na osnovu rezultata eksperimenta; (-) ne postoji dozna zavisnost efekta; (+) postoji dozna zavisnost efekta. Vrednosti su dobijene upotrebom softvera PROAST. Sve doze izražene su u mg PCB/kg t.m/dan.

#### 4.2.5. Efekti na štitastu žlezdu

##### 4.2.5.1. Efekti na relativnu masu organa

Primena PCB dovela je do statistički značajnog sniženja relativne mase tireoidne žlezde (Tabela 25). Utvrđeno je postojanje odnosa doza-odgovor, a izračunata CED vrednost za efekat 5% iznosila je 0,25 mg PCB/kg t.m/dan uz donju granicu pouzdanosti 0,05 mg PCB/kg t.m/dan, dok je CED vrednost za 10% efekta bila 1,25 mg PCB/kg t.m/dan uz donju granicu pouzdanosti 0,27 mg PCB/kg t.m/dan. Procenjena NOAEL vrednost je iznosila 1 mg PCB/kg t.m/dan.

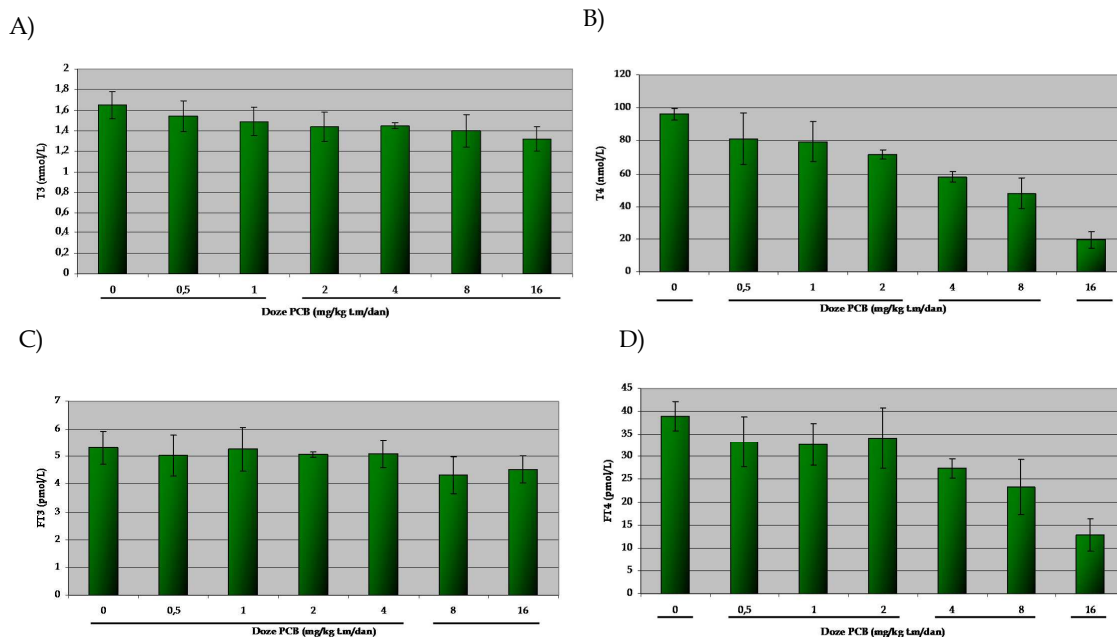
Tabela 25. Efekat različitih doza PCB na relativnu masu štitaste žlezde *Wistar* pacova izloženih Cd tokom 28 dana.

PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa štitaste žlezde
0	0,165±0,024 <sup>a</sup>
0,5	0,165±0,045 <sup>a</sup>
1	0,163±0,016 <sup>a</sup>
2	0,156±0,019 <sup>b</sup>
4	0,152±0,016 <sup>b</sup>
8	0,150±0,034 <sup>b</sup>
16	0,145±0,027 <sup>b</sup>

Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

#### 4.2.5.2. Efekti na nivoe hormona štitaste žlezde u serumu

Izraženiji efekat PCB su ispoljili na T4 nego na T3 hormon. Naime, sve primenjene doze PCB dovele su do statistički značajnog smanjenja nivoa hormona T4 u serumu tretiranih pacova, a najviša doza smanjila je nivoe ovog hormona u krvi na svega 20% nivoa izmerenih u kontrolnoj grupi (Slika 28B). Pod istim eksperimentalnim uslovima uočeno je i smanjenje nivoa slobodne forme ovog hormona FT4 takođe pri svim primenjenim dozama PCB (Slika 28D). Utvrđena je izuzetno jaka pozitivna korelacija ( $r=0,971$ ,  $n=35$ ,  $P < 0,001$ ) između nivoa slobodne forme i T4 forme vezane za proteine plazme.



Slika 28. Uticaj različitih doza PCB na nivoe T3 (A), T4 (B), FT3 (C) i FT4 (D) u serumu *Wistar* pacova izloženih PCB tokom 28 dana. Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Vrednosti koje su označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

Nivoi T3 hormona takođe su sniženi u odnosu na kontrolnu grupu ali tek pri dozama  $\geq 2$  mg PCB/kg t.m/dan (Slika 28A). Značajan pad nivoa FT3 uočen je tek pri dvema najvišim dozama (Slika 28C), iako je jaka pozitivna korelacija utvrđena i između ova dva parametra ( $r=0,875$ ,  $n=42$ ,  $P<0,001$ ).

Dozna zavisnost potvrđena je u slučaju svih ispitivanih hormona štitaste žlezde, sa izuzetkom FT4. Vrednosti CED<sub>5</sub> i CED<sub>10</sub> izračunate iz *fitovanih* krivih dobijenih za svaki od ispitivanih hormona, a izračunate CED vrednosti, kao i procenjene NOAEL vrednosti na bazi podataka dobijenih u eksperimentu prikazane su u Tabeli 26. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je kritični efekat PCB na funkciju štitaste žlezde upravo efekat koji ova hemikalija ispoljava na nivoe enzima T4. Kao mera statističke nesigurnosti izračunat je CED/CEDL odnos koji je u svim slučajevima bio ispod 10 što ukazuje da se dobijeni podaci mogu smatrati relevantnim.

**Tabela 26. CED doze PCB za efekte na ispitivane hormone tireoidne žlezde.**

Parametar	Dozna zavisnost	CED <sub>5</sub>	CEDL <sub>5</sub>	CED <sub>10</sub>	CEDL <sub>10</sub>	NOAEL
T4	+	0,542	0,504	1,11	1,034	<0,5
FT4	-					
T3	+	0,976	0,754	1,418	0,923	<0,5
FT3	+	0,773	0,694	1,418	1,590	4

CED – granična Benchmark doza/kritična doza; CED<sub>5</sub>–kritična doza dovodi do 5% promene efekta; CEDL<sub>5</sub>–statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 5% promene efekta; CED<sub>10</sub>–kritična doza dovodi do 10% promene efekta; CEDL<sub>10</sub>–statistička donja granica pouzdanosti CED koja dovodi do 10% promene efekta; NOAEL- doza koja ne dovodi do štetnog efekta procenjena na osnovu rezultata eksperimenta; (-) ne postoji dozna zavisnost efekta; (+) postoji dozna zavisnost efekta. Vrednosti su dobijene upotrebom softvera PROAST. Sve doze izražene su u mg PCB/kg t.m/dan.

### 4.3. TOKSIČNI EFEKTI SMEŠE KADMIJUMA I POLIHLOOROVANIH BIFENILA

#### 4.3.1. Efekti na prinos telesne mase

Tabela 27 predstavlja prirast masa dobijen u svih devet grupa koje su tretirane smešama različitih doza Cd i PCB, pri čemu se kao grupa u odnosu na koju se poredi efekat koristi grupa koja je primala samo jednu od supstanci u odgovarajućoj dozi. Uočava se da je u većini grupa koje su primale smešu ove dve supstance prirast mase bio statistički značajno niži nego u grupama koje su tretirane samo jednom od supstanci u dozi koja je ista kao doza te supstance korišćena u smeši. Može se zaključiti da, primenjene zajedno, ove dve hemikalije imaju izraženiji efekat na prirast t.m. nego pojedinačne supstance u gotovo svim kombinacijama. Međutim, kako nije pokazana dozna zavisnost ovog parametra za obe hemikalije, ne može se utvrditi da li ove supstance ispoljavaju aditivni efekat na ovaj parametar ili stupaju u interakcije.

Tabela 27. Efekat smeše različitih doza Cd i PCB na prirast mase *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti.

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Prirast mase	PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Prirast mase
1,25+0	0,64±0,10	2+0	0,81±0,15
1,25+2	0,40±0,19*	2+1,25	0,40±0,15*
1,25+4	0,56±0,18*	2+2,5	0,56±0,19*
1,25+8	0,32±0,07*	2+5	0,39±0,06*
2,5+0	0,65±0,15	4+0	0,54±0,07
2,5+2	0,56±0,19	4+1,25	0,56±0,18
2,5+4	0,61±0,12	4+2,5	0,61±0,12
2,5+8	0,40±0,11*	4+5	0,32±0,04*
5+0	0,54±0,19	8+0	0,61±0,14
5+2	0,39±0,06*	8+1,25	0,32±0,07*
5+4	0,32±0,04*	8+2,5	0,40±0,11*
5+8	0,24±0,05*	8+5	0,24±0,05*

Vrednosti su predstavljene kao  $\bar{x}_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test; P<0,05).

#### 4.3.2. Uticaj smeše na sadržaj Cd i PCB u krvi, jetri i bubregu

Merenje sadržaja Cd u krvi pacova izloženih smešama Cd i PCB pokazalo je da PCB primenjeni u sve tri doze u kombinaciji sa Cd nisu imali statistički značajan uticaj na nivoe Cd u krvi i bubregu. Međutim, ko-tretman PCB je u svim doznim kombinacijama doveo do viših koncentracija Cd u poređenju sa vrednostima izmerenim u jetri životinja tretiranih samo Cd (Tabela 28).

Tabela 28. Efekat smeše različitih doza Cd i PCB na sadržaj Cd u krvi, jetri i bubrezima *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti.

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Koncentracije Cd		
	krv (mg/L)	jetra (mg/kg)	bubreg (mg/kg)
1,25+0	7,92±3,99	3,93±0,3	2,85±0,30
1,25+2	7,4±2,4	5,66±0,93*	3,52±0,86
1,25+4	7,7±1,8	5,03±0,11*	3,53±0,46
1,25+8	7,2±2,7	5,29±0,18*	3,57±0,70
2,5+0	24,9±6,87	4,55±0,14	4,74±0,08
2,5+2	23,8±2,8	6,35±0,17*	4,62±0,62
2,5+4	22,9±3,8	5,30±0,5*	4,25±0,13
2,5+8	21,2±4,8	8,71±0,85*	4,55±0,42
5+0	57,67±18,06	14,67±0,73	11,36±0,35
5+2	56,9±17,5	17,03±0,22*	10,73±0,34
5+4	59±7,99	17,88±0,96*	10,65±0,18
5+8	58,2±13,0	18,79±0,14*	11,37±0,98

Koncentracije Cd predstavljene su kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

Tabela 29 sadrži izmerene koncentracije PCB u jetri i bubrezima pacova koji su tretirani smešama različitih doza Cd i PCB. Uočava se da je ko-tretman sa Cd u svim doznim kombinacijama doveo do viših koncentracija PCB u jetri nego pojedinačan tretman PCB. Nema efekata smeša na nivoe PCB u bubrezima. Sadržaj PCB u krvi nije određivan u ovoj studiji.

Tabela 29. Efekat smeše različitih doza Cd i PCB na sadržaj PCB u jetri i bubrezima Wistar pacova nakon 28 dana izloženosti.

PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Koncentracije PCB (mg/kg)	
	jetra	bubreg
2+0	0,85±0,06	1,318±0,017
2+1,25	1,28±0,12*	1,186±0,545
2+2,5	1,71±0,39*	1,53±0,422
2+5	2,92±0,38*	1,43±0,09
4+0	2,03±0,34	3,94±0,133
4+1,25	2,70±0,56*	3,36±0,86
4+2,5	2,72±1,09*	3,92±0,71
4+5	3,32±1,69*	3,38±0,97
8+0	3,02 ±0,78	4,27±0,21
8+1,25	5,73±1,18*	3,98±0,37
8+2,5	5,16±2,72*	4,23±1,05
8+5	8,66±1,99*	4,26±0,98

Koncentracije PCB u jetri i bubrezima predstavljene su kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

#### 4.3.3. Efekti na hematološke parametre

Primena smeše dovela je do izvesnih razlika u broju Er i sadržaju Hb u odnosu na grupe koje su tretirane samo pojedinačnom supstancom. U Tabeli 30 uočava se da je primena najviših doza Cd u kombinaciji sa PCB dovela do smanjenja broja Er u odnosu na broj Er u grupi koja je tretirana samo Cd u odgovarajućoj dozi (5 mg/kg t.m/dan), odnosno samo PCB u sve tri primenjene doze u okviru doznog režima smeša. Takođe, uočava se i statistički značajno smanjenje sadržaja Hb u grupi koja je tretirana najvišim dozama obe primenjivane supstance u odnosu na grupe koje su tretirane samo jednom supstancom.

Tabela 30. Efekat smeše različitih doza Cd i PCB na broj eritrocita, leukocita i trombocita i sadržaj hemoglobina *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti.

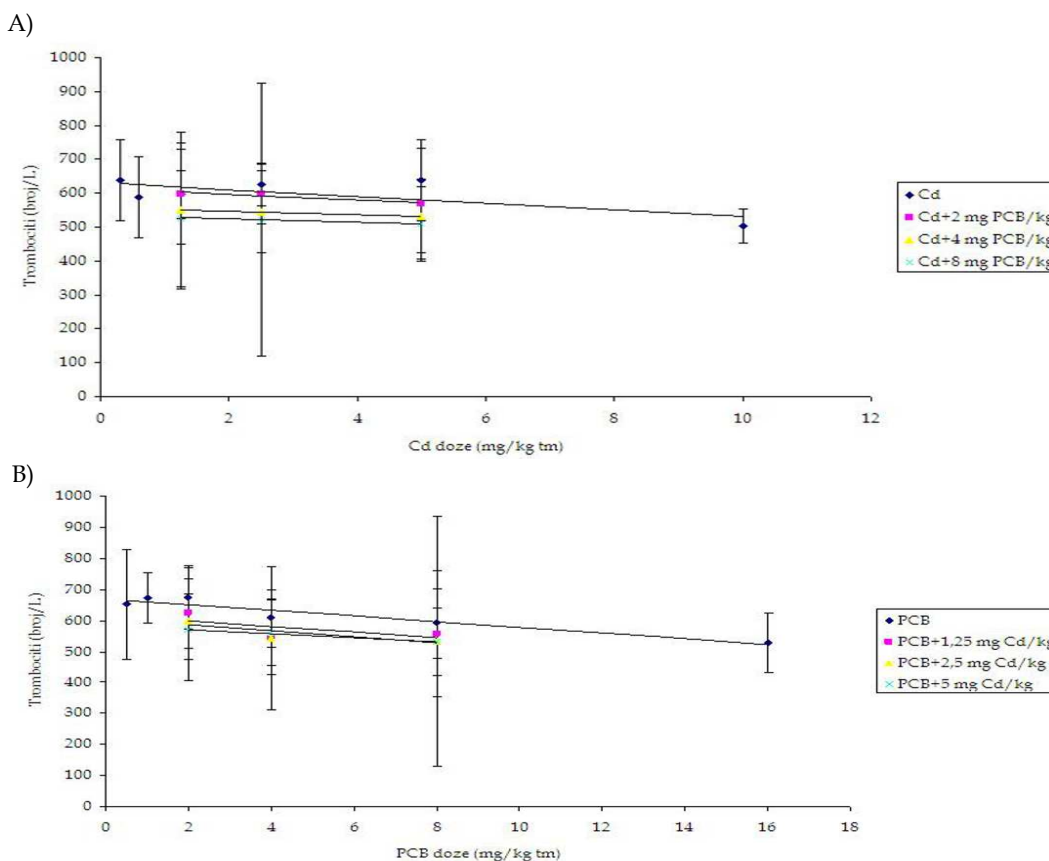
Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Eritrociti (10 <sup>12</sup> br/L)	Hemoglobin (g/L)	Leukociti (10 <sup>9</sup> br/L)	Trombociti (10 <sup>9</sup> br/L)
1,25+0	6,27±0,23	114,57±6,5	6,37±0,34	596±69,49
1,25+2	6,22±1,1	119,28±17,46	5,45±3,27*	531±49,19*
1,25+4	6,47±1,48	109,71±25,33	5,25±2,67*	541±31*
1,25+8	6,89±0,68	114,71±9,46	5,42±1,74*	526,14±3,79*
2,5+0	6,63±0,30	120,14±6,33	6,92±0,87	624,71±62,3
2,5+2	7,01±0,36	118,43±6,3	5,84±1,2*	508,57±88,57*
2,5+4	6,37±0,54	107± 9,5	5,09±0,29*	544,28±21,08*
2,5+8	6,53±0,86	106,83±17,62	4,99±0,64*	512,83±42,22*
5+0	6,43±0,51	114,43±9,95	7,01±0,95	637,57±120,2
5+2	5,25±0,27*	121,71±7,39	5,52±1,21*	569,71±64,51*
5+4	5,06±0,52*	118,57±9,16	3,94±0,2*	560±18,30*
5+8	4,73±0,35*	99,71±5,02*	4,13±0,96*	430,28±10,41*
PCB doze +Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Eritrociti (10 <sup>12</sup> br/L)	Hemoglobin (g/L)	Leukociti (10 <sup>9</sup> br/L)	Trombociti (10 <sup>9</sup> br/L)
2+0	6,61±0,67	119,67±9,17	9,97±1,06	672±97,83
2+1,25	6,22±1,1	119,28±17,46	5,45±3,27*	531±49,19*
2+2,5	7,01±0,36	118,43±6,3	5,84±1,2*	508,57±88,57*
2+5	5,25±0,27*	121,71±7,39	5,52±1,21*	569,71±64,51*
4+0	6,66±0,52	122,17±5,34	6,05±2,17	607,33±93,12
4+1,25	6,47±1,48	109,71±25,33	5,25±2,67*	541±31*
4+2,5	6,37±0,54	107± 9,5	5,09±0,29*	544,28±21,08*
4+5	5,06±0,52*	118,57±9,16	3,94±0,2*	560±18,30*
8+0	6,83±0,63	124,40±7,83	7,01±2,26	590,80±78,4
8+1,25	6,89±0,68	114,71±9,46	5,42±1,74*	526,14±3,79*
8+2,5	6,53±0,86	106,83±17,62	4,99±0,64*	512,83±42,22*
8+5	4,73±0,35*	99,71±5,02*	4,13±0,96*	430,28±10,41*

Vrednosti su predstavljene kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test; P<0,05).

Istovremena primena Cd i PCB dovela je do statistički značajnog smanjenja broja Leu i Tr u svim grupama u odnosu na kontrolne grupe tretirane pojedinačnim toksičnim agensima (Tabela 30). Kako su broj Tr i broj Leu pokazali doznu zavisnost od obe ispitivane supstance, izvršeno je poređenje nagiba kriva doza-odgovor da bi se utvrdilo eventualno prisustvo interakcija između ove dve supstance u delovanju na ova dva hematološka parametra. Nisu uočene statistički značajne razlike u nagibima krivih dobijenih za



zavisnost broja Tr od doze Cd kada se Cd primenjuje pojedinačno i u kombinaciji sa tri različite doze PCB (Slika 29A), kao ni razlike između nagiba krivih dobijenih za doznu zavisnost broja Tr od PCB primenjenog pojedinačno i u kombinaciji sa sve tri doze Cd (Slika 29B). Može se zaključiti da ispitivane hemikalije ne stupaju u interakcije kada je u pitanju uticaj na broj Tr, te da na ovaj parametar deluju aditivno, i to dovodeći do njegovog sniženja.

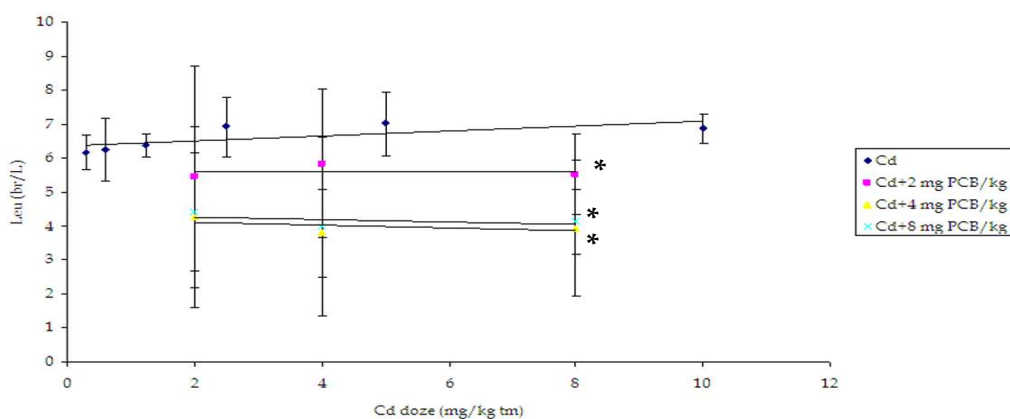


Slika 29. Doza-odgovor krive dobijene za broj trombocita u pacova tretiranih tokom 28 dana sa šest različitih doza Cd (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5;10 mg Cd/kg t.m/dan) ili sa smešama Cd (1,25; 2,5; 5 mg/kg t.m/dan) i PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) (A) i doza-odgovor krive dobijene za nivo trombocita u pacova tretiranih sa šest različitih doza PCB (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg PCB/kg t.m/dan) ili smešama PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) i Cd (1,25; 2,5 i 5 mg/kg t.m/dan) (B). Statistički značajna razlika između nagiba kriva označena je sa \*( $P < 0,05$ ), †( $P < 0,01$ ).

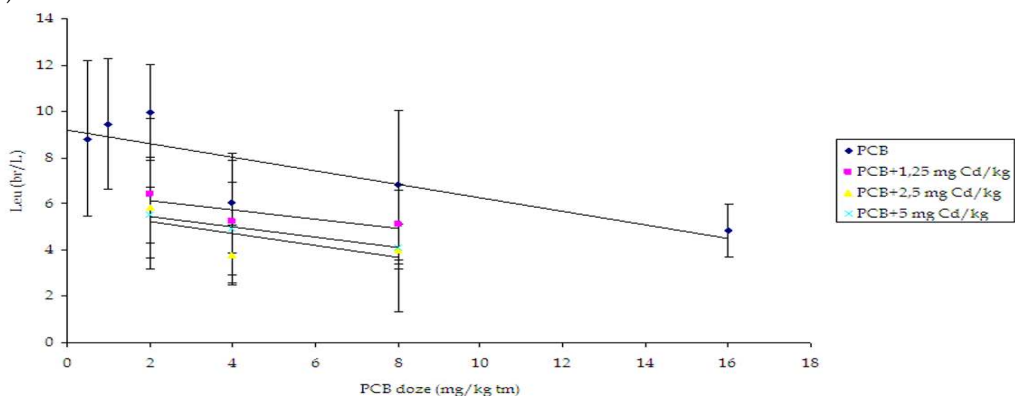
Sa druge strane, kada se posmatra uticaj na broj Leu uočava se statistički značajna razlika u nagibima krivih kada se krive zavisnosti doza Cd odgovor dobijene u prisustvu sve tri primenjene doze PCB uporede sa nagibom krive dobijene za primenu samo Cd (Slika 30A). Kako u prisutvu PCB dolazi do

zmanjenja broja Leu, dok sam Cd izaziva porast broja ovih krvnih ćelija, može se zaključiti da ove dve supstance deluju antagonistički. Međutim, kada se uporede nagibi krivih dobijenih za doznu zavisnost broja Leu od PCB u prisustvu Cd sa nagibom krive dobijene pri primeni samo PCB ne uočavaju se statistički značajne razlike odnosno može se pretpostaviti odsustvo interakcije između ove dve supstance (Slika 30B).

A)



B)



Slika 30. Doza-odgovor krive dobijene za broj leukocita u pacova tretiranih tokom 28 dana sa šest različitih doza Cd (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5;10 mg Cd/kg t.m/dan) ili sa smešama Cd (1,25; 2,5; 5 mg/kg t.m/dan) i PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) (A) i doza-odgovor krive dobijene za nivo leukocita u pacova tretiranih sa šest različitih doza PCB (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg PCB/kg t.m/dan) ili smešama PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) i Cd (1,25; 2,5 i 5 mg/kg t.m/dan) (B). Statistički značajna razlika između nagiba kriva označena je sa \*(P<0,05), †(P<0,01).

Ispitivanje koncentracija Fe u krvi pacova iz grupa koje su tretirane različitim kombinacijama doza Cd i PCB ukazalo je na statistički značajno smanjenje koncentracija ovog bioelementa u odnosu na grupe koje su primale

pojedinačne supstance. Statistički značajno smanjenje utvrđeno je u svim grupama pacova tretiranih smešama (Tabela 31).

**Tabela 31. Efekat smeša različitih doza Cd i PCB na koncentracije Fe u krvi Wistar pacova nakon 28 dana izloženosti.**

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Fe (mg/L)
1,25+0	187,68±33,42
1,25+2	93,70±16,40*
1,25+4	81,93±31,44*
1,25+8	131,39±23,16*
2,5+0	194,30±37,59
2,5+2	123,55±22,87*
2,5+4	137,72±49,46*
2,5+8	116,77±29,85*
5+0	187,92±51,84
5+2	128,24±36,72*
5+4	111,96±5,29*
5+8	138,10±28,36*

Koncentracije Fe u krvi predstavljene kao  $\bar{X}_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test; P<0,05).

#### 4.3.4. Efekti na jetru

##### 4.3.4.1. Efekti na relativnu masu organa

Primena smeše Cd i PCB u svim opsezima dovela je do statistički značajnog povećanje relativne mase jetre u poređenju sa relativnim masama jetre pacova tretiranih pojedinačnim supstancama primenjenim u odgovarajućim dozama. Dobijene relativne mase prikazane su u Tabeli 32.

**Tabela 32. Efekat smeše različitih doza Cd i PCB na relativnu masu jetre pacova nakon 28 dana izloženosti.**

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa jetre	PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa jetre
1,25+0	3,494±0,385	2+0	4,286±0,462
1,25+2	4,836±0,437*	2+1,25	4,836±0,437*
1,25+4	4,518±0,212*	2+2,5	4,781±0,241*
1,25+8	4,774±0,312*	2+5	4,716±0,096*
2,5+0	3,670±0,293	4+0	4,012±0,369
2,5+2	4,781±0,241*	4+1,25	4,518±0,212*
2,5+4	4,743±0,335*	4+2,5	4,743±0,335*

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa jetre	PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa jetre
2,5+8	4,619±0,440*	4+5	4,677±0,365*
5+0	3,389±0,269	8+0	4,351±0,716
5+2	4,716±0,096*	8+1,25	4,774±0,312*
5+4	4,677±0,365*	8+2,5	4,619±0,440*
5+8	4,397±0,567*	8+5	4,397±0,567*

Vrednosti relativne mase jetre su predstavljene  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

#### 4.3.4.2. Efekti na koncentraciju albumina

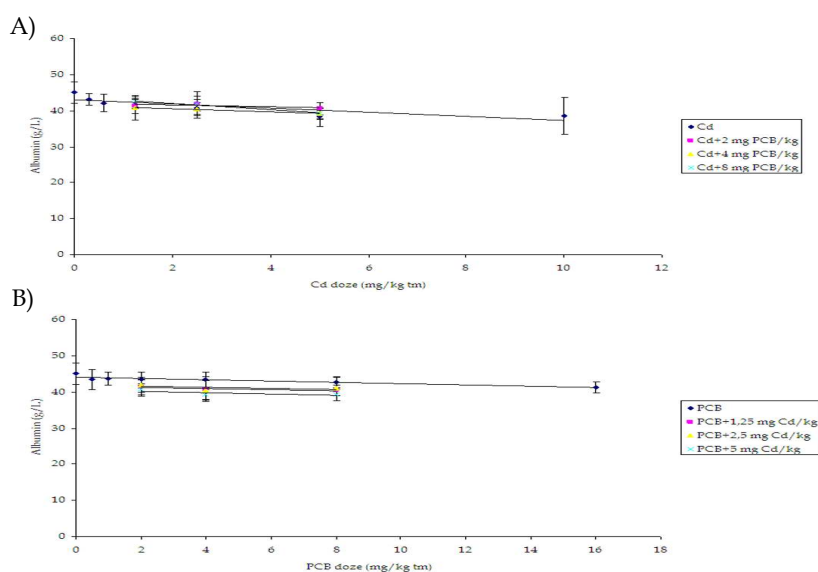
Primena smeše Cd i PCB dovela je do statistički značajnog smanjenja nivoa albumina u serumu u odnosu na nivoe koji su dobijeni pri pojedinačnoj primeni PCB, dok se pri poređenju sa nivoima albumina u serumu pacova tretiranih samo Cd ne dobijaju statistički značajne razlike, osim pri istovremenoj primeni najviših doza obe supstance (Tabela 33).

Tabela 33. Efekat smeše različitih doza Cd i PCB na koncentracije albumina u serumu *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti.

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Albumin (g/L)	PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Albumin (g/L)
1,25+0	41,9±1,29	2+0	43,52±1,93
1,25+2	41,34±2,08	2+1,25	41,34±2,08
1,25+4	40,8±3,37	2+2,5	41,96±2,07
1,25+8	40,41±1,45	2+5	40,57±1,74*
2,5+0	40,61±1,58	4+0	43,38±2,14
2,5+2	41,96±2,07	4+1,25	40,8±3,37*
2,5+4	40,53±0,54	4+2,5	40,53±0,54*
2,5+8	41,96±3,34	4+5	38,23±1,48*
5+0	38,29±2,58	8+0	42,68±1,45
5+2	40,57±1,74	8+1,25	40,41±1,45*
5+4	38,23±1,48	8+2,5	41,96±3,34*
5+8	36,53±1,55*	8+5	36,53±1,55*

Vrednosti albumina predstavljene su kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ). Doze Cd i PCB date su u mg/kg t.m/dan.

Na Slici 31A prikazane su krive dozne zavisnosti nivoa albumina od Cd pri primeni samog Cd kao i kombinaciji sa tri različite doze PCB koje ukazuju primena različitih doza Cd kao i smeše Cd i PCB dovode do smanjenje nivoa albumina u serumu što je dokazano i za različite doze PCB date pojedinačno i u smeši (Slika 31B). Iako su smanjenja koncentracija albumina pri primeni smeša izraženija, poređenjem nagiba ovih krivih nije dokazana statistička značajnost te se može zaključiti da između Cd i PCB nema interakcija već da ispoljavaju aditivan efekat na ispitivani parametar.



Slika 31. Doza-odgovor krive dobijene za serumske koncentracije albumina u pacova tretiranih tokom 28 dana sa šest različitih doza Cd (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5;10 mg Cd/kg t.m/dan) ili smešama Cd (1,25; 2,5; 5 mg/kg t.m/dan) i PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) (A) i doza-odgovor krive dobijene za serumske koncentracije albumina u pacova tretiranih sa šest različitih doza PCB (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg PCB/kg t.m/dan) ili smešama PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) i Cd (1,25; 2,5 i 5 mg/kg t.m/dan) (B). Statistički značajna razlika između nagiba kriva označena je sa \* $(P<0,05)$ , † $(P<0,01)$ .

#### 4.3.4.3. Efekti na enzimske parametre funkcije jetre

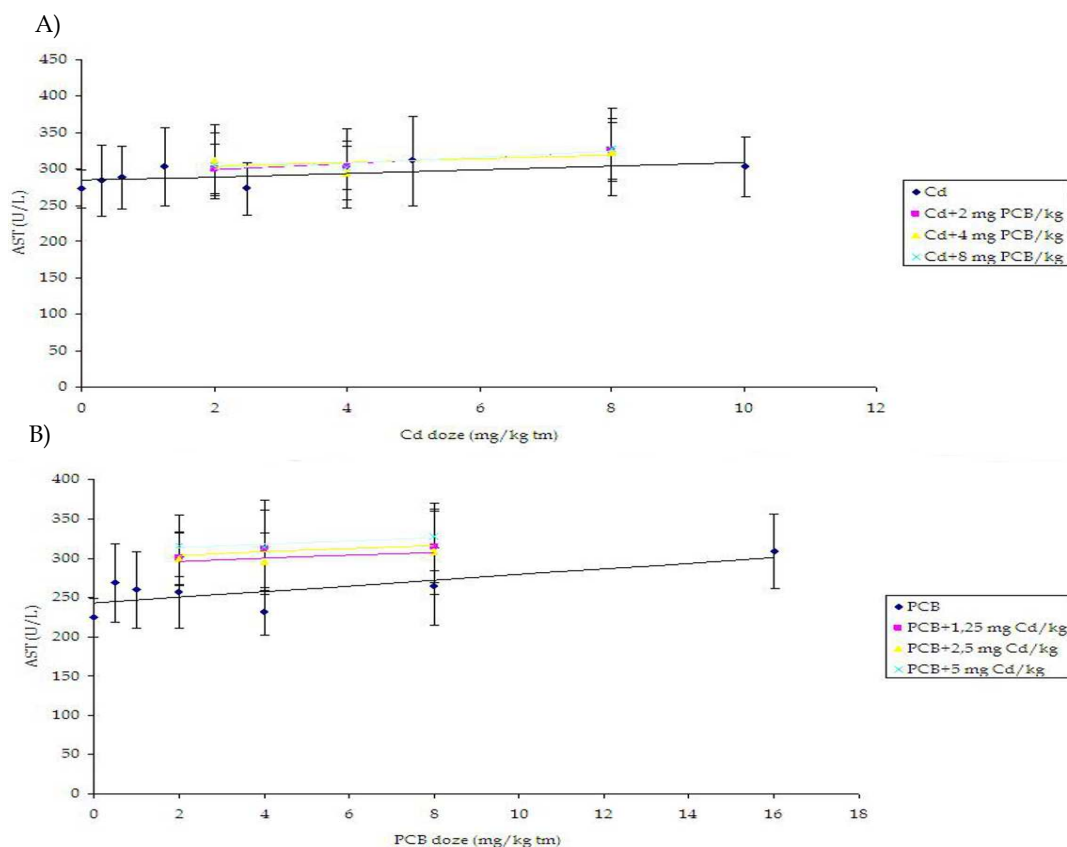
U Tabeli 34 prikazani su uticaji smeše na aktivnosti AST, ALT i ALP enzima, kao pokazatelje funkcije jetre. Primena smeše dovela je do statistički značajnog porasta nivoa AST, smanjenja nivoa ALP, dok nije imala uticaj na nivoa ALT u serumu.

Tabela 34. Efekat smeša različitih doza Cd i PCB na serumske nivoe ALT i ALP Wistar pacova nakon 28 dana izloženosti.

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)
1,25+0	303,29±54,12	63,71±10,48	200,57±48,14
1,25+2	300,29±33,4	61,29±6,32	160,00±29,3*
1,25+4	312,29±49,2*	61,86±8,40	148,17±23,63*
1,25+8	314,33±45,19*	68,33±9,11	157,57±24,81*
2,5+0	273,43±35,98	64,71±13,07	225,86±54,02
2,5+2	299,17±33,19*	59,57±8,44	167,71±32,67*
2,5+4	295,17±36,82*	73,57±14,74	207,71±22,9*
2,5+8	308,29±54,3*	59,57±13,38	167,71±20,21*
5+0	311,29±21,31	73,14±19,73	210±52,975
5+2	325,71±38,72*	66,43±6,58	200,29±28,02*
5+4	323,71±59,96*	68,57±6,88	184,14±44,42*
5+8	326,71±42,96*	77,43±11,01	170±57,5*
PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)
2+0	256,17±45,29	61±10,94	237,5±42,58
2+1,25	300,29±33,4	61,29±6,32	160,00±29,3*
2+2,5	299,17±33,19*	59,57±8,44	167,71±32,67*
2+5	325,71±38,72	66,43±6,58	200,29±28,02*
4+0	231±28,05	66,33±10,46	240,33±55,83
4+1,25	312,29±49,2*	61,86±8,40	148,17±23,63*
4+2,5	295,17±36,82*	73,57±14,74	207,71±22,9*
4+5	323,71±59,96*	68,57±6,88	184,14±44,42*
8+0	264,43±48,96	66,43±4,54	204±27,81
8+1,25	314,33±45,19*	68,33±9,11	157,57±24,81*
8+2,5	308,29±54,3*	59,57±13,38	167,71±20,21*
8+5	326,71±42,96*	77,43±11,01	170±57,5*

Vrednosti AST, ALT i ALP predstavljene su kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

Kako je jedino za aktivnost AST enzima u serumu utvrđena dozna zavisnost od obe primenjene hemikalije ispitano je postojanje interakcija između ove dve hemikalije. Utvrđeno je odsustvo interakcija, odnosno aditivno delovanje ovih hemikalija na nivoe AST enzima u serumu kada je poređeno vršeno sa krivom zavisnosti od doza Cd i krivom zavisnosti od doza PCB (Slika 32).



Slika 32. Doza-odgovor krive dobijene za serumsku aktivnost AST u pacova tretiranih tokom 28 dana sa šest različitih doza Cd (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5;10 mg Cd/kg t.m/dan) ili smešama Cd (1,25; 2,5; 5 mg/kg t.m/dan) i PCB (2;4;8 mg/kg t.m/dan) (A) i doza-odgovor krive dobijene za serumsku aktivnost AST u pacova tretiranih sa šest različitih doza PCB (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg PCB/kg t.m/dan) ili smešama PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) i Cd (1,25; 2,5 i 5 mg/kg t.m/dan) (B). Statistički značajna razlika između nagiba kriva označena je sa \*( $P < 0,05$ ), †( $P < 0,01$ ).

#### 4.3.4.4. Efekti na koncentraciju bioelemenata

Tabela 35 daje prikaz nivoa bioelemenata u jetri pacova grupa koje su tretirane smešama Cd i PCB. Može se uočiti da je istovremena primena Cd i PCB u gotovo svim doznim kombinacijama dovela do statistički značajnog porasta nivoa Fe u jetri u odnosu na nivoe izmerene u jetri pacova tretiranih samo jednom supstancom u odgovarajućoj dozi. Takođe uočava se i statistički značajno smanjenje nivoa Zn u svim doznim kombinacijama u grupama koje su primale smeše u odnosu na nivoe Zn u jetri pacova koji su trovani pojedinačnim supstancama. Primena smeša nije imala uticaj na nivoe Se u jetri pacova.

Tabela 35. Efekat smeša različitih doza Cd i PCB na nivoe Fe, Zn i Se u jetri Wistar pacova nakon 28 dana izloženosti.

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Fe (mg/kg jetre)	Zn (mg/kg jetre)	Se (mg/kg jetre)
1,25+0	39,27± 5,18	46,10±1,73	1,36±0,23
1,25+2	34,65±4,95	27,18±1,60*	1,35±0,45
1,25+4	40,25±4,64*	15,94±2,16*	1,47±0,38
1,25+8	47,48±3,88*	15,82±1,32*	1,49±0,25
2,5+0	10,94± 3,71	46,45± 3,15	1,32±0,18
2,5+2	27,51±4,58*	16,06±0,62*	1,21±0,24
2,5+4	28,95±2,82*	15,81±1,71*	1,22±0,34
2,5+8	28,75±5,00*	13,39±1,47*	1,29±0,03
5+0	13,30± 3,23	46,97± 11,88	0,88 ±0,16
5+2	25,57±4,41*	10,99±1,41*	0,85±0,04
5+4	26,87±4,57*	13,97±3,29*	0,92±0,14
5+8	25,26±2,86*	10,42±3,37*	0,94±0,08
PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Fe (mg/kg jetre)	Zn (mg/kg jetre)	Se (mg/kg jetre)
2+0	27,27± 4,18	49,10 ±3,73	0,86±0,13
2+1,25	34,65±4,95*	27,18±1,60*	1,35±0,45
2+2,5	27,51±4,58	16,06±0,62*	1,21±0,24
2+5	25,57±4,41	10,99±1,41*	0,85±0,04
4+0	20,94 ±1,71	49,45±4,13	0,82±0,20
4+1,25	40,25±4,64*	15,94±2,16*	1,47±0,38
4+2,5	28,95±2,82*	15,81±1,71*	1,22±0,34
4+5	26,87±4,57*	13,97±3,29*	0,92±0,14
8+0	23,30± 1,23	46,97± 11,88	0,98 ±0,16
8+1,25	47,48±3,88*	15,82±1,32*	1,49±0,25
8+2,5	28,75±5,00*	13,39±1,47*	1,29±0,03
8+5	25,26±2,86*	10,42±3,37*	0,94±0,08

Vrednosti koncentracije bioelemenata predstavljene su kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

#### 4.3.4.5. Efekti na parametre oksidativnog stresa

U Tabeli 36 prikazan je efekat smeše različitih doza Cd i PCB na aktivnost enzima CuZnSOD i sadržaj GSH, MDA i ukupnih -SH grupa u homogenatima jetre. Uočava se statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima CuZnSOD kao i sadržaja GSH i nivoa MDA u svim grupama tretiranim smešama, te smanjenje nivoa ukupnih -SH grupa kada se uporede nivoi u grupama tretiranim kombinacijama ove dve supstance sa nivoima dostignutim u grupama koje su tretirane samo odgovarajućom dozom PCB.

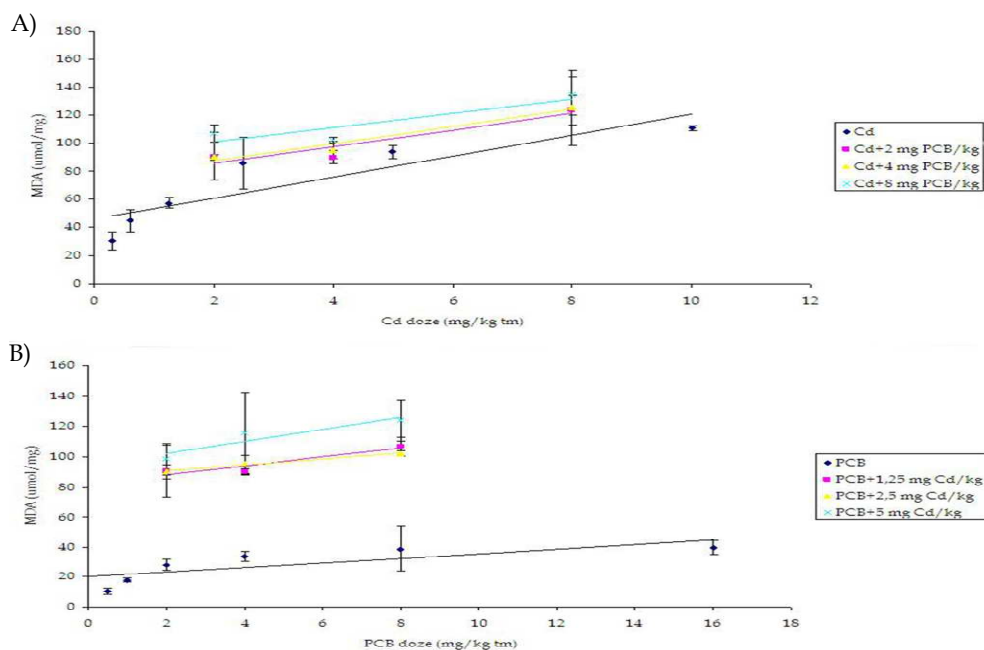


Tabela 36. Efekat smeše različitih doza Cd i PCB na aktivnost enzima CuZnSOD i nivoe GSH, ukupnih -SH grupa i MDA u homogenatima jetre *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti.

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	CuZnSOD (U/mg proteina)	GSH (μmol/mg proteina)	Ukupne -SH grupe (mmol/mg proteina)	MDA (μmol/mg proteina)
1,25+0	60,78±3,73	31,41±3,5	55,93 ±7,50	57,36±3,88
1,25+2	40,22±1,5*	19,27±1,87*	57,18±3,15	90,39±17,18*
1,25+4	44,59±2,20*	15,83±3,17*	51,35±7,61	89,95±4,76*
1,25+8	40,23±5,42*	15,45±0,86*	50,54±3,04	98,43±10,26*
2,5+0	60,03±3,62	22,67±1,8	52,74± 3,70	85,45±18,64
2,5+2	42,04±2,9*	19,00±2,2*	50,66±3,74	90,17±1,92*
2,5+4	44,77±2,48*	13,45±0,91*	49,92±5,7	95,17±6,02*
2,5+8	42,06±4,49*	13,64±1,98*	48,31±5,3	115,5±27,06*
5+0	59,58± 1,38	25,84±3,7	55,80± 7,23	93,86±4,77
5+2	40,23±5,42*	16,56±2,84*	53,92±3,27	106,82±6,31*
5+4	43,9±1,02*	13,04±1,03*	52,27±3,11	102,11±1,91*
5+8	32,08±7,23*	12,58±0,99*	49,26±2,91	123,84±13,58*
PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	CuZnSOD (U/mg proteina)	GSH (μmol/mg proteina)	Ukupne -SH grupe (mmol/mg proteina)	MDA (μmol/mg proteina)
2+0	49,26±2,72	21,38±1,06	71,43±4	28,09±3,79
2+1,25	40,22±1,5*	19,27±1,87*	57,18±3,15*	90,39±17,18*
2+2,5	42,04±2,9*	19,00±2,2*	50,66±3,74*	90,17±1,92*
2+5	40,23±5,42*	16,56±2,84*	53,92±3,27*	106,82±6,31*
4+0	48,61±1,85	17,85±0,52	66,02±3,15	34,13±3,34
4+1,25	44,59±2,20*	15,83±3,17*	51,35±7,61*	89,95±4,76*
4+2,5	44,77±2,48*	13,45±0,91*	49,92±5,7*	95,17±6,02*
4+5	43,9±1,02*	13,04±1,03*	52,27±3,11*	102,11±1,91*
8+0	46,09±5,98	17,46±2,5	64,61±2,73	38,82±15,1
8+1,25	41,59±1,26*	15,45±0,86*	50,54±3,04*	98,43±10,26*
8+2,5	42,06±4,49*	13,64±1,98*	48,31±5,3*	115,5±27,06*
8+5	32,08±7,23*	12,58±0,99*	49,26±2,91*	123,84±13,58*

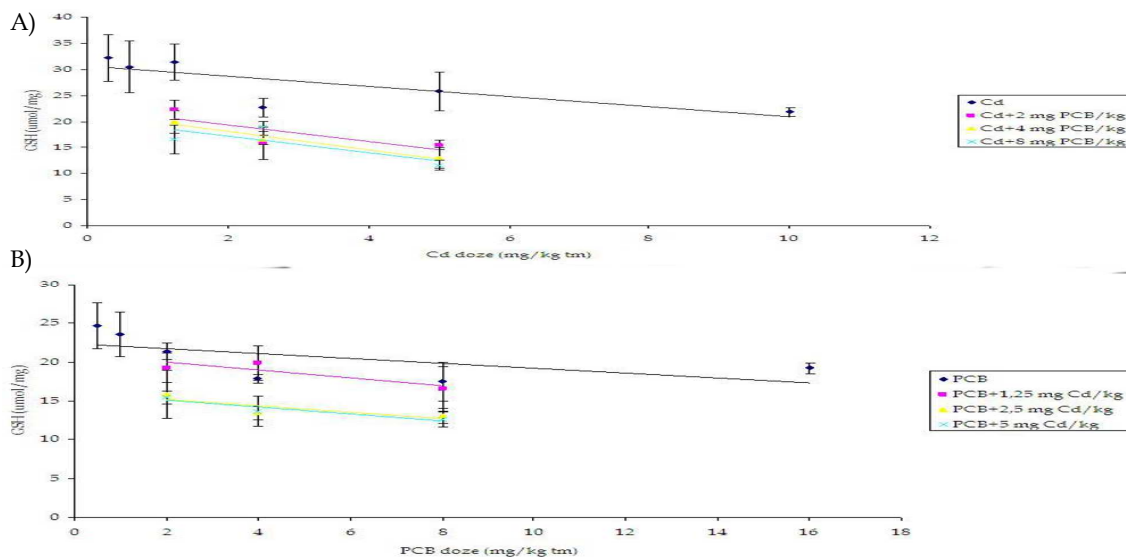
Koncentracije MDA, GSH, ukupnih -SH grupa i aktivnost enzima CuZnSOD predstavljene su kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

Iako su koncentracije MDA pri primeni smeša statistički značajno više u odnosu na nivoe MDA u grupama pacova tretiranih pojedinačnim supstancama, poređenjem nagiba krivih dozne zavisnosti nisu dokazane statističke značajnosti (0,112 odnosno 0,057) pa se može zaključiti da između Cd i PCB nema interakcija već da ispoljavaju aditivan efekat na ispitivani parametar (Slika 33).



Slika 33. Doza-odgovor krive dobijene za koncentracije MDA u homogenatima jetre pacova tretiranih tokom 28 dana sa šest različitih doza Cd (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5;10 mg Cd/kg t.m/dan) ili smešama Cd (1,25; 2,5; 5 mg/kg t.m/dan) i PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) (A) i doza-odgovor krive dobijene za nivo MDA u pacova tretiranih sa šest različitih doza PCB (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg PCB/kg t.m/dan) ili smešama PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) i Cd (1,25;2,5 i 5 mg/kg t.m/dan) (B). Statistički značajna razlika između nagiba kriva označena je sa \*( $P < 0,05$ ), †( $P < 0,01$ ).

Isto tako utvrđeno je i odsustvo interakcija, odnosno aditivan efekat Cd i PCB na sadržaj GSH u jetri pacova (Slika 34).



Slika 34. Doza-odgovor krive dobijene za koncentracije GSH u homogenatima jetre pacova tretiranih tokom 28 dana sa šest različitih doza Cd (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5;10 mg Cd/kg t.m/dan) ili smešama Cd (1,25; 2,5; 5 mg/kg t.m/dan) i PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) (A) i doza-odgovor krive dobijene za nivo GSH u pacova tretiranih sa šest različitih doza PCB (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg PCB/kg t.m/dan) ili smešama PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) i Cd (1,25; 2,5 i 5 mg/kg t.m/dan) (B). Statistički značajna razlika između nagiba kriva označena je sa \*( $P < 0,05$ ), †( $P < 0,01$ ).

#### 4.3.5. Efekti na bubrege

##### 4.3.5.1. Efekti na relativnu masu organa

Istovremena primena najviše doze Cd korišćene u smešama (5 mg/kg t.m/dan) sa primenjenim dozama PCB dovela je do statistički značajnog povećanja relativne mase bubrega u odnosu na mase bubrega kada je primenjen samo PCB kao i u odnosu pojedinačnu primenu Cd u toj dozi (Tabela 37).

Tabela 37. Efekat smeša različitih doza Cd i PCB na relativne mase bubrega *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti.

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa bubrega	PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa bubrega
1,25+0	0,633±0,046	2+0	0,660±0,049
1,25+2	0,660±0,088	2+1,25	0,660±0,088
1,25+4	0,621±0,043	2+2,5	0,669±0,046
1,25+8	0,665±0,050	2+5	0,692±0,029*
2,5+0	0,683±0,067	4+0	0,644±0,136
2,5+2	0,669±0,046	4+1,25	0,621±0,043
2,5+4	0,666±0,040	4+2,5	0,666±0,040
2,5+8	0,666±0,051	4+5	0,716±0,051*
5+0	0,644±0,064	8+0	0,696±0,134
5+2	0,692±0,029*	8+1,25	0,665±0,050
5+4	0,716±0,051*	8+2,5	0,666±0,051
5+8	0,711±0,106*	8+5	0,711±0,106*

Vrednosti su predstavljene su kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ).

##### 4.3.5.2. Efekti na parametre funkcije bubrega

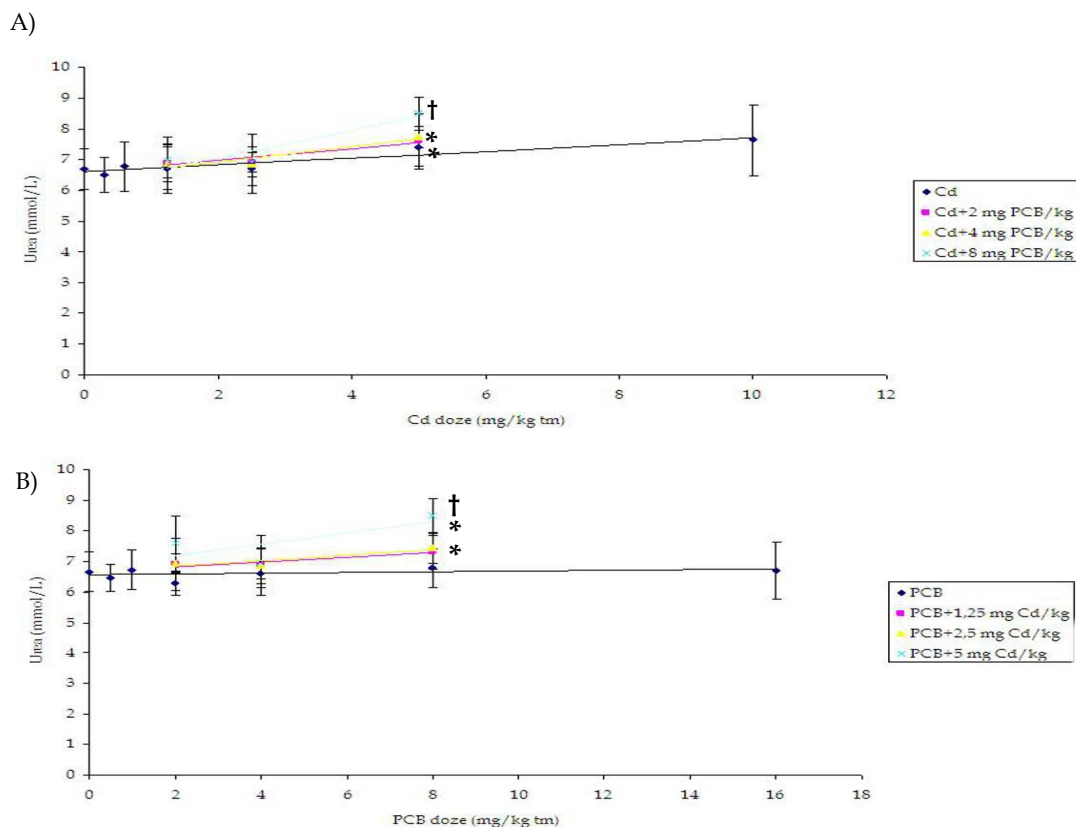
Primena najviše doze Cd u kombinaciji sa ostalim dozama PCB korišćenim u doznom režimu smeša dovela je do skoka kreatinina u serumu u odnosu na nivoe kreatinina grupa tretiranih pojedinačnim supstancama, dok su nivoi uree u serumu pacova tretiranih smešama bili statistički značajno viši u svim doznim opsezima smeše, u odnosu na nivoe uree u grupama pacova tretiranih pojedinačnim supstancama (Tabela 38).

Tabela 38. Efekat smeša različitih doza Cd i PCB na nivoe uree i kreatinina u serumu *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti.

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Urea (mmol/L)	Kreatinin (μmol/L)	PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Urea (mmol/L)	Kreatinin (μmol/L)
1,25+0	6,5±0,79	45,57±3,82	2+0	6,27±0,38	46,83±1,72
1,25+2	6,90±0,55*	46,71±3,04	2+1,25	6,90±0,55*	46,71±3,04
1,25+4	6,93±0,32*	48,57±3,91	2+2,5	6,86±0,57*	45,71±3,04
1,25+8	7,60±0,9*	47,57±2,70	2+5	7,31±0,56*	50,14±3,76*
2,5+0	6,5±0,54	46,28±2,87	4+0	6,58±0,43	50±2,37
2,5+2	6,86±0,57*	45,71±3,04	4+1,25	6,93±0,32*	48,57±3,91
2,5+4	7,01±0,91*	45,86±3,08	4+2,5	7,01±0,91*	45,86±3,08
2,5+8	7,93±0,49*	45,71±4,41	4+5	7,44±0,49*	54,71±3,35*
5+0	7,08±0,59	45±3,36	8+0	6,78±0,64	47±4,28
5+2	7,31±0,56*	50,14±3,76*	8+1,25	7,60±0,9*	47,57±2,70
5+4	7,44±0,49*	54,71±3,35*	8+2,5	7,93±0,49*	45,71±4,41
5+8	8,50±0,54*	55,29±3,30*	8+5	8,50±0,54*	55,29±3,30*

Koncentracije uree i kreatinina predstavljene su kao  $\bar{X}_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test; P<0,05).

Kako je nivo uree u serumu pokazao doznu zavisnost i od Cd i od PCB bilo je moguće proceniti eventualno prisustvo interakcija između ove dve supstance na serumske nivoe uree. Poređenje nagiba krivih dozne zavisnosti dobijenih za pojedinačne supstance i krivih dobijenih za smeše pokazalo je da ove dve supstance deluju sinergistički na povećanje nivoa uree u svim dozama primenjenim u smeši (Slika 35). Može se pretpostaviti i uticaj doznog režima primenjenog u smešama na sinergističke interakcije između Cd i PCB na ovom parametru, s obzirom na najniže p vrednosti (<0,01) dobijene pri poređenju sa krivim doza-odgovor smeša koje sadrže jednu od primenjenih supstanci u najvišoj dozi.



Slika 35. Doza-odgovor krive dobijene za koncentracije uree u serumu pacova tretiranih tokom 28 dana sa šest različitih doza Cd (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5;10 mg Cd/kg t.m/dan) ili smešama Cd (1,25; 2,5; 5 mg/kg t.m/dan) i PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) (A) i doza-odgovor krive dobijene za nivo uree u pacova tretiranih sa šest različitih doza PCB (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg PCB/kg t.m/dan) ili smešama PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) i Cd (1,25; 2,5 i 5 mg/kg t.m/dan) (B). Statistički značajna razlika između nagiba kriva označena je sa \*( $P < 0,05$ ), †( $P < 0,01$ ).

#### 4.3.5.3. Efekti na koncentraciju bioelemenata

Tabela 39 prikazuje efekat smeše na nivoe ispitivanih bioelemenata (Mn, Fe, Cu, Zn i Se) u bubrezima pacova. Primetno je da je istovremena primena ovih dveju hemikalija dovela do promena u nivoima Cu i to pri korišćenju smeše koja je sadržala najvišu dozu Cd, dok je efekat smeše na ostale ispitivane bioelemente izostao.

Tabela 39. Efekat smeša različitih doza Cd i PCB na nivoe Mn, Fe, Cu, Zn i Se u bubrezima Wistar pacova nakon 28 dana izloženosti.

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Mn (mg/kg bubrega)	Fe (mg/kg bubrega)	Cu (mg/kg bubrega)	Zn (mg/kg bubrega)	Se (mg/kg bubrega)
1,25+0	1,19±0,02	47,10±3,91	7,15±0,98	26,76±2,06	1,28±0,04
1,25+2	1,24±0,09	43,18±2,21	7,05±0,25	25,89±2,34	1,21±0,11
1,25+4	1,26±0,12	42,61±4,09	7,30±0,26	25,99±0,85	1,22±0,13

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Mn (mg/kg bubrega)	Fe (mg/kg bubrega)	Cu (mg/kg bubrega)	Zn (mg/kg bubrega)	Se (mg/kg bubrega)
1,25+8	1,25±0,16	40,25±1,40	7,23±0,39	26,56±1,46	1,20±0,12
2,5+0	1,27± 0,09	46,85± 6,06	7,56±0,97	26,06±1,82	1,27±0,05
2,5+2	1,10±0,37	40,01±7,08	7,71±0,67	25,39±6,08	1,00±0,36
2,5+4	1,27±0,12	43,63±4,17	7,76±0,46	25,85±4,01	1,21±0,03
2,5+8	1,27±0,10	40,79±6,61	7,65±0,24	27,00±1,02	1,24±0,04
5+0	1,07±0,08	44,67±2,63	7,22±0,6	26,95±4,24	1,21±0,08
5+2	1,20±0,11	40,37±0,87	8,72±0,09*	26,37±2,38	1,28±0,08
5+4	1,21±0,13	45,48±0,97	8,72±0,40*	27,21±1,70	1,25±0,04
5+8	1,20±0,10	51,84±0,91*	8,82±0,76*	26,99±0,94	1,29±0,10
PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Mn (mg/kg bubrega)	Fe (mg/kg bubrega)	Cu (mg/kg bubrega)	Zn (mg/kg bubrega)	Se (mg/kg bubrega)
2+0	1,23±0,12	39,10± 2,10	7,00±0,99	27,00±1,03	1,22± 0,10
2+1,25	1,24±0,09	43,18±2,21	7,05±0,25	25,89±2,34	1,21±0,11
2+2,5	1,10±0,37	40,01±7,08	7,71±0,67	25,39±6,08	1,00±0,36
2+5	1,20±0,11	40,37±0,87	8,72±0,09*	26,37±2,38	1,28±0,08
4+0	1,22±0,19	40± 1,03	7,16±1,07	27,93± 0,72	1,21±0,06
4+1,25	1,26±0,12	42,61±4,09	7,30±0,26	25,99±0,85	1,22±0,13
4+2,5	1,27±0,12	43,63±4,17	7,76±0,46	25,85±4,01	1,21±0,03
4+5	1,21±0,13	45,48±0,97	8,72±0,40*	27,21±1,70	1,25±0,04
8+0	1,21± 0,11	40,7± 1,11	7,02± 0,55	28,22±1,14	1,21±0,05
8+1,25	1,25±0,16	40,25±1,40	7,23±0,39	26,56±1,46	1,20±0,12
8+2,5	1,27±0,10	40,79±6,61	7,65±0,24	27,00±1,02	1,24±0,04
8+5	1,20±0,10	51,84±0,91*	8,82±0,76*	26,99±0,94	1,29±0,10

Vrednosti koncentracije bioelemenata predstavljene su kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7) i date u mg/kg bubrega. Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ). Doze Cd i PCB date su u mg/kg t.m/dan.

#### 4.3.5.4. Efekti na parametre oksidativnog stresa

Tabela 40 daje prikaz izmerenih parametara oksidativnog stresa u bubregu pacova tretiranih smešama Cd i PCB. Uočava se značajno sniženje nivoa GSH u grupama tretiranim smešama kada se kao kontrole koriste grupe pacova tretirane samo PCB, dok je u odnosu na Cd samo primena smeša koja je sadržala najviše doze Cd dovela do značajnog pada sadržaja GSH. Svi dozni opsezi smeša doveli su do statistički značajnog sniženja aktivnosti CuZnSOD i statistički značajnog povećanja nivoa MDA. Ukupne -SH grupe značajno su se

smanjile pre svega u grupama tretiranim smešama visokih doza Cd odnosno PCB.

Tabela 40. Efekat smeše različitih doza Cd i PCB na aktivnost enzima CuZnSOD i nivoe GSH, ukupnih -SH grupa i MDA, u homogenatima bubrega *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti.

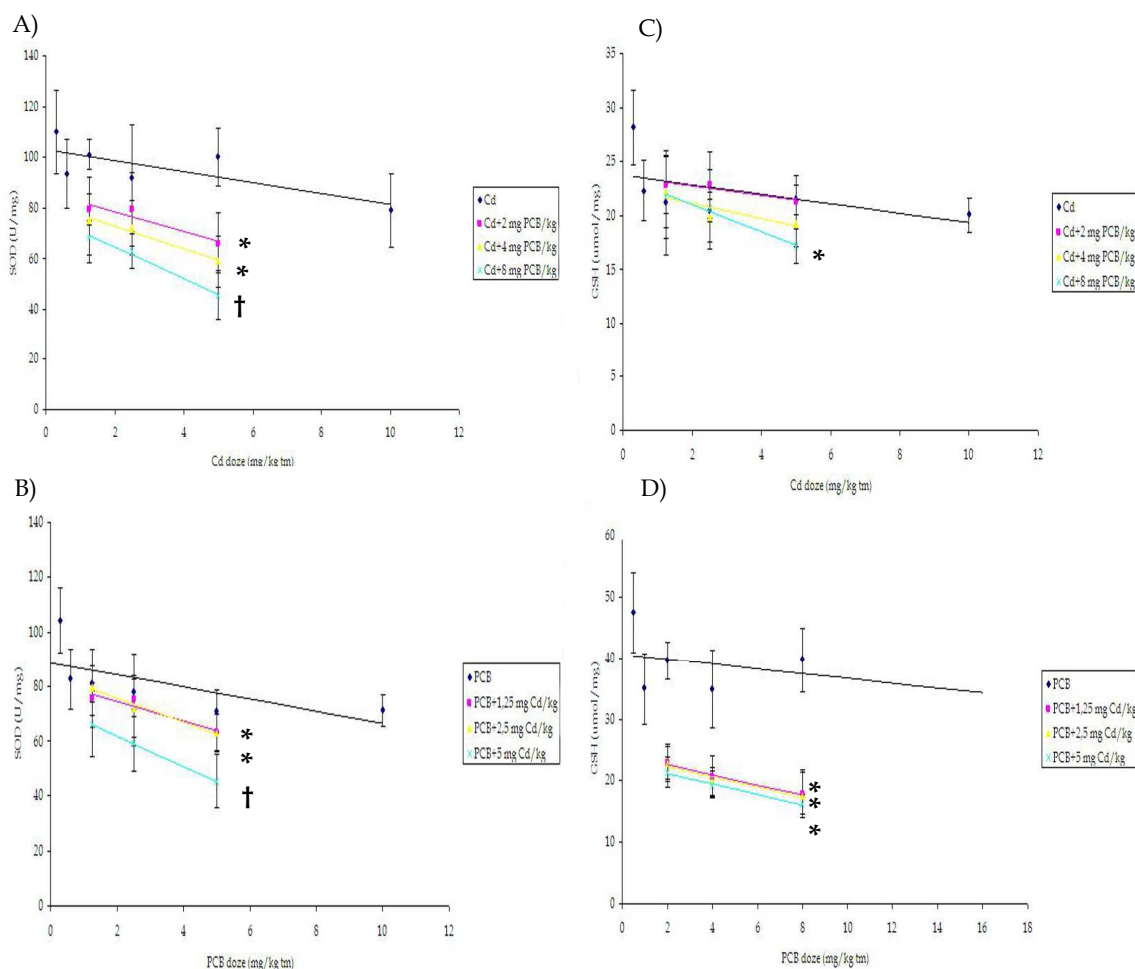
Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	CuZnSOD (U/mg proteina)	GSH ( $\mu$ mol/mg proteina)	Ukupne -SH grupe (mmol/mg proteina)	MDA ( $\mu$ mol/mg proteina)
1,25+0	80,81±6,59	21,22±4,82	18,81±0,85	148,27±19,68
1,25+2	70,63±6,01*	22,84±2,63	16,97±3,66	170,01±34,97*
1,25+4	70,11±17,04*	22,86±3,06	16,64±7,47	188,09±34,15*
1,25+8	63,17±6,98*	21,31±2,46	14,93±1,23*	250±37,09*
2,5+0	77,93±6,04	20,49±1,06	17,45±2,06	151,35±10,19
2,5+2	71,58±14,40*	20,62±3,26	13,02±1,76*	172,48±46,4*
2,5+4	72,16±10,82*	19,86±2,30	14,95±2,26*	200,21±41,2*
2,5+8	63,02±7,06*	19,29±2,14	14,53±1,04*	224,58±7,25*
5+0	70,83±7,81	21,51±1,38	13,18±4,1	186,83±20,96
5+2	66,15±6,00*	17,77±3,87*	12,59±3,7	210,15±26,6*
5+4	58,91±10,2*	17,63±3,66*	11,96±4,5	229,2±24,75*
5+8	45,38±9,62*	16,18±1,6*	10,52±2,44*	307,55±29,82*
PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	CuZnSOD (U/mg proteina)	GSH ( $\mu$ mol/mg proteina)	Ukupne -SH grupe (mmol/mg proteina)	MDA ( $\mu$ mol/mg proteina)
2+0	101,25±5,99	39,55±3,01	15,39±1,13	153,97±14,84
2+1,25	70,63±6,01*	22,84±2,63*	16,97±3,66	170,01±34,97*
2+2,5	71,58±14,40*	20,62±3,26*	13,02±1,76	172,48±46,4*
2+5	66,15±6,00*	17,77±3,87*	12,59±3,7*	210,15±26,6*
4+0	91,85±21,02	34,97±6,37	16,83±3,09	158,3±29,34
4+1,25	70,11±17,04*	22,86±3,06*	16,64±7,47	188,09±34,15*
4+2,5	72,16±10,82*	19,86±2,30*	14,95±2,26	200,21±41,2*
4+5	58,91±10,2*	17,63±3,66*	11,96±4,5*	229,2±24,75*
8+0	99,99±11,38	39,73±5,2	16,22±1,31	169,26±23,94
8+1,25	63,17±6,98*	21,31±2,46*	14,93±1,23	250±37,09*
8+2,5	63,02±7,06*	19,29±2,14*	14,53±1,04	224,58±7,25*
8+5	45,38±9,62*	16,18±1,6*	10,52±2,44*	307,55±29,82*

Koncentracije MDA, GSH, ukupnih -SH grupa i aktivnost enzima CuZnSOD predstavljene su kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test; P<0,05).

Dokazan je sinergistički efekat Cd i PCB u svim doznim opsezima na aktivnost enzima CuZnSOD koji je bio najizraženiji pri višim dozama smeše



(Slika 36 A i B). Takođe dokazan je sinergizam u delovanju Cd i PCB na sadržaj GSH ukoliko se poređenje vrši sa efektom PCB, dok je pri poređenju sa efektom Cd sinergizam dokazan samo za kombinaciju koja je sadržala najveću dozu PCB (Slika 36 C i D).



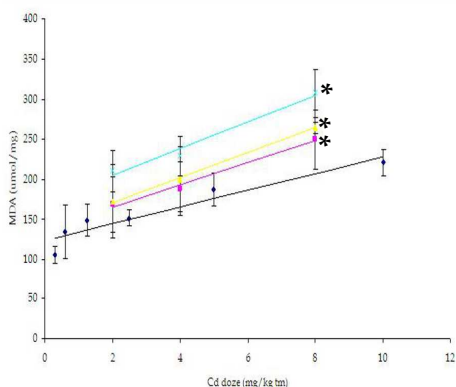
**Slika 36. Doza-odgovor krive dobijene za aktivnost CuZnSOD i koncentraciju GSH u homogenatima bubrega pacova tretiranih tokom 28 dana sa šest različitih doza Cd (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5;10 mg Cd/kg t.m/dan) ili smešama Cd (1,25; 2,5; 5 mg/kg t.m/dan) i PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) (A,C) i doza-odgovor krive dobijene za aktivnost CuZnSOD i koncentraciju GSH u pacova tretiranih sa šest različitih doza PCB (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg PCB/kg t.m/dan) ili smešama PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) i Cd (1,25; 2,5 i 5 mg/kg t.m/dan) (B,D). Statistički značajna razlika između nagiba kriva označena je sa \*(P<0,05), †(P<0,01).**

Posmatrajući efekat smeše Cd i PCB na parametre oksidativnog stresa u bubregu, uočava se sinergistički efekat na MDA pri primeni smeša u svim doznim opsezima (Slika 37A i B). Primena smeša takođe je dovela do značajnog smanjenja ukupnih -SH grupa u odnosu na nivoe izmerene pri primeni pojedinačnih supstanci uz uočeni sinergistički efekat kada se nivoui izmereni u

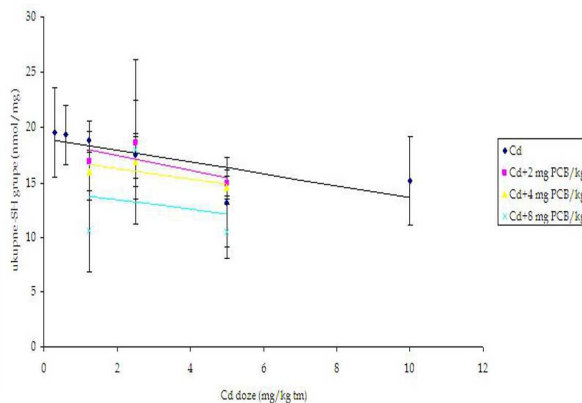


grupama koje su tretirani smešom uporede sa nivoima u grupama tretiranim samo PCB, dok se pri poređenju sa nivoima izmerenim u grupama koje su primale samo Cd uočava aditivan efekat ovih dveju supstanci na ovaj parametar (Slika 37 C i D).

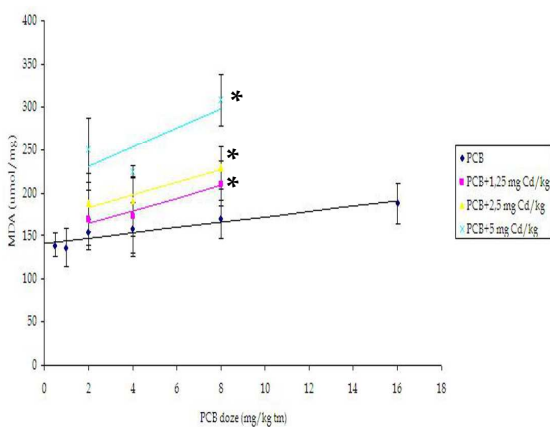
A)



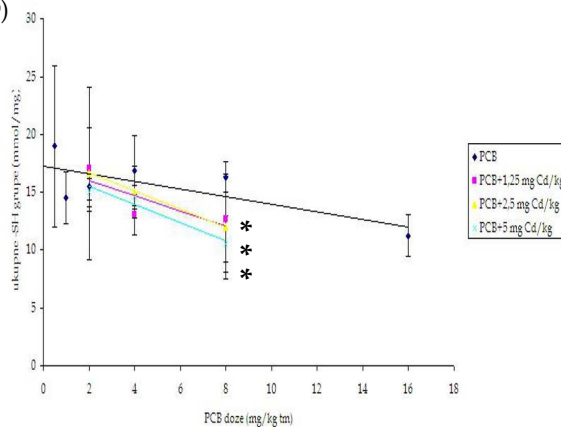
C)



B)



D)



Slika 37. Doza-odgovor krive dobijene za koncentracije MDA i ukupnih -SH grupa u homogenatima bubrega pacova tretiranih tokom 28 dana sa šest različitih doza Cd (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5;10 mg Cd/kg t.m/dan) ili smešama Cd (1,25; 2,5; 5 mg/kg t.m/dan) i PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) (A,C) i doza-odgovor krive dobijene za koncentracije MDA i ukupnih -SH grupa u pacova tretiranih sa šest različitih doza PCB (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg PCB/kg t.m/dan) ili smešama PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) i Cd (1,25; 2,5 i 5 mg/kg t.m/dan) (B,D). Statistički značajna razlika između nagiba kriva označena je sa \*( $P < 0,05$ ), †( $P < 0,01$ ).

#### 4.3.6. Efekti na štitastu žlezdu

##### 4.3.6.1. Efekti na relativnu masu organa

Primena smeše dovela je do statistički značajnog sniženja relativne mase štitaste žlezde u svim grupama koje su primale najviše doze PCB primenjene u doznom režimu smeša, kada se poređenje vrši i sa relativnim masama dobijenim u grupama koje su tretirane odgovarajućim pojedinačnim dozama Cd, kao i dobijenim u grupama koje su tretirane odgovarajućim pojedinačnim dozama PCB (Tabela 41).

Tabela 41. Efekat smeša različitih doza Cd i PCB na relativne mase štitaste žlezde *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti.

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa štitaste žlezde	PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	Relativna masa štitaste žlezde
1,25+0	0,174±0,032	2+0	0,156±0,019
1,25+2	0,173±0,030	2+1,25	0,173±0,030
1,25+4	0,177±0,020	2+2,5	0,154±0,023
1,25+8	0,135±0,096 <sup>†</sup>	2+5	0,160±0,036
2,5+0	0,157±0,029	4+0	0,152±0,016
2,5+2	0,154±0,023	4+1,25	0,177±0,020
2,5+4	0,161±0,032	4+2,5	0,161±0,032
2,5+8	0,121±0,087 <sup>†</sup>	4+5	0,160±0,078
5+0	0,154±0,029	8+0	0,15±0,034
5+2	0,16±0,036	8+1,25	0,135±0,096*
5+4	0,160±0,078	8+2,5	0,121±0,087*
5+8	0,141±0,066*	8+5	0,141±0,066*

Relativne mase štitaste žlezde predstavljene su kao  $X_{sr} \pm SD$  (n=7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test;  $P < 0,05$ ). Doze Cd i PCB date su u mg/kg t.m/dan.

##### 4.3.6.2. Efekti na nivoe hormona štitaste žlezde

U Tabeli 42 prikazane su koncentracije hormona T3 i T4 u serumu pacova tretiranih smešom Cd i PCB primenjenih u različitim doznim kombinacijama. Koncentracije hormona T3 bile su smanjenje u svim grupama u odnosu na kontrolne vrednosti, dok su se koncentracije T4 hormona razlikovale

u odnosu na kontrole u svim grupama osim pri primeni najnižih dozu PCB ili najnižih doza Cd u primenjenim doznim kombinacijama.

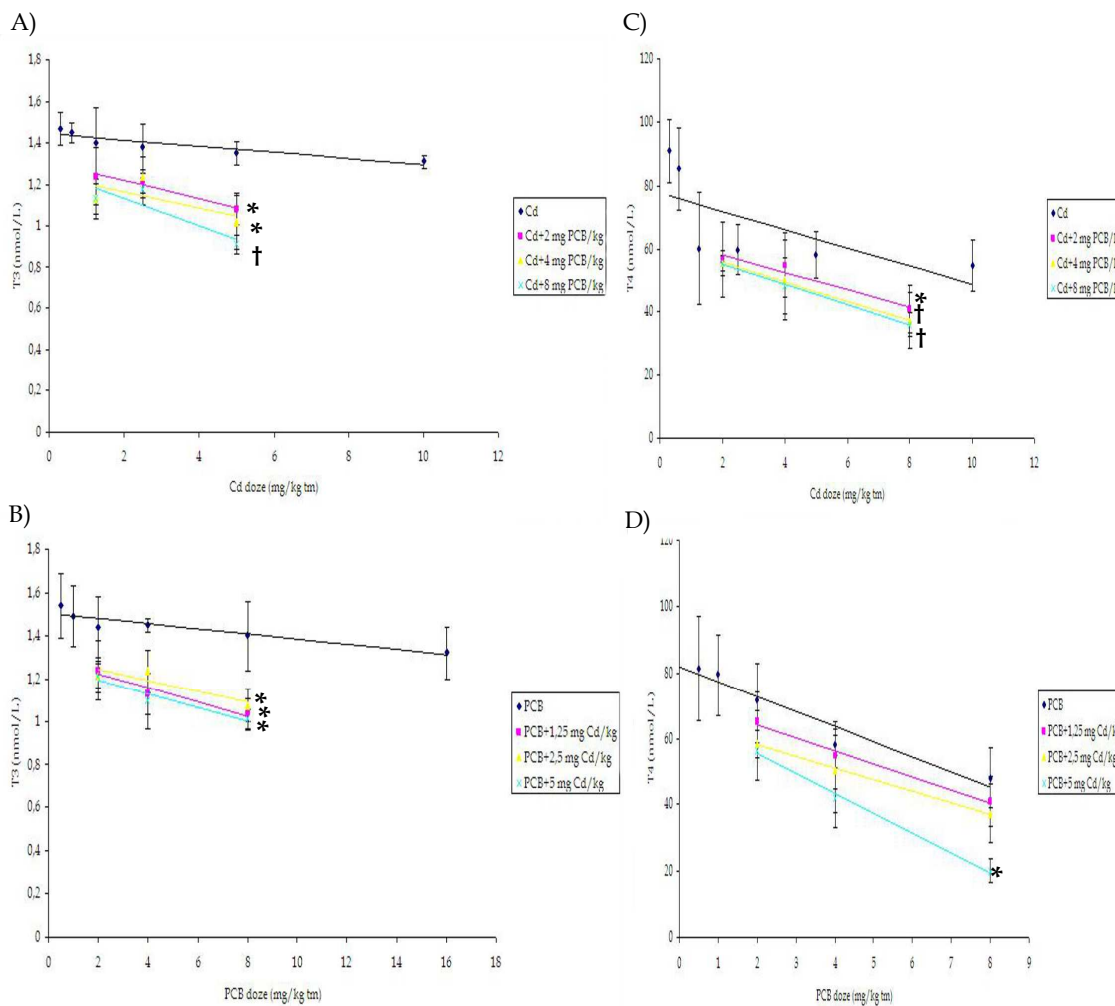
Tabela 42. Efekat smeša različitih doza Cd i PCB na nivoe T3 i T4 hormona u serumu *Wistar* pacova nakon 28 dana izloženosti.

Cd doze+PCB doze (mg/kg t.m/dan)	T3 (nmol/L)	T4 (nmol/L)	PCB doze+Cd doze (mg/kg t.m/dan)	T3 (nmol/L)	T4 (nmol/L)
1,25+0	1,40±0,17	60,08±17,8	2+0	1,44±0,14	71,48±2,79
1,25+2	1,24±0,14*	56,64±12,13	2+1,25	1,24±0,14*	56,64±12,13
1,25+4	1,21±0,06*	54,9±10,22*	2+2,5	1,13±0,10*	55,53±4,24*
1,25+8	1,21±0,07*	41,01±7,51*	2+5	1,03±0,07*	55,42±2,54*
2,5+0	1,38±0,11	59,7±8,03	4+0	1,45±0,03	58,05±2,96
2,5+2	1,13±0,10*	55,53±4,24	4+1,25	1,21±0,06*	54,9±10,22
2,5+4	1,24±0,10*	50,27±12,59*	4+2,5	1,24±0,10*	50,27±12,59*
2,5+8	1,10±0,13*	37,22±8,74*	4+5	1,08±0,08*	48,53±9,01*
5+0	1,35±0,05	58,27±7,51	8+0	1,40±0,16	48,05±9,22
5+2	1,03±0,07*	55,42±2,54	8+1,25	1,21±0,07*	41,01±7,51
5+4	1,08±0,08*	48,53±9,01*	8+2,5	1,10±0,13*	37,22±8,74*
5+8	1,01±0,04*	36,01±3,64*	8+5	1,01±0,04*	36,01±3,64*

Vrednosti T3 i T4 predstavljene su kao srednja vrednost uz SD (n=6-7). Poređenje je vršeno unutar grupa koje su primale istu dozu jedne od supstanci komponenata smeše, pri čemu \* označava statističku značajnost u odnosu na kontrolne grupe koje su predstavljene plavom bojom (ANOVA, LSD test; P<0,05).

Statistički značajna razlika između nagibu krivih doza Cd-nivo T3 hormona uočena je za sve tri primenjene doze PCB u smešama uz najnižu p vrednost (p=0,002) dobijenu za krivu odnosa doza Cd-nivo T3 dobijenu za najvišu dozu PCB korišćenu u smešama (Slika 38A). Slično, nagibi krivih dozne zavisnosti koje su dobijene za smeše bile su različite u odnosu na nagib krive dozne zavisnosti T3 od PCB (Slika 38B). Kako je nagib krivih dobijenih za smeše bio izraženiji nego nagibi krivih dobijenih za pojedinačne supstance može se zaključiti da ove supstance deluju sinergistički na smanjenje koncentracija T3 hormona u serumu. Slike 38 C i D pokazuju zajednički efekat Cd i PCB na nivoe T4 hormona. Statistička analiza razlika u nagibima krivih doza-odgovor dobijenih za Cd i za smeše Cd i PCB pokazala je p<0,05 za sve tri primenjene doze PCB uz najnižu p vrednost (p=0,0002) dobijenu pri najvišoj PCB dozi. Ako se uporede nagibi krivih doza-odgovor dobijene za smeše sa krivom doza-

odgovor dobijenih za PCB, statistički značajna razlika uočava se samo u prisustvu najviše doze Cd korišćene u doznom režimu smeša (5 mg/kg t.m/dan) što ukazuje na doznu zavisnost uočenog sinergističkog efekta smeše Cd i PCB na nivoe T4 hormona u serumu.



**Slika 38.** Doza-odgovor krive dobijene za koncentracije T3 i T4 u serumu pacova tretiranih tokom 28 dana sa šest različitih doza Cd (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5;10 mg Cd/kg t.m/dan) ili smešama Cd (1,25; 2,5; 5 mg/kg t.m/dan) i PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) (A,C) i doza-odgovor krive dobijene za koncentracije T3 i T4 u serumu u pacova tretiranih sa šest različitih doza PCB (0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg PCB/kg t.m/dan) ili smešama PCB (2; 4; 8 mg/kg t.m/dan) i Cd (1,25; 2,5 i 5 mg/kg t.m/dan) (B,D). Statistički značajna razlika između nagiba kriva označena je sa \*( $P<0,05$ ), †( $P<0,01$ ).

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. TOKSIČNI EFEKTI KADMIJUMA

#### 5.1.1. Efekti na prirast telesne mase

Utvrđeno je da pod navedenim eksperimentalnim uslovima Cd dovodi do smanjenja prirasta t.m. pacova, pri čemu je najviša doza Cd primenjena tokom 28 dana dovela do smanjenja prirasta t.m. od 57,2% u odnosu na kontrolnu, netretiranu grupu.

Smanjenje prirasta t.m. uočeno je i u drugim eksperimentima. U studiji u kojoj su pacovi bili izlagani dozi od 11,6 mg Cd/kg t.m/dan došlo je do smanjenja prirasta t.m. za 47-58% nakon 14 nedelja izloženosti (Pleasant i sar, 1993). Međutim u eksperimentu u kome su mužjaci pacova izlagani Cd putem vode za piće koja je sadržala 50 mg Cd/L (što odgovara doznom opsegu 3,17-4,28 mg Cd/kg t.m/dan) tokom 12 nedelja nije zabeležena značajna promena prirasta t.m. (Brzoska i sar, 2003), iako je period izloženosti bio trostruko duži, a opseg primenjenih doza gotovo trostruko viši od najniže doze koja je u našem eksperimentu dovela do statistički značajnog sniženja prirasta t.m. (1,25 mg Cd/kg t.m/dan). Različiti podaci o uticaju Cd na prirast t.m. može se objasniti različitom dužinom izloženosti, kao i različitim sojevima pacova korišćenim u ovim eksperimentima.

Poređenjem sa NOAEL i LOAEL vrednostima procenjenim za efekat Cd na smanjenje prirasta t.m. koje su dostupne u literaturi (ATSDR, 2012) uočava se da je NOAEL vrednost procenjena u ovoj studiji (0,6 mg Cd/kg t.m/dan), a posebno izračunata CEDL<sub>5</sub> vrednost (0,06 mg Cd/kg t.m/dan) niska, s obzirom na to da je najniža procenjena NOAEL vrednost za ovaj efekat na pacovima Sprague-Dawley soja iznosila 0,25 mg Cd/kg t.m/dan nakon 6 nedelja izloženosti (Muller i sar, 1988).

### 5.1.2. Efekti na hematološke parametre

Krv se može smatrati tkivom koje reflektuje promene u metaboličkim procesima, pa abnormalnosti parametara krvi predstavljaju pouzdan indikator toksičnih efekata hemikalija. Kao što je već objašnjeno, Cd se nakon oralnog unosa prenosi putem krvi do mekih tkiva te svoje toksične efekte može ispoljiti i u krvi. Kako je u našoj studiji potvrđena jaka korelacija između primenjenih doza Cd i koncentracije Cd u krvi bilo je moguće razmatrati uticaj različitih doza Cd na hematološke parametre, mada se pojedini efekti Cd na ove hematološke parametre mogu, osim direktnim efektima na krv, tumačiti i njegovim efektima na druge organe, pre svega bubrege i slezinu.

Smatra se da postoji nekoliko mehanizama kojima Cd dovodi do smanjenja broja Er, i to: hemoliza Er usled razvoja oksidativnog stresa i destrukcije membrane Er, smanjenje koncentracija Fe u krvi usled interferiranja Cd sa intestinalnom apsorpcijom Fe, te smanjene produkcije eritropoetina, usled renalne toksičnosti Cd. Parenteralna primena 2 mg Cd/kg t.m. tokom mesec dana dovela je do smanjenja broja Er i Hb i to kao posledica nedovoljne produkcije eritropoetina i nastanka renalne anemije, dok je anemija uočena nakon tri meseca intoksikacije bila posledica sva tri mehanizma (Horiguchi i sar, 2011). Primena 5 mg CdCl<sub>2</sub>/kg t.m. oralno svaki drugi dan tokom 30 dana, dovela je do smanjenja broja Er i sadržaja Hb u tretiranih pacova (El-Demerdash i sar, 2004). Međutim, u studiji sprovedenoj na pacovima, doze od 0,25 mg/kg t.m. i 2,5 mg/kg t.m. oralno primenjivane tokom 28 dana nisu dovele do statistički značajnih promena broja Er, niti sadržaja Hb (Hounkpatin i sar, 2013). Slično tome, u našoj studiji nije uočeno smanjenje broja Er, kao ni statistički značajno smanjenje sadržaja Hb. Ipak, utvrđena je dozna zavisnost za uticaj Cd na sadržaj Hb, kao i statistički značajno smanjenje koncentracije Fe u krvi već u dozama  $\geq 0,6$  mg/kg t.m./dan. Takođe, pod uticajem najviše doze Cd došlo je i do statistički značajnog smanjenja broja Tr, a potvrđena je i dozna zavisnost ovog parametra. Smanjenje broja Tr može se tumačiti efektom Cd koji

je uočen na slezini tretiranih pacova. Naime, u ovoj studiji je pokazano da najviša doza Cd dovodi do značajnog uvećanja relativne mase slezine, a kako se oko 1/3 proizvedenih Tr nalazi u slezini, može se pretpostaviti da je usled povećanja slezine došlo i do intenzivnijeg deponovanja Tr u slezini što je za posledicu imalo smanjenje broja Tr u krvi.

Imunomodulatorni efekti Cd jasno su pokazani u *in vitro* studijama. Tako je Cd izazvao otpuštanje visokih količina IL-4 i nešto manjih količina IL-2 u kulturi splenocita, interleukina koji dovode do stimulacije i diferencijacije rasta T-limfocita (Krocova i sar, 2000). U eksperimentalnoj studiji na pacovima, oralni tretman sa 5 mg CdCl<sub>2</sub>/kg t.m. svakog drugog dan tokom 30 dana, doveo je do povećanja broja Leu (El-Demerdash i sar., 2004). U istraživanju u čijem su prvom delu pacovi tretirani intraperitonealno sa 1 mg Cd/kg t.m. i nakon 48 h žrtvovani, a u drugom delu tokom 30 dana tretirani Cd putem vode za piće i to u koncentracijama 5 i 50 ppm, pokazano je da akutno, Cd izaziva povišenje broja perifernih Leu dok subakutna primena 5 i 50 ppm Cd tokom 30 dana ne dovodi do promene u ukupnom broju Leu. Ipak, oralna subakutna primena Cd u navedenoj studiji uticala je na izvesne aktivnosti u slezini koje su od značaja za njenu ulogu u razvoju imunološkog odgovora čime je pokazano da se imunomodulatorni efekat Cd može delom tumačiti toksičnim efektom koji Cd ispoljava na slezinu (Demenesku i sar, 2014). I u našoj studiji, potvrđen je imunomodulatorni efekat Cd, jer je svih šest doza primenjenih u ovoj studiji dovelo do porasta broja Leu. Porast broja Leu može se objasniti aktivacijom imunološkog odgovora pod uticajem Cd, posebno aktivacijom Kupferovih ćelija koje potom stvaraju različite medijatore inflamacije koje doprinose nastanku Leu (Yamano i sar, 2000), kao i već pomenutim efektima Cd na slezinu. Najniža vrednost CEDL<sub>5</sub> (0,97 mg Cd/kg t.m./dan) izračunata upravo za efekat Cd na broj Leu ukazuje da se ovaj efekat može smatrati i kritičnim efektom Cd na hematološke parametre. Svakako da efekti Cd na imunološki sistem uočeni u ovoj i drugim studijama mogu implicirati eventualno učešće Cd u razvoju autoimunih bolesti.

Poređenjem NOAEL i LOAEL vrednosti dostupnih u literaturi (ATSDR, 2012), a procenjenih za efekat Cd na hematološke i imunološke parametre uočava se da su procenjenije vrednosti više od vrednosti dobijenih u ovoj studiji. Najniža procenjena NOAEL vrednosti iznosila je 3 mg/kg t.m/dan u studiji koja je trajala 3 meseca. Najniža vrednost za LOAEL utvrđena je za efekat sniženja hematokrita i Hb u studiji koja je trajala 4 nedelje i iznosila je 0,8 mg/kg t.m/dan, što je više od procenjene NOAEL vrednosti (<0,3 mg/kg t.m/dan) i izračunate CEDL<sub>05</sub> (0,97 mg/kg t.m/dan) u ovoj studiji za efekat Cd na povećanje broja Leu.

### 5.1.3. Efekti na jetru

Kao najvažniji organ metabolizma i detoksikacije, kao i potvrđeni kritični organ toksičnosti Cd, jetra zauzima značajno mesto u svim ispitivanjima koja za cilj imaju utvrđivanje toksičnih efekata i mehanizama toksičnosti Cd. U ovoj studiji praćena je distribucija Cd u jetri, nivoi albumina u serumu, aktivnost enzima jetre u serumu, te parametri oksidativnog stresa, kao i nivoi bioelemenata u jetri sa ciljem utvrđivanja toksičnih efekata koje Cd ispoljava u jetri, kao i mehanizama toksičnosti kojima Cd te efekte ispoljava.

Posmatrajući distribuciju Cd u jetri može se zaključiti da visoke doze Cd prate visoki nivoi Cd u jetri što odgovara činjenici da je jetra jedan od organa akumulacije Cd. Takođe, zahvaljujući uspostavljenom odnosu između eksterne i interne doze u jetri bilo je moguće ispitati i doznu zavisnost posmatranih parametara funkcije jetre, kao i parametara oksidativnog statusa u jetri.

Primena šest različitih doza Cd dovela je do statistički značajnog smanjenja nivoa albumina što može ukazivati na smanjenu sintetsku funkciju jetre. Isto tako sve doze Cd dovele su do statistički značajnog povećanja relativne mase jetre pa se može pretpostaviti da je došlo do izvesnih oštećenja hepatocita i nastanka hepatomegalije, iako nije potvrđena dozna zavisnost ovog efekta. Međutim, nije uočeno statistički značajno uvećanje aktivnosti enzima



funkcije jetre (AST, ALT i ALP), čak ni pod uticajem najviše doze Cd, mada je utvrđeno dozno zavisno povećanje nivoa AST, pri čemu su izračunate donje granice pouzdanosti za 10% i 5% efekta bile relativno niske (1,01 odnosno 0,87 mg/kg t.m/dan). Literaturni podaci (ATSDR, 2012) pokazuju kontradiktorne podatke dobijene u studijama sprovedenim na životinjama, kada su u pitanju efekti Cd na jetru tokom produžene izloženosti. U studiji u kojoj su pacovi bili svakodnevno izloženi dozi od 14 mg Cd/kg t.m/dan oralno tokom 6 nedelja, kao i u studiji u kojoj su pacovi tretirani dozom od 8 mg Cd/kg t.m/dan tokom 24 nedelje nisu uočeni efekti na jetri. Sa druge strane, u dvema novijim studijama u kojima su pacovi unosili Cd svakodnevno putem vode, 18 mg Cd/kg t.m/dan tokom 8 nedelja odnosno 5 mg Cd/kg t.m/dan tokom 4 nedelje došlo je do povećanja serumskih i nivoa triglicerida i holesterola u jetri (Larregle i sar, 2008), odnosno povećanja nivoa enzima funkcije jetre u serumu (Renugadevi i Milton Prabu, 2010). Iako su podaci o efektima subakutne intoksikacije Cd na aktivnost enzima jetre dobijeni u pomenutim studijama kontradiktorni, akutne studije jasno upućuju na sposobnost Cd da izazove oštećenja jetre. Najranije morfološke promene koje se uočavaju u jetri pacova nakon akutne hepatotoksične doze Cd podrazumevaju dilataciju granuliranog endoplazmatičnog retikuluma uz gubitak ribozoma, kondenzaciju jezgra, da bi potom došlo do oticanja mitohondrija, a 10-12 sati nakon ekpozicije dolazi do hepatocelularne nekroze (Rikans i Yamano, 2000). Kako šest različitih primenjenih doza nije dovelo do statistički značajnog povišenja enzima jetre u krvi može se zaključiti da u ovoj studiji ipak nije došlo do izraženijeg oštećenja hepatocita u smislu njihove nekroze koja bi dovela do povećanja serumskih nivoa ovih enzime. Jedno od mogućih objašnjenja za izostanak efekta Cd na enzime jetre može biti i relativno niski izmereni nivoi Cd u jetri. Naime, najviši izmereni nivoi Cd u ovoj studiji bili su oko 16 µg/g jetre, što su značajno niži nivoi u odnosu na nivoe od 100 µg/g jetre koji su izmereni u studiji u kojoj su pacovi oralno tretirani Cd tokom 4 nedelje i u kojoj takođe nisu uočene značajne promene u nivoima AST i ALT u serumu (Oishi i sar, 2000). Međutim, dobijeno

smanjenje nivoa albumina, povećanje relativne mase jetre, kao i uspostavljena dozna zavisnost za nivoe AST u serumu govore da je u ovoj studiji ipak došlo do izvesnih oštećenja jetre pod uticajem subakutne oralne izloženosti Cd.

Bez obzira na brojne studije u kojima je ispitivana hepatotoksičnost Cd još uvek nisu u potpunosti utvrđeni tačni mehanizmi kojim Cd dovodi do oštećenja u jetri. Neki od predloženih mehanizama hepatotoksičnosti ispitani su i u ovoj studiji.

Uloga GSH u hepatotoksičnosti Cd predmet je brojnih eksperimentalnih studija. U pacova koji su prethodno tretirani foronom kako bi im se iscrpele zalihe GSH odnosno cisteinom kako bi se izazvalo povećanje nivoa GSH razvila su se pod uticajem Cd intenzivnija odnosno manje izražena oštećenja jetre što je potvrđeno i histopatološkim nalazima i nalazima enzima jetre u serumu (Dudley i Klaassen, 1984). Uticaj Cd na GSH objašnjava se direktnim vezivanjem Cd za GSH, zatim trošenjem GSH pod uticajem ROS koji nastaju u uslovima intoksikacije Cd, te uticajem Cd na enzime koji učestvuju u biosintezi i regeneraciji GSH. Smanjenje nivoa GSH u jetri koji predstavlja jedan od najznačajnijih endogenih antioksidanasa i supstrata u reakcijama konjugacije, svakako značajno doprinosi nastanku različitih oštećenja hepatocita, što je potvrđeno u brojnim eksperimentalnim studijama. Jednokratna intraperitonealna izloženost dozi od 2,5 mg/kg t.m, kao i 1,5 mg Cd/kg t.m. izazvala je smanjenje nivoa GSH u jetri pacova (Casalino i sar, 2002; Matović i sar, 2012), a u studiji na miševima oralna doza od 20 mg Cd/kg t.m. izazvala je smanjenje sadržaja GSH čak i nakon svega 6h (Djukić-Ćosić i sar, 2007). Slični rezultati dobijeni su i u studijama produžene izloženosti, pa je u eksperimentu u kome su pacovi tretirani tokom 5 nedelja vodom koja je sadržala 200 mg Cd/L dokazana negativna korelacija između nivoa Cd i GSH u jetri (Jihen i sar, 2011). Rezultati ovih studija nesumnjivo potvrđuju uticaj visokih akutnih i subakutnih doza Cd na nivoe GSH u jetri, dok je naša studija ukazala i na uticaj niskih doza Cd na nivoe GSH. Naime, u našoj studiji je uočeno dozno zavisno i statistički značajno smanjenje nivoa GSH u jetri čak i pri najnižoj dozi Cd. Niske

izračunate donje granice pouzdanosti 0,104 mg Cd/kg t.m/dan za 10% odnosno 0,025 mg Cd/kg t.m/dan za 5% efekta ukazuju da se uticaj Cd na nivoe GSH u jetri može smatrati jednim od kritičnih efekata hepatotoksičnosti Cd pri subakutnoj izloženosti.

Međutim, studije u kojima je pokazana hepatotoksičnost Cd, a da pri tome nisu uočene promene u sadržaju GSH postoje (Rikans i Yamano, 2000) i ukazuju da trošenje rezervi GSH, iako značajan, nije i jedini mehanizam hepatotoksičnosti Cd. Osim efekta na GSH, Cd ispoljava svoj efekat i na enzime antioksidativne zaštite (SOD, CAT, GSH-Px) kao i na nivoe Fe u jetri dovodeći do razvoja oksidativnog stresa koji utiče na brojne biološke događaje uključujući sintezu DNK, regulaciju ćelijskog ciklusa, aktivaciju transkripcionih faktora, poremećaja permeabilnosti mitohondrija što sve rezultira nastankom apoptoze i nekroze hepatocita (Wang et al., 2014).

U ovoj studiji takođe je praćen uticaj Cd na aktivnost jednog od enzima antioksidativne zaštite-citosolnu formu SOD-CuZnSOD. Iako rezultati drugih studija ukazuju na smanjenje aktivnosti ukupne SOD u jetri kako nakon akutne primene Cd (Yalin i sar, 2006), tako i nakon produžene izloženosti tokom 22 dana (El-Sokkary i sar, 2010), u ovoj studiji nije uočena promena aktivnosti CuZnSOD u jetri, kao ni zavisnost ovog parametra kako od primenjene doze Cd, tako ni od sadržaja Cd u jetri. Ovo se može objasniti obnavljanjem SOD aktivnosti usled aktivacije kompenzatornih mehanizama tokom 28 dana, a u prilog ove pretpostavke idu i rezultati studije koju su sproveli Casalino i sar. (2002) koji su pokazali da se aktivnost CuZnSOD koja je bila značajno snižena nakon 10 i 20 dana intoksikacije Cd putem vode (250 mg CdCl<sub>2</sub>/L) vratila na kontrolne nivoe nakon 30 dana intoksikacije. Takođe, *in vitro* ispitivanja pokazala su da je inhibitorni efekat Cd na aktivnost enzima SOD izraženiji na mitohondrijalnu izoformu enzima MnSOD (Casalino i sar, 2002). Tačan mehanizam uticaja Cd na aktivnost enzima CuZnSOD nije poznat, a jedan od predloženih mehanizama jesu interakcije Zn i Cd koje se dešavaju pre svega na nivou apsorpcije iz GIT-a (Brzóška i Moniuszko-Jakoniuk, 2001). U našoj studiji

uočeno je značajno sniženje nivoa Zn u jetri pri intoksikaciji najvišom dozom Cd, ali ovo sniženje nije bilo praćeno sniženjem aktivnosti CuZnSOD, pa se na osnovu rezultata naše studije može pretpostaviti da drugi mehanizmi, poput inaktivacije ovog enzima pod uticajem ROS (Kwon i sar, 2001) ili promene konfiguracije ovog enzima usled interakcije Cd sa p53 tumor-supresor genom (Méplan i sar, 1999) imaju značajniju ulogu u smanjenju aktivnosti CuZnSOD pod uticajem Cd. Još jedan mehanizam delovanja Cd u jetri preko koga se objašnjava nastanak oksidativnog stresa je produkcija ROS pod uticajem Fe (Casalino i sar, 1997), a korelacija između nivoa MDA izmerenih u jetri i sadržaja Fe u jetri potvrđena je i u studiji na miševima (Djukić-Ćosić i sar, 2008). U ovom eksperimentu su doze  $\geq 1,25$  mg Cd/kg t.m/dan dovele do statistički značajnog povećanja sadržaja Fe u jetri. Kako Cd i Fe koriste iste transportere, DMT1 i MTP1, tokom intestinalne apsorpcije (Ryu i sar, 2004), očekivane su niže vrednosti Fe u jetri. Ipak postoje studije koje ukazuju da parenteralna, kao i produžena oralna izloženost Cd mogu dovesti do izražene akumulacije Fe u jetri (Horiguchi i sar, 2011). Ova akumulacija Fe u jetri objašnjava se fagocitozom Er, degradacijom Hb, stimulacijom sinteze feritina, indukcijom sinteze IL-6 koji utiče na homeostazu Fe regulisanu hepcidinom, kao i istiskivanjem Fe iz različitih citoplazmatskih i membranskih proteina pod uticajem Cd (Casalino i sar, 2002; Horiguchi i sar, 2011).

Nastanak oksidativnog stresa, odnosno mera oštećenja do koga dovode ROS, ispitan je merenjem nivoa MDA i ukupnih -SH grupa u jetri. Kadmijum nije pokazao značajan uticaj na nivoe ukupnih -SH grupa, ali su sa druge strane sve primenjene doze Cd dovele do porasta nivoa MDA u jetri, kao pokazatelja oštećenja lipida pod uticajem nastalih ROS, pri čemu je taj porast bio izuzetno visok (čak 14 puta u grupi tretiranoj najvišom dozom Cd). Utvrđena jaka korelacija između nivoa MDA i nivoa GSH u jetri govori o značajnoj ulozi ove komponente neenzimske antioksidativne zaštite u razvoju lipidne peroksidacije, dok srednja jačina korelacije nivoa MDA sa nivoima Fe u jetri govori i o izvesnom učešću ovog Fentonovog metala u nastanku oksidativnog

stresa pod uticajem Cd. Slični efekti Cd na nivoe MDA, u smislu njihovog povećanja uočeni su i u drugim studijama, kako onim u kojima je Cd primenjivan jednokratno intraperitonealno ili oralno (Casalino i sar, 1997; Matović i sar, 2012), tako i u studiji u kojoj je Cd primenjivan tokom perioda od 4 nedelje oralno u dozi od 5 mg/kg t.m/dan (Renugadevi i Milton Prabu, 2010).

Dozna-zavisnost potvrđena je za oba parametra oksidativnog stresa na koje je Cd ispoljio efekat. Međutim iako je izračunati nivo CEDL<sub>5</sub> bio najniži za MDA, izuzetno niska vrednost (0,003 mg/kg t.m/dan), kao i činjenica da je MDA izuzetno osetljiv parametar te da njegov porast za 5% možda i nema patološki značaj, ukazuju da bi se kao kritični efekat Cd na jetru možda pre mogao posmatrati hepatični nivo GSH za koji je izračunata CEDL<sub>5</sub> vrednost iznosila 0,025 mg/kg t.m/dan. Svakako se, na osnovu rezultata ove studije, može potvrditi značajna uloga oksidativnog stresa u razvoju hepatotoksičnosti, te da centralno mesto zauzima upravo efekat koji Cd ispoljava na nivoe GSH u jetri.

Studije u kojima je ko-tretman eksperimentalnih životinjama Cd i antioksidansima poput narginina (Renugadevi i Milton Prabu, 2010) i melatonina (El-Sokkary i sar, 2010) doveo do izostanka histopatoloških i morfoloških promena jetre koje su bile uočene u grupama eksperimentalnih životinja tretiranih samo Cd pod istim eksperimentalnim uslovima, svakako predstavljaju još jednu potvrdu učešća oksidativnog stresa u razvoju hepatotoksičnosti.

Iako primarna povreda jetre potiče direktno od efekta Cd, sekundarna povreda jetre više je indirektna i nastaje kao posledica inflamatornih procesa koji nastaju usled aktivacije Kupferovih ćelija (Rikans i Yamano, 2000). Aktivirane Kupferove ćelije oslobađaju brojne inflamatorne medijatore poput citokina, adhezivnih molekula, hemokina i citotoksičnih molekula koji podstiču ćelije jetre da ispolje hemokine koje privlače i aktiviraju neutrofile i monocite iz cirkulacije. Tako inicijalna povreda inicira kaskadu događaja koji vode do nastanka inflamacije i daljeg oštećenja jetre. Postoje eksperimentalni dokazi koji

potvrđuju inflamaciju kao jedan od mehanizama hepatotoksičnosti Cd (Yamano i sar, 2000), a i naša studija potvrdila je razvoj inflamacije pod uticajem Cd budući da je primena Cd dovela do porasta broja Leu.

#### 5.1.4. Efekti na bubrege

Bubreg je organ koji je izuzetno osetljiv na uticaje toksičnih supstanci, pre svega zbog visokog stepena perfuzije i povećane koncentracije supstanci koje treba ekskretovati, a koje se nalaze u renalnim tubularnim ćelijama. Nefrotoksičnost Cd opisana je nakon profesionalne izloženosti, kao i nakon izloženosti ljudi nižim dozama Cd prisutnog u životnoj sredini (Nordberg, 2009). Kadmijum indukovana bubrežna oštećenja karakteriše disfunkcija tubularne apsorpcije, pa se kao rani znaci tubularne toksičnosti Cd javljaju povišena ekskrecija proteina male molekulske mase  $\beta$ 2-mikroglobulin,  $\alpha$ 1-mikroglobulin, retinol vezujućeg proteina, kao i povišena ekskrecija enzima lizozoma N-acetil glukozamidaze. Tubularne povrede progrediraju potom u generalizovaniju tubularnu disfunkciju koja dovodi do gubitka glukoze i aminokiselina (koje fiziološki nisu prisutne u urinu), bikarbonata i fosfata što je sve karakteristično za Fankoni sindrom. Eksperimentalne studije su potvrdile razvoj sindroma sličnog Fankoni sindromu u pacova pri intoksikaciji različitim dozama Cd tokom nekoliko nedelja (Brzoska i sar, 2003). Dugotrajna izloženost Cd dovodi pak i do oštećenja glomerula koje vodi albuminuriji i progresivnom padu stepena glomerularne filtracije što u krajnoj instanci dovodi do prestanka rada bubrega.

U ovoj studiji kao markeri bubrežne funkcije praćeni su relativna masa bubrega i serumski nivoi uree i kreatinina. Iako se može uočiti izvesno smanjenje relativne mase bubrega, nema statistički značajne promene relativne mase bubrega pod uticajem Cd. Sa druge strane, Cd je doveo do značajnih promena u serumskim nivoima uree i kreatinina. Serumski nivoi uree i kreatinina se upravo i koriste kao indikatori renalne funkcije, a povišeni

serumski nivoi kreatinina i uree reflektuju nastanak renalne disfunkcije. Uočeni povišeni nivoi uree pri dozama od 5 i 10 mg/kg t.m/dan, kao i povišeni nivoi kreatinina uočeni pri dozi od 10 mg/kg t.m/dan u ovoj studiji govore da su više doze Cd primenjene oralno tokom 4 nedelje dovele do nastanka renalne disfunkcije. Ovi rezultati u skladu su i sa studijom koju su sproveli Renugadevi i Prabu (2010), a u kojoj je primena CdCl<sub>2</sub> tokom 4 nedelje (5 mg/kg) dovela do značajnog porasta sadržaja uree, mokraćne kiseline i kreatinina u serumu tretiranih pacova u odnosu na nivoe kontrolne grupe. Pregledom literature uočava se da se LOAEL doze u studijama na životinjama kreću od 3,6 mg/kg t.m/dan (120 dana) uz efekat tubularne nekroze, 8,58 mg/kg t.m/dan (12 nedelja) kao doza koja je dovela do nastanka nekroze proksimalnih tubula i 15,2 mg/kg t.m/dan (4-7 meseci) za nastanak albuminurije (ATSDR, 2012). Ove doze slične su dozama koje su u našoj studiji dovele do značajnih promena u sadržaju uree i kreatinina u serumu kao markera bubrežne funkcije, sa tom razlikom što je u našem slučaju dužina izloženosti bila kraća. Kada se uporedi najniža literaturna NOAEL vrednost 2,5 mg/kg t.m/dan dobijena u oralnoj studiji na pacovima koja je trajala 4 nedelje (Groten i sar, 1990) uočava se da je ona identična sa NOAEL vrednosti za efekat na porast serumskih nivoa kreatinina dobijenoj u našoj studiji, odnosno nešto niža od donjih granica pouzdanosti izračunatih za 5% efekta na porast nivoa kreatinina (2,7 mg/kg t.m/dan) i 5% efekta na porast nivoa uree (2,81 mg/kg t.m/dan).

U ovoj studiji nije ispitivan sadržaj biomarkera efekta Cd u urinu, ali je uočen smanjen sadržaj albumina u serumu koji se može, osim sa smanjenom sintetskom sposobnošću jetre povezati i sa ranom albuminurijom koja se javlja kao posledica tubularnog, pre nego glomerularnog porekla (Johri i sar, 2010), a što je i u skladu sa uočenom renalnom disfunkcijom koja je pri ovim dozama i trajanju studije najverovatnije bila tubularnog porekla. Znatno niže kritične doze koje su dovele do smanjenja nivoa albumina u odnosu na doze koje su dovele do porasta nivoa uree i kreatinina u serumu mogu se objasniti

istovremenim toksičnim efektima koje Cd ispoljava kako na jetru (organ u kome se sintetiše albumin), tako i na bubrege (organ njegove ekskrecije).

Takođe, nije praćen ni nivo Cd u urinu, već je za uspostavljenje odnosa eksterna-interna doza korišćen nivo Cd u krvi odnosno u samim bubrezima. Upotreba nivoa Cd u krvi i bubrezima zarad procene odnosa doza-tubularni odgovor umesto upotrebe nivoa Cd urinu eliminiše mogućnost da uspostavljena veza može biti posledica paralelne ko-ekskrecije Cd i urinarnih markera efekta (Åkesson i sar, 2005). Uspostavljena jaka korelacija upotrebljenih doza i izmerenih nivoa Cd kako u krvi, tako i u bubrezima u našoj studiji potvrđuje da su svi uočeni efekti na renalnu funkciju pacova posledica primenjenih doza Cd. Slične koncentracije Cd u jetri i bubrezima (isti red veličina za sve primenjene doze) govore o tome da akumuliranje Cd u bubrezima tokom 4 nedelje trajanja eksperimenta još nije počelo, te da bi duža izloženost pri istim dozama verovatno rezultirala akumuliranjem Cd te samim tim i izraženijom nefrotoksičnošću.

Pokazani nefrotoksični efekti Cd tumače se sposobnošću Cd da ispolji široki spektar efekata na ćelijskom nivou, uključujući indukciju oksidativnog stresa, interferiranje sa normalnom fiziološkom funkcijom  $Ca^{2+}$ , remećenje transporta putem epitelnih ćelija i pokretanje apoptoze (Prozialeck i sar, 2003). Pa ipak, smatra se da Cd-indukovane povrede bubrega nastaju pre svega kao posledica nastanka oksidativnog stresa. Naime, citosolni Cd indirektno generiše ROS koje troše endogene antioksidanse i dovode do oštećenja bioloških membrana, kako lipidne komponente membrana, tako i transportnih proteina uključujući i  $Na^{+}/K^{+}$  ATPazu, enzim koji ima značajnu ulogu u patogenezi nefropatije izazvane Cd (Asagba i sar, 2004). Stoga je u ovom istraživanju najviše prostora dato upravo istraživanju sposobnosti Cd da izazove oksidativni stres u bubregu pacova i daljem ispitivanju mehanizama indukcije oksidativnog stresa od strane Cd koji su karakteristični za bubrege.

U ovoj studiji utvrđeno je smanjenje aktivnosti CuZnSOD za čak 69% u odnosu na kontrolnu vrednost, pri čemu je do redukovane aktivnosti došlo već



pri dozama od 0,6 mg/kg t.m./dan. Brojne druge studije takođe su pokazale da Cd izaziva smanjenje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite. Tako su Casalino i sar. (2002) pokazali da oralna izloženost Cd putem vode za piće (250 mg/L) tokom 10 i 30 dana izaziva značajno sniženje u ukupnoj bubrežnoj aktivnosti SOD, kao i izoformama ovog enzima CuZn-SOD i Mn-SOD, i enzima CAT. I drugi putevi izloženosti Cd izazvali su slične efekte: i.p. injekcija CdCl<sub>2</sub> (6,5 mg/kg t.m) tokom 5 dana i subkutana injekcija Cd (1,2 mg Cd/kg t.m) 5 puta nedeljno tokom 9 nedelja dovela je do značajnog smanjenja bubrežne aktivnosti SOD, CAT, GR i GPx (Morales i sar, 2006). Ovaj efekat Cd na enzime antioksidativne zaštite može se objasniti direktnim interakcijama između Cd i enzima i to usled vezivanja Cd za SH grupe, kao i usled zamene metala kofaktora u aktivnim centrima enzima sa Cd (Renugadevi i Prabu, 2009). Tako bi se i povećanje sadržaja Cu u bubregu pacova uočeno u ovoj studiji moglo tumačiti istiskivanjem ovog metala iz aktivnog centra enzima CuZnSOD od strane Cd, pri čemu se potvrdom ove pretpostavke može smatrati i uspostavljena jaka negativna korelacija između sadržaja Cu i aktivnosti enzima CuZnSOD u bubrezima. Kadmijum međutim, nije imao značajan uticaj na sadržaj Zn u bubrezima u ovoj studiji, što se može tumačiti odsustvom kompeticije Cd i Zn na nivou bubrega. Možda bi potvrda pretpostavke o odsustvu kompeticije Zn i Cd na nivou bubrega mogli biti i rezultati dobijeni u studiji u kojoj je ispitivan uticaj Cd na bubrege, kao i protektivni efekat Zn u uslovima intoksikacije Cd (Jacquillet i sar, 2006). Naime, primena Zn u uslovima trovanja Cd (ip 500 µg Cd/kg/dan tokom 5 dana uz period oporavka od 15 dana) sprečila je razvoj nefrotoksičnosti koja je utvrđena histopatološkom analizom u grupi koja je primala samo Cd. Uočeni efekat Zn u pomenutoj studiji tumačen je ulogom Zn u prevenciji nastanka apoptoze i nekroze, a ne eventualnom kompeticijom Cd i Zn na nivou DMT1 transportera budući da nije uočena promena akumulacija Cd u bubrezima pod uticajem Zn. Moskovitz i sar (2002) predložili su da povišenje nivoa proteinskih karbonila i smanjeni nivoi ukupnih -SH grupa uočeni pri ekspoziciji Cd mogu objasniti oksidativnu

modifikaciju i sledstveni gubitak aktivnosti brojnih enzima. U našoj studiji takođe je uočeno smanjenje nivoa ukupnih –SH pri primeni dve najviše doze Cd, što svakako može biti još jedan od mehanizama kojima je Cd doveo do sniženja aktivnosti enzima CuZnSOD.

U ovom eksperimentu takođe je utvrđeno i smanjenje sadržaja GSH u bubrezima pod uticajem Cd što je u skladu i sa rezultatima drugih eksperimentalnih studija. Tako su Renugadevi i Prabu (2009) tretirali pacove sa CdCl<sub>2</sub> tokom 4 nedelje (5 mg/kg) i uočili smanjenje nivoa GSH što je tumačeno trošenjem ovog peptida usled direktnog vezivanja Cd za njegove SH grupa, kao i potvrđenim uticajem Cd na aktivnost renalnih enzima. Naime, pokazano je da Cd deluje na enzim GR koji omogućava redukovanje GSSG u GSH i na G6PD, enzim bogat SH grupama koji snabdeva ćelije sa NADPH inače kofaktorom enzima GR.

Iako Cd nesumnjivo ispoljava efekat na oba ispitivana parametra antioksidativne zaštite, izuzetno niske vrednosti donjih granica pouzdanosti za efekte 5 i 10% dobijene za parametar CuZnSOD u našoj studiji ukazuju da je efekat Cd na ispitivanoj komponenti enzimske zaštite u bubregu izraženiji, te da se upravo ovaj efekat može smatrati kritičnim efektom na nivou bubrega.

Svakako da je najznačajnija posledica nastanka oksidativnog stresa upravo peroksidacija lipidne komponente membrane ćelija koja je dokazana i u ovoj studiji. Naime, sadržaj MDA bio je značajno povećan u odnosu na kontrolnu grupu u svim grupama osim pri primeni najniže doze Cd. Druge eksperimentalne studije takođe su ukazale na povišene nivoe TBARS/MDA u bubrezima pacova izloženih Cd različitim putevima i tokom različitih vremenskih intervala (1-12 nedelja) (Matović i sar, 2013; Morales i sar, 2006; Renugadevi i Prabu, 2009). Kako je efekat na nivoe Fe u bubrezima u ovoj studiji izostao, na bazi rezultata naše studije može se tvrditi da je upravo efekat na komponente antioksidativne zaštite, i to na CuZnSOD (uspostavljena najjača korelacija sa nivoima MDA) ključni događaj u nastanku lipidne peroksidacije u renalnim ćelijama.

Značaj uloge oksidativnog stresa u razvoju nefrotoksičnosti pod uticajem Cd potvrđen je i u brojnim studijama u kojima je primena različitih antioksidanasa sprečila nastanak nefrotoksičnih efekata Cd. Tako je istovremeni tretman kvercetinom sprečio nastanak tubularne nekroze, tubularne degeneracije i deskvamacije tubularne dilatacije uočene u grupi životinja tretiranim isključivo Cd (Renugadevi i Prabu, 2009). Novija istraživanja povezuju nastanak oksidativnog stresa sa drugim mehanizmima značajnim za razvoj nefrotoksičnosti Cd. Tako se sindrom sličan *Fanconi*-jevom sindromu koji se javlja pri trovanju Cd direktno vezuje za inaktivaciju Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-azne pumpe uzrokovane povećanom produkcijom ROS u proksimalnim tubularnim ćelijama (Nair i sar, 2013), dok drugi eksperimenti ukazuju i na učešće apoptoze i nekroze u nefrotoksičnosti Cd, pri čemu se pomenuti procesi dovode u vezu sa nastalim ROS u bubrezima u uslovima trovanja Cd (Cuypers i sar, 2010). Međutim, nefrotoksičnost Cd povezuje se i sa drugim mehanizmima koji nisu direktna posledica nastanka oksidativnog stresa, poput na primer oštećenja kaderin zavisnih međućelijskih veza u proksimalnim tubulama pod uticajem Cd (Prozialeck i sar, 2003), promena u proteinima kladinima koji ulaze u sastav tesnih međućelijskih veza (Jacquillet i sar, 2006), te uticajem Cd na mitohondrije (Gobe i Crane, 2010).

Može se zaključiti da Cd, kao dvovalentni katjon relativno malog atomskog radijusa, može intereagovati sa brojnim biološkim molekulima i dovesti do brojnih biohemijskih poremećaja. Upravo zbog nedostatka izrazite hemijske specifičnosti, nefrotoksični efekti Cd mogu se tumačiti uticajem na više nivoa u proksimalnim tubulima, pri čemu je ova studija potvrdila da centralno mesto u nefrotoksičnosti Cd zauzima pokretanje oksidativnog stresa, a na bazi dobijenih rezultata može se govoriti o kritičnom efektu Cd na enzimsku komponentu antioksidativne zaštite, na aktivnost citosolnog enzima CuZnSOD u bubrezima.

#### 5.1.5. Efekti na štitastu žlezdu

Rezultati ove studije pokazali su da Cd izaziva značajno sniženje nivoa T3 u serumu pri svim primenjenim dozama, dok su doze  $\geq 1, 25$  mg/kg t.m/dan dovele do sniženja serumskih nivoa T4. Drugi autori su takođe ispitivali uticaj Cd na serumske nivoe hormona štitaste žlezde. Sniženi nivoi T4 hormona uz značajno povišenu relativnu masu štitaste žlezde izmereni su u serumu pacova koji su tokom 35 dana kao vodu za piće koristili vodu koja je sadržala 200 ppm Cd (Hammouda i sar, 2008). U studiji sprovedenoj na pilićima, intramuskularno davanje vodenog rastvora CdCl<sub>2</sub> u dozi 2,5 mg/kg t.m/dan, tokom 15 dana, dovela je do pada nivoa T3 hormona, dok se nivoi T4 hormona nisu promenili u odnosu na kontrolnu grupu (Gupta i Kar, 1999). Međutim, Ćurčić i sar, (2012) dokazali su smanjenje nivoa oba hormona u pacova oralno tretiranih Cd u dozi od 15 mg/kg t.m/dan tokom 28 dana.

Smanjenje serumskih nivoa T4 hormona uočeno u našoj studiji može se objasniti inhibicijom sinteze i/ili oslobodanja ovog hormona, odnosno uticajem Cd na funkciju same štitaste žlezde, s obzirom na činjenicu da se sve faze sinteze ovog hormona dešavaju u žlezdi. U drugom eksperimentu sprovedenom na pacovima uočen je pak, značajan porast nivoa T4 hormona kada su pacovi tretirani visokim dozama Cd u pijaćoj vodi (50 mg Cd/dm<sup>3</sup>) tokom 24 nedelje (Pilat-Marcinkiewicz i sar, 2003). Uočeni porast objašnjen je mogućim „curenjem“ T4 hormona iz oštećenih tireocita, jer su u studiji dokazane i histopatološke promene štitaste žlezde. Može se pretpostaviti da je Cd pri ovim dozama izazvao „suptilnije“ promene funkcije štitaste žlezde odnosno da nije došlo do oštećenja same žlezde. Ipak, doza od 1,25 mg/kg t.m/dan, kao i više primenjene doze dovele su do izvesnih promena u funkciji štitaste žlezde koji se ogledao u sniženim nivoima T4 hormona u serumu. Efekat Cd na štitastu žlezdu objašnjava se akumulacijom Cd u mitohondrijama folikula epitelnih ćelija štitaste žlezde, remećenjem oksidativne fosforilacije i snabdevanja mitohondrija energijom usled čega dolazi i do inhibicije sinteze i

oslobađanja hormona štitaste žlezde (Yoshizuka i sar., 1991, Pilat-Marcinkiewicz i sar, 2003).

Za razliku od nivoa T4 hormona, serumski nivoi T3 hormona su u ovoj studiji bili značajno sniženi pod uticajem svih šest primenjenih doza Cd što navodi na zaključak da Cd interferira sa funkcijom štitaste žlezde i na nivou procesa koji se dešavaju izvan same žlezde, te da su ti procesi osetljiviji na uticaj Cd od procesa koji se dešavaju u samoj žlezdi. Pad nivoa T3 hormona uzrokovan svim primenjenim dozama Cd u ovoj studiji može se objasniti smanjenom aktivnošću enzima 5'D-I koji, izvan štitaste žlezde, vrši konverziju T4 hormona u aktivnu formu T3. Ovu pretpostavku potvrđuju istraživanja koja su na pacovima i miševima sprovedli Chaurasia i sar (1996) odnosno Gupta i sar (1997), a koja su potvrdila inhibiciju ovog enzima u uslovima intoksikacije Cd. Jedan od predloženih mehanizama inhibicije ovog enzima je lipidna peroksidacija membrana ćelija za koje se ovaj enzim mora vezati kako bi ispoljio svoju aktivnost (Chaurasia i sar, 1996). Sposobnost Cd da izazove lipidnu peroksidaciju u jetri (gde se u najvećem stepenu i dešava dejodinacija) potvrđena je i u ovoj studiji, a o ulozi lipidne peroksidacije u smanjenju nivoa hormona T3 govori i uspostavljena jaka negativna korelacija između stepena lipidne peroksidacije u jetri (nivoi MDA) i nivoa T3 hormona u serumu pacova. Može se zaključiti da se dokazani efekat Cd kao ometača funkcije štitaste žlezde delimično može objasniti i njegovom ulogom u razvoju oksidativnog stresa. Sa druge strane, kako enzim 5'D-I sadrži u svom aktivnom centru Se (Köhrle, 2000) dokazani anatagonizam između Cd i Se (Al-Waeli et al., 2012) predlaže se kao još jedan mogući mehanizam uključen u inhibiciju aktivnosti ovog enzima. Smanjeni nivoi Se u jetri uzrokovani primenom Cd uočeni u ovoj studiji, kao i uspostavljena srednja jačina korelacije između nivoa Se u jetri i nivoa T3 u serumu svakako potvrđuju i ulogu ovog mehanizma u smanjenju nivoa T3 pod uticajem Cd.

Promene u nivoima FT4 i FT3 hormona uočene pod ovim eksperimentalnim uslovima odgovaraju promenama u nivoima vezanih formi

ovih hormona te se takođe mogu objasniti već predloženim mehanizmima toksičnosti Cd.

Promene u homeostazi funkcije štitaste žlezde mogu imati brojne negativne efekte, posebno ukoliko se ove promene jave tokom osetljivog perioda razvoja jedinki. Ovi efekti uključuju trajne negativne efekte na rast i razvoj nervnog i reproduktivnog sistema (Boas i sar, 2012), što je potvrđeno i u našoj studiji, s obzirom na to da je Cd ispoljio negativne efekte na prirast mase pacova.

Dozna-zavisnost dokazana za posmatrane parametre funkcije štitaste žlezde, kao i niske kritične doze dobijene za ove efekte Cd ukazuju na mogućnost korišćenja ovog efekta Cd kao polazne tačke u toksikološkoj proceni rizika. Naime, prema poslednjem ATSDR toksikološkom profilu Cd (ATSDR, 2012) najosetljiviji sistemski efekat Cd nakon produžene (9 meseci) oralne ekspoziciji Cd je toksični efekat na rast kostiju. Minimalni nivo rizika izračunat za Cd iznosi 0,5 µg/kg t.m./dan i dobijen je deljenjem BMDL 0,05 mg Cd/kg t.m./dan (dobijene za uticaj Cd na rast lumbalne kosti) sa faktorom sigurnosti 100. Vrednosti CEDL<sub>5</sub>, odnosno BMDL<sub>5</sub> izračunate u ovoj studiji za efekat Cd na hormone štitaste žlezde kretale su se od 0,059 do 0,365 mg Cd/kg t.m./dan i to za mnogo kraći period ekspozicije (28 dana) na osnovu čega se može zaključiti da se efekti Cd na ove parametre, a posebno na T3 serumske nivoe za koji je izračunata najniža CEDL<sub>5</sub> vrednost u celoj studiji, mogu smatrati kritičnim efektima Cd. Takođe, upravo bi zbog svoje posebne prirode i značaja efekat Cd na hormon T3 mogao biti korišćen kao baza za razvijanje dozvoljenih graničnih vrednosti izloženosti opšte populacije Cd.

## 5.2. TOKSIČNI EFEKTI POLIHLOOROVANIH BIFENILA

### 5.2.1. Efekti na prirast telesne mase

Smanjenje prirasta t.m. smatra se ranim indikatorom opšte toksičnosti ispitivane hemikalije. Rezultati ove studije ukazali su da su PCB doveli do

statistički značajnog smanjenja prirasta t.m. u svim tretiranim grupama pacova u odnosu na kontrolnu grupu. Smatra se da je efekat PCB na gubitak t.m, odnosno na smanjenje prirasta t.m. posledica pre svega mehanizama koji uključuju aktivaciju Ah receptora (Hori i sar, 1997).

Slični rezultati dobijeni su i u drugim studijama u kojima je ispitivana toksičnost kako komercijalnih smeša PCB, tako i pojedinačnih kongenera. Pacovi koji su tretirani Aroclor 1254 u dozi od 2 mg/kg t.m/dan i.p. tokom 30 dana imali su značajno niže t.m. u odnosu na pacove iz kontrolne grupe koji su i.p. tretirani kukuruznim uljem tokom 30 dana (Banudevi i sar, 2006). Primena kongenera PCB 126 u dozi od 5 µmol/kg takođe je dovela do smanjenja rasta pacova u odnosu na kontrolnu grupu tretiranu samo kukuruznim uljem (Lai i sar, 2013).

Pregledom literature (ATSDR, 2000) uočava se da se procenjene NOAEL vrednosti za ovaj efekat u studijama na pacovima kreću između 1 i 12,5 mg PCB/kg t.m/dan u zavisnosti od dužine trajanja studije i korišćenog soja pacova. Na osnovu naše studije NOAEL vrednost je procenjena na <0,5 mg/kg t.m/dan, a smanjenje prirasta t.m. kretalo se od 39,61% do 53,77% u odnosu na kontrolnu grupu. Ipak, treba naglasiti da nije uspostavljena dozna zavisnost ovog parametra, te se stoga dobijeni rezultati moraju posmatrati sa izvesnom rezervom.

### 5.2.2. Efekti na hematološke parametre

U ovoj studiji primena komercijalne smeše PCB nije ispoljila značajne efekte na broj Er, kao ni na nivoe Hb u krvi, dok je pri najvišoj dozi došlo do statistički značajnog smanjenja broja Tr u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati drugih eksperimentalnih studija u kojima je ispitivan uticaj PCB na izvesne hematološke parametre daju kontradiktorne podatke. Tako je dokazana sposobnost kongenera PCB 126 da dovede do smanjenja sadržaja Hb, hematokrita, te volumena i broja Tr nakon ekspozicije pacova dozi od 7,4

mg/kg t.m/dan (Chu i sar, 1994). Takođe, primećen je i značajan pad u sadržaju Hb i smanjenje hematokrita u pacova tretiranih sa 4 mg/kg/dan PCB 105 tokom 13 nedelja (Chu i sar, 1998). Sa druge strane, nisu uočeni hematološki efekti u pacova izloženih dozama 0,77 mg/kg/dan PCB 77, 0,17 mg/kg/dan PCB 118, 3,7 mg/kg/dan PCB 28 ili 4,2 mg/kg/dan PCB 128 tokom nekoliko nedelja (ATSDR, 2000).

Rezultati uticaja PCB na hematološke parametre dobijeni u našoj studiji mogu se tumačiti izvesnim promenama uočnim u drugim ispitivanim organima. Naime, u jetri pacova trovanih PCB je uočeno smanjenje sadržaja Fe, ali tek pri najvišoj primenjoj dozi, a upravo se efektom PCB na homeostazu Fe donekle i objašnjava uticaj koji PCB ispoljavaju na Er i Hb (Wang i sar, 2013). Može se pretpostaviti da bi više doze PCB ili duži vremenski period izloženosti dozama korišćenim u našoj studiji doveli do promena u posmatranim parametrima. Ipak, treba naglasiti da u našoj studiji nije utvrđen ni statistički značajan trend promene broja Er i sadržaja Hb u odnosu na primenjene doze PCB. Sa druge strane, dozna zavisnost utvrđena je za nivoe Tr i pokazano je statistički značajno smanjenje njihovih nivoa pri primeni najviše doze PCB. Može se pretpostaviti da PCB ispoljavaju svoj uticaj na broj Tr remeteći funkciju koštane srži, ispoljavajući svoje toksične efekte na jetru, delujući na slezinu ili ispoljavajući toksične efekte direktno na Tr u krvi. Splenomegalija pod uticajem PCB potvrđena je u ovoj studiji te se može pretpostaviti da Tr prelaze iz krvi u uvećanu slezinu. Takođe, nastanak hepatomegalije pod uticajem PCB koji je dokazan u ovoj studiji može se eventualno objasniti povišenom razgradnjom Tr u jetri, iako se direktan efekat PCB prisutnih u krvi na nivo Tr može samo pretpostaviti imajući u vidu da u ovoj studiji nisu izmereni nivoi PCB u krvi te se ne može tvrditi da postoji korelacija između nivoa PCB u krvi i primenjenih doza PCB.

U našoj studiji uočen je različit efekat na broj Leu pri primeni različitih doza PCB. Naime, pri nižim dozama PCB (0,5-2 mg/kg t.m/dan) došlo je do statistički značajnog porasta broja Leu u krvi pacova, doze od 4 i 8 mg/kg



t.m/dan nisu imale statistički značajan efekat na broj Leu, dok je najviša doza PCB (16 mg/kg t.m/dan) dovela do statistički značajnog smanjenja broja Leu u odnosu na kontrolnu grupu. Može se pretpostaviti da su niže doze PCB primenjene u ovoj studiji dovele do pokretanja imunološkog odgovora. Tako je u studiji koju su na pacovima sprovedeli Smialowicz i sar (1989) pokazana povišena proliferacija limfocita, ali pod uticajem visokih doza Aroclor 1254 (25 mg/kg t.m/dan) i to posle 5-15 nedelja. Najviša doza PCB primenjena u ovoj studiji pak, ispoljila je imunotoksične efekte uzrokujući pad broja Leu. Studije sprovedene na životinjama ukazale su na ozbiljne efekte PCB na imunološki sistem, uključujući značajno smanjenje veličine timusa, smanjenje imunološkog odgovora na ovčije Er i smanjenu otpornost na infekcije (ATSDR, 2000). Tako su miševi izloženi PCB konzumiranjem kontaminiranih namirnica ispoljili znake imunosupresije-smanjenu fagocitozu i smanjen broj CD8+ ćelija (Fournier i sar, 2000). Imunotoksični efekat PCB objašnjava se sposobnošću PCB da izazovu apoptozu monocita i timocita koja je dokazana u *in vitro* studijama (Shin i sar, 2000; Tan i sar, 2003). Drugi predloženi mehanizam kojim PCB izazivaju smanjenje ćelijskog imuniteta je indukcija oksidativnog stresa, pre svega preko smanjenja aktivnosti SOD (Narayanan i sar, 1998). Smanjenje aktivnosti ovog enzima antioksidativne zaštite pod uticajem PCB, dokazana je i u našoj studiji u homogenatima jetre i bubrega. Brojne studije u kojima su korišćeni pojedinačni kongeneri PCB ukazale su da u imunotoksičnosti PCB značajnu ulogu imaju kako AhR zavisni, tako i AhR nezavisni mehanizmi toksičnosti (ATSDR, 2000).

Modelovanje odnosa doza-odgovor podataka dobijenih za broj Leu u našoj studiji dokazao je doznu zavisnost ovog parametra, pri čemu je procenjeno da je dominantan efekat PCB na broj Leu, efekat na smanjenje njihovog broja. Niska vrednost donje granice pouzdanosti izračunate za efekat smanjenja broja Leu za 5% (1,09 mg/kg t.m/dan) ukazuje da se na bazi ove studije može zaključiti da je efekat na smanjenje broja Leu kritični efekat ovih hemikalija na hematološke parametre. Imunotoksični efekti PCB se i smatraju najosetljivijim efektima ovih hemikalija imajući u vidu da je LOAEL vrednost

koja je korišćena u proceni TDI upravo vrednost dobijena za efekat na smanjenje imunološkog odgovora na ovčije Er (Tryphonas i sar, 1991).

### 5.2.3. Efekti na jetru

Hepatotoksičnost PCB je, kao što je već bilo reči, obimno dokumentovana u studijama na eksperimentalnim životinjama, pri čemu su kao pokazatelji oštećenja jetre uočeni indukcija mikrozomalnih enzima jetre, povećani nivoi enzima jetrene funkcije i lipida, uvećanje jetre, promene u nivoima porfirina i metabolizmu vitamina A, kao i različite histopatološke promene (Esteban i sar, 2014; Kutlu i sar, 2007; Roos i sar, 2011). Upravo se hepatotoksični efekti često navode kao najosetljiviji odnosno kritični efekti PCB, a smatra se da u razvoju hepatotoksičnih efekata PCB značajnu ulogu imaju i AhR zavisni i AhR nezavisni mehanizmi toksičnosti (ATSDR, 2000). U ovoj studiji su od pokazatelja oštećenja jetre ispitivani relativna masa jetre, sadržaj albumina, te aktivnosti enzima funkcije jetre AST, ALT i ALP.

Relativna masa jetre bila je statistički značajno viša u grupama koje su tretirane smešom PCB kongenera u odnosu na relativne mase jetre pacova iz kontrolne grupe. Literaturni podaci (ATSDR, 2000) potvrđuju povećanje apsolutne i relativne mase jetre u pacova tretiranih ili sa smešama ili sa pojedinačnim kongenerima PCB u različitim dozama. Tako je intoksikacija Aroclor 1254 u dozi 1 mg/kg t.m/dan tokom 4 dana dovela do povećanja relativne mase jetre, dok primena duplo nižih doza nije dovela do promena ovog parametra. Do povećanja relativne mase jetre došlo je i pri intragastričnoj primeni 10 odnosno 25 mg PCB/kg t.m/dan tokom 10 nedelja. Rezultati naše studije ukazuju da i primena niskih doza (0,5 mg/kg t.m/dan) tokom dužeg perioda izloženosti (4 nedelje) dovodi do porasta relativne mase jetre. Procenjena NOAEL vrednost u ovoj studiji je <0,5 mg/kg t.m/dan što je u skladu sa najnižom procenjenom literaturno NOAEL vrednošću (određenoj u studiji na pacovima tretiranih 35 dana) koja iznosi 0,25 mg PCB/kg t.m/dan

(ATDSR, 2000). U našoj studiji su izračunate donje granice pouzdanosti za 10% efekta na relativnu masu jetre (0,113 mg/kg t.m/dan) i za 5% efekta (0,05 mg/kg t.m/dan) bile čak niže od ove procenjene NOAEL vrednosti. Nije bilo uočenih promena u relativnoj masi jetre pri oralnoj primeni niske doze-0,033 mg/kg t.m/dan Aroclor 1242 u studiji na pacovima sprovedenoj tokom 30 dana (Casey i sar, 1999) što potvrđuje rezultate naše studije, jer je primenjena doza niža od izračunatih donjih granica pouzdanosti CED vrednosti, pa se ne bi ni očekivalo da izazove značajne promene u relativnoj masi jetre.

Istraživanje kliničkih parametara funkcije jetre sprovedeno u ovoj studiji pokazalo je da izloženost Aroclor 1254 tokom 28 dana dovodi do promene nivoa AST u serumu pacova tretiranih najvišom dozom ove komercijalne smeše PCB (16 mgPCB/kg t.m/dan), dok sa druge strane nije bilo statistički značajnih promena u serumskim nivoima ALT i ALP. Uočeno je dozno-zavisno sniženje nivoa albumina u serumu, međutim ovo sniženje nije bilo statistički značajno. Nalazi ove studije delimično su saglasni sa rezultatima drugih studija koje su ispitivale efekte PCB na ove kliničke parametre funkcije jetre. Tako je u studiji koju su sproveli Kutlu i sar. (2007) primećeno povišenje nivoa AST i ALT bez promena u nivoima ALP nakon subakutanog tretmana pacova sa 10 mg/kg t.m Aroclor 1254, svaki drugi dan tokom 6 nedelja. U studiji u kojoj je procenjivana hepatotoksičnost komercijalnih smeša PCB (Aroclor 1016, 1242, 2354 i 1260) mužjacima i ženka pacova *Sprague-Dawley* soja putem hrane davane su različite koncentracije PCB (od 25 do 200 ppm) tokom 24 meseca i uočeno je povećanje AST i ALT serumske aktivnosti što je objašnjeno oštećenjem membrane hepatocita do koje su doveli primenjeni PCB. Takođe, izloženost putem hrane kongeneru PCB 126 za koji je utvrđeno da najviše doprinosi toksičnosti Aroclor 1254 (Elabbas i sar, 2011) tokom 13 nedelja dovela je do povećanih serumskih nivoa AST i ALP u tretiranih pacova (Chu i sar, 1994). Promene u nivoima proučavanih parametara funkcije jetre koji su uočeni u našoj studiji potvrdile su pretpostavku da produžena izloženost PCB izaziva poremećaje u funkciji jetre.

Iako više puta uočen i dokazan, tačni mehanizmi odgovorni za razvoj hepatotoksičnog efekta PCB nisu u potpunosti poznati. Smatra se da je učešće oksidativnog stresa u razvoju ovog efekta od velikog značaja. Neki od predloženih mehanizama indukcije oksidativnog stresa od strane PCB su prekomerna ekspresija CYP1A enzima koja vodi hiperprodukciji ROS (Schlezinger i sar, 2006), redukcija nivoa GSH u jetri (Lai i sar, 2010), smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima (Twaroski i sar, 2001) i indirektno putem gubitka Se i Zn i povišenja nivoa prooksidansa Cu (Lai i sar, 2010). Prevencija hepatotoksičnih efekata PCB (poremećeni biohemijski parametri, kao i hepatocelularna morfologija) upotrebom antioksidansa kvercetina u studiji sprovedenoj na pacovima (Sekaran i sar, 2012) još jedan su dokaz nesumnjivog učešća oksidativnog stresa u razvoju ovog toksičnog efekta PCB. Bez obzira na postojanje brojnih dokaza da upravo oksidativni stres zauzima ključno mesto u razvoju hepatotoksičnosti PCB, tačni mehanizmi indukcije oksidativnog stresa u jetri nisu utvrđeni, a nije ni uspostavljen precizan odnos između nivoa izloženosti PCB i prooksidativnog efekta PCB.

Iako je u razvoj hepatotoksičnosti PCB svakako uključen i direktni uticaj PCB (produkcija ROS) i indirektni uticaj PCB (preko uticaja na komponente antioksidativne zaštite) na razvoj oksidativnog stresa, u ovoj studiji ispitan je samo efekat PCB na komponentu neenzimske antioksidativne zaštite-GSH, enzim antioksidativne zaštite-CuZnSOD, kao i efekat na nivoe bioelemenata Zn, Se i Fe koji bi takođe mogli imati izvesnu ulogu u nastanku oksidativnog stresa.

Uočeni pad aktivnosti CuZnSOD pod uticajem PCB doza  $\geq 2$  mg/kg t.m/dan u ovom eksperimentu je u saglasnosti sa rezultatima koji su dobijeni u studiji u kojoj su pacovi i.p. tretirani sa 2 mg Aroclor 1254/kg t.m/dan tokom 30 dana (Banudevi i sar, 2006). Ove promene u CuZnSOD aktivnosti mogu se objasniti inaktivacijom ovog enzima od strane  $H_2O_2$  čije se količine povećavaju usled smanjene aktivnosti enzima CAT kao posledice smanjenih količina kofaktora NADPH u uslovima trovanja PCB (Twaroski i sar, 2001) ili usled

povećane aktivnosti enzima CYP 450 (Schlezinger i sar, 2006). U našoj studiji uočeno je smanjenje sadržaja Zn pri dozama 8 i 16 mg PCB/kg t.m/dan što bi takođe moglo doprineti uočenom smanjenju aktivnosti ovog enzima. Naime, kako ulazi u sastav aktivnog centra ovog enzima, količina ovog jona u jetri mogla bi biti limitirajući faktor njegove sinteze i aktivnosti. Pad nivoa Zn u jetri životinja tretiranih PCB uočen je i u studiji u kojoj su pacovi tretirani i.p. PCB 126 u kukuruznom ulju u dozi 5  $\mu\text{mol/kg}$  (Lai i sar, 2013). S obzirom na to da je u našoj studiji uočeno povišenje nivoa Zn u bubrezima pacova tretiranih PCB, može se pretpostaviti da PCB izazivaju povećanu ekskreciju Zn iz jetre u krv i potom ulazak Zn u bubrege, iako tačan mehanizam ove preraspodele Zn u organizmu pod uticajem PCB nije još uvek utvrđen. Efekat PCB na ekspresiju relevantnih gena je takođe predložen kao jedan od mogućih mehanizama uticaja PCB na aktivnost enzima CuZnSOD i to u studiji sprovedenoj na zebrecama u kojoj je takođe uočeno značajno sniženje aktivnosti ovog enzima pod uticajem PCB (Liu i sar, 2014).

Studije su ukazale da PCB deluju i na neenzimsku komponentu antioksidativne zaštite-GSH. Tako je tretman sa 2 mg Aroclor 1254/kg t.m/dan istim putem unosa tokom 30 dana (Sekaran i sar, 2012) doveo do značajnog smanjenja GSH sadržaja u jetri. Pad sadržaja GSH u jetri uočen je i u našoj studiji, ali taj pad nije bio statistički značajan u odnosu na kontrolne vrednosti. Sa druge strane, nastanku oksidativnog stresa u jetri mogao bi doprineti i uočeni pad sadržaja Se u jetri (pri najvišoj primenjenoj dozi PCB), jer je Se inkorporiran u brojne enzime antioksidativne zaštite poput Gpx i tioredoksin reduktaze (Lai i sar, 2011), pa bi nedostatak Se mogao dovesti do povećane osetljivosti na nastanak oksidativnog stresa (Steinbrenner i Sies, 2009), naročito u uslovima povećane produkcije ROS koja je karakteristična za intoksikaciju PCB. Na osnovu rezultata naše studije može se zaključiti da je uticaj PCB na enzimsku komponentu antioksidativne zaštite izraženiji nego uticaj na neenzimsku komponentu.

Kako bi se potvrdio poremećaj oksidativne neravnoteže kao posledice nastanka oksidativnog stresa pod uticajem PCB, u našoj studiji izmereni su i nivoi MDA i ukupnog sadržaja SH grupa. Lipidna peroksidacija je uočena u jetri pacova tretiranih PCB u svim dozama osim u najnižoj primenjenoj dozi, dok je smanjeni sadržaj ukupnih SH grupa ukazao na oksidativnu degradaciju u jetri pacova tretiranih dozama PCB  $\geq 4$  mg/kg t.m/dan. Ovi rezultati potvrdili su razvoj oksidativnog stresa u jetri pacova prema već predloženom mehanizmu i u skladu su sa rezultatima koje su dobili Sekaran i sar. (2012) te rezultatima dobijenim za druge organe (prostata, testise i hipokampus) životinja izloženih PCB (Murugesan i sar, 2005; Selvakumar i sar, 2012).

Nakon što je utvrđen nastanak oksidativnog stresa u jetri pacova izloženih PCB, bilo je važno utvrditi da li je nastali efekat dozno-zavisan. Naime, postoje brojne studije koje su ispitivale nastanak oksidativnog stresa u jetri trovanih pacova, ali je u ovim studijama uglavnom korišćena jedna doza PCB. U našoj studiji je pak, korišćeno šest različitih doza PCB od neadekvatnog izbora doze, sa aspekta stvarne izloženosti ovim hemikalijama, i istovremeno omogućava ispitivanje postojanja veze doza-odgovor za izabrane parametre. Razlike u odnosu između upotrebljenih doza (0,5:1:1:2:4:8:16) i izmerenih koncentracija PCB u jetri (0,5:2,3:3,1:7,5:11,1:39) ukazuju na bioakumulaciju PCB u jetri tokom 28 dana dugog tretmana, pri čemu je stepen akumulacije rastao sa porastom primenjenih doza. Takođe, od izuzetnog značaja je i postojanje jake veze između primenjenih doza i izmerenih koncentracija PCB u odgovarajućem organu kako bi se moglo govoriti o doznoj zavisnosti ispitivanih parametara. Stoga je jaka pozitivna korelacija, utvrđena između eksternih i internih doza u jetri, omogućila dalja ispitivanja dozne zavisnosti. Doza-odgovor modelovanje prikupljenih podataka ukazalo je na doznu zavisnost svih ispitivanih parametara oksidativnog stresa. Najniža CEDL<sub>5</sub> izračunata za efekte na oksidativni status u jetri je doza izračunata za MDA (0,07 mg/kg t.m). Ipak, kako je hepatični nivo MDA veoma osetljiv parametar

oksidativne povrede, postavlja se pitanje da li njegovo povećanje za 5% od značaja za razvoj funkcionalnih promena u jetri.

Podaci prikupljeni u našoj studiji potvrdili su toksične efekte PCB primenjenih tokom 28 dana na jetru pacova, a takođe je dokazano i prisustvo oksidativnog stresa u jetri izloženih pacova. Uočeni su izraženiji toksični efekti na aktivnost enzimske komponente antioksidativne zaštite-CuZnSOD nego na GSH kao neenzimsku komponentu zaštite. Remećenje homeostaze bioelemenata, Zn i Se, svakako da ima izvesnu ulogu u uočenom razvoju oksidativnih poremećaja u jetri. Najniža izračunata vrednost za CEDL<sub>5</sub> u našoj studiji za efekte na jetru iznosila je 0,05 mg/kg t.m/dan i to za efekat porasta relativne mase jetre. Ova vrednost ipak je viša od najniže procenjene vrednosti NOAEL (0,033 mg/kg t.m/dan tokom 4 nedelje) za efekat PCB na indukciju mikrozomalnih enzima u jetri (Litterst i sar, 1972), kao i LOAEL vrednosti (0,005 mg/kg t.m/dan) procenjene u studiji na majmunima koji su bili izloženi različitim dozama Aroclor 1254 tokom 23 i 55 meseca za efekat na porast relativne mase jetre i imunološki odgovor na ovčije Er (Tryphonas i sar, 1991).

#### 5.2.4. Efekti na bubrege

Kao parametri funkcije bubrega pod uticajem šest različitih doza PCB ispitivani su relativna masa bubrega, te serumski nivoi kreatinina i uree. Nije uočen statistički značajan efekat PCB na relativnu masu bubrega, a nije utvrđena ni dozna zavisnost ovog parametra. Primena šest različitih doza PCB nije dovela ni do statistički značajnog efekta na serumske sadržaje kreatinina, a nije utvrđena dozna zavisnost ni za ovaj parametar. Serumski nivoi uree takođe nisu bili značajno promenjeni pod uticajem PCB, ali je u slučaju ovog parametra utvrđena dozna zavisnost i efekat povišenja ovog parametra za 5% pri dozi od 12,5 mg PCB/kg t.m/dan uz donju granicu pouzdanosti od 8,28 mg PCB/kg t.m/dan. Sinteza i ekskrecija uree, pa tako i njena serumska koncentracija, zavise od brojnih faktora poput funkcije jetre, unosa proteina i stepena

katabolizma proteina, kao i unosa vode i stepena glomerularne filtracije, dok serumski nivoi kreatinina odslikavaju gotovo isključivo funkciju bubrega odnosno stepen glomerularne filtracije. Stoga su serumski nivoi kreatinina bolji pokazatelji promena na bubrezima nego nivoi uree u serumu koji mogu bolje ukazati na efekte PCB u jetri. Ipak, uspostavljena jaka pozitivna korelacija između eksternih i internih doza (izmerenih koncentracija) u bubrezima, kao i uspostavljena dozna zavisnost uree govore u prilog činjenice da uticaj PCB na ureu donekle odslikava i uticaj ovih hemikalija na bubrege.

Ne postoji dovoljno literaturnih podataka vezanih za efekte PCB na histopatologiju i biohemijske parametre renalne funkcije, naročito ako se broj ovih studija uporedi sa brojem studija u kojima su ispitani hepatotoksični efekti PCB. Ipak, postoji izvestan broj studija u kojima je vršeno ispitivanje nefrotoksičnosti PCB. Andrews (1989) je zaključke o nefrotoksičnosti Aroclor 1254 doneo samo na bazi uočenog porasta mase bubrega, dok nije uočen statistički značajan efekat na sadržaj proteina u urinu, kao ni na ekskreciju fosfora i kalcijuma. U studiji na pacovima primena Aroclor 1254 u dozi od 25 mg/kg t.m./dan i.p. tokom 10 i 15 nedelja izazvala je histopatološke promene u bubrezima (Gray Jr. i sar, 1993). U studiji u kojoj su pacovi tretirani sa Aroclor 1254 u dozi od 10 mg/kg t.m./dan subakutano svakog drugog dana tokom 6 nedelja, kao i sa Aroclor 1221, uz isti eksperimentalni protokol, utvrđeno je značajno povećanje serumskih nivoa uree, kreatinina, kao i prisustvo histopatoloških promena bubrega (renalna korpuskularna atrofija, peritubularna vaskularna kongestija i dilatacija kortikalnih tubula) koje su bile izraženije u grupama tretiranih Aroclor 1254 smešom (Kutlu i sar, 2007). Može se pretpostaviti da bi se toksični efekti na bubrege odnosno značajne promene njihove relativne mase, kao i nivoa uree i kreatinina javili i pri dozama korišćenim u našoj studiji nakon nešto dužeg perioda ekspozicije koji bi doveo i do viših koncentracija PCB u bubrezima, dok uočeni dozno zavisni porast serumskih nivoa uree u našoj studiji ukazuju na moguće suptilne nefrotoksične



efekte PCB koji su počeli da se razvijaju nakon 4 nedelje izloženosti ovim dozama hemikalija.

Jedan od mogućih mehanizama kojima PCB ispoljavaju svoje toksične efekte svakako bi moglo biti remećenje oksidativnog statusa koje se u bubrezima javlja u uslovima trovanja PCB što je pokazano i u našoj studiji. Naime, uočeno je statistički značajno smanjenje nivoa ukupnih SH grupa od čak 42% u odnosu na kontrolnu grupu pri najvišoj dozi PCB, koje jasno ukazuje na oksidativna oštećenja u bubrezima pacova trovanih PCB. Do značajnog porasta nivoa MDA u bubrezima došlo je pri dozama višim od 1 mg PCB/ kg t.m/ dan. Za oba ispitivana parametra oksidativnog statusa dokazana je dozna zavisnost pri čemu su najniže vrednosti CED za 5% i 10% efekta dobijene za MDA, pa se može smatrati da do lipidne peroksidacije u bubrezima pacova dolazi već pri niskim dozama PCB. Indukcija oksidativnog stresa od strane PCB objašnjava se različitim mehanizmima. Pokazano je da PCB dovode do aktivacije mikrozomalne monooksigenaze koja je uključena u konverziju PCB u reaktivne metabolite kao što su hidroksilovani PCB; takođe PCB, posebno oni visoko hlorovani, mogu selektivno indukovati citohrom P450 koji dovode do hiperprodukcije ROS (Schelinger i sar, 2006). Takođe PCB mogu da utiču i na enzimске i neenzimске komponente antioksidativne zaštite u bubrezima, tako je u našoj studiji utvrđen statistički značajan pad aktivnosti CuZnSOD enzima pri najvišoj upotrebljenoj dozi PCB i uočeni pad bio je dozno zavisian. Kako je pri upotrebi PCB uočen i statistički značajan porast Zn (doze  $\geq 2$  mg/kg t.m/ dan) i utvrđen srednji stepen korelacije između ova dva parametra može se zaključiti da uticaj PCB na homeostazu Zn ima izvesnog uticaja na aktivnost ovog enzima. Svakako da do smanjenja aktivnosti ovog enzima pod uticajem PCB dolazi i preko drugih mehanizama. Katalaza je enzim koji svojom aktivnošću štiti SOD od dejstva  $H_2O_2$ , a čije smanjenje je takođe pokazano u uslovima trovanja PCB i objašnjeno smanjenim sadržajem NADPH do koga dolazi tokom izloženosti PCB, a koji je neophodan kao kofaktor ovog enzima (Twaroski i sar, 2001). U studiji u kojoj je Aroclor 1254 primenjivan u dozi od 2

mg/kg t.m/dan i.p. tokom 30 dana uočeno je smanjenje aktivnosti CAT, kao i aktivnosti enzima SOD (Banudevi i sar, 2006). Sa druge strane smanjenje aktivnosti SOD dovodi do akumulacije superoksidnog anjona koji potom dovodi do smanjenja aktivnosti CAT što sve doprinosi remećenju oksidativnog statusa u uslovima trovanja PCB.

Uticao PCB uočen je, u našoj studiji, i na nivoe GSH, pri čemu su doze od 0,5 do 8 mg PCB/kg t.m/dan dovele do povećanja sadržaja ovog antioksidansa u bubrezima, verovatno kao posledica povišenih nivoa ROS i odbrane organizma, dok je najviša doza pak, dovela do smanjenja GSH. Dokazana dozna zavisnost ovog parametra ukazala je na njegovo smanjenje kao dominantni efekat PCB. U već pomenutoj studiji Banudevi i sar. (2006) takođe je dokazano smanjenje nivoa GSH u bubrezima pacova, kao i smanjenje aktivnosti enzima Gpx, GR i povišen sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enzim GR je enzim koji održava intracelularne koncentracije redukovanog GSH te snižena aktivnost ovog enzima zajedno sa povećanom potrošnjom GSH može biti razlog smanjenja sadržaja GSH u uslovima trovanja PCB. Smanjeni nivoi GSH dovode do smanjenja aktivnosti enzima Gpx koji uz pomoć elektron donora GSH uklanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz organizma.

Može se zaključiti da su efekti koje PCB izaziva na komponente antioksidativne zaštite u organizmu međusobno zavisni i isprepletani. Ipak, na osnovu rezultata naše i drugih pomenutih studija uočava se da je i u bubrezima, kao i u jetri, efekat PCB više izražen na aktivnost enzimske komponente zaštite. Ovo potvrđuju i niske CED vrednosti izračunate za efekte na CuZnSOD, kao i jaka negativna korelacija utvrđena između aktivnosti CuZnSOD i nivoa MDA u bubrezima.

Nastanak ROS tokom izloženosti PCB objašnjava se i uticajem koji PCB ispoljavaju na ćelijsku signalizaciju. Naime, lipofilne supstance mogu se akumulirati u lipidnom dvosloju ćelijskih membrana i dovesti do remećenja njihove fluidnosti, ali i uticati na prisutne bioaktivne lipide (López-Aparicio i sar, 1997). U *in vitro* studiji ispitivana je sposobnost Aroclor 1248 i dva čista

kongenera PCB 77 i PCB 153 da izazovu promene u aktivnosti fosfolipaze D, enzima koji iz fosfatidilholina oslobađa slobodne masne kiseline (Fernández Santiago i sar, 2007). Studija je pokazala da Aroclor 1248 izaziva značajno dozno-zavisno povišenje aktivnosti ovog enzima u intaktnim ćelijama renalnih tubula, pri čemu je pokazano da su za ovaj efekat uglavnom odgovorni PCB kongeneri koji nisu slični dioksinima. Prethodne studije pokazale su da fosfolipaza D može biti uključena u intraćelijsku signalnu transdukciju čiji poremećaj dovodi do nastanka ROS (Voie i sar, 2000), pa ovo može biti još jedan od objašnjenja nefrotoksičnosti PCB, odnosno njihove sposobnosti da remete oksidativni status u bubrezima.

Nefrotoksičnost PCB može se dovesti u vezu sa toksičnim efektima PCB na štitastu žlezdu koji su pokazani u brojnim eksperimentalnim studijama, kao i u našoj studiji. Status funkcije štitaste žlezde umnogome utiče na funkciju bubrega i to kako direktno utičući na glomerularnu funkciju, tubularnu sekreciju i sposobnost reapsorpcije, rad pumpi i strukturu bubrega, tako i indirektno utičući na kariovaskularni sistem odnosno protok krvi kroz bubrege koji se u uslovima hipotireoidizma smanjuje (Den Hollander i sar, 2005). Nivoi kreatinina i uree takođe se nalaze pod uticajem tiroidnih hormona, jer ovi hormoni imaju uticaj na mišiće, bubrege, jetru i periferni metabolizam proteina. Takođe je pokazano da u uslovima hipotireoidizma dolazi do poremećaja oksidativnog statusa u pravcu nastanka oksidativnog stresa (Yilmaz i sar, 2003). Salama i sar. (2012) uočili su značajno uvećane nivoe uree i kreatinina, te patološke promene u glomerulima i delovima tubula, kao i uvećane nivoe MDA u bubrezima pacova kojima je eksperimentalno bio izazvan hipotireoidizam. Stoga bi nastanak hipotireoidizma u uslovima trovanja PCB mogao biti još jedan od mogućih mehanizama njihove nefrotoksičnosti.

### 5.2.5. Efekti na štitastu žlezdu

Kao što je već pomenuto PCB se smatraju endokrinim ometačima i njihov efekat na štitastu žlezdu već je pokazan u brojnim studijama. U našoj studiji ispitan je efekat PCB na posmatrane parametre funkcije štitaste žlezde, kao i na relativnu masu ovog organa. Utvrđeno je dozno-zavisno smanjenje relativne mase štitaste žlezde koje bi moglo ukazivati na hipotrofiju u uslovima trovanja ovom hemikalijom. Takođe, uočeno je smanjenje sadržaja hormona štitaste žlezde, kako vezanih tako i slobodnih oblika T3 i T4 uz utvrđenu jaku korelaciju između slobodnih i vezanih formi. Interesantno je da su nivoi hormona T4 bili sniženi u svim grupama tretiranih pacova (najviša doza dovela je do drastičnog sniženja aktivnosti ovog hormona na svega 20% aktivnosti u kontrolnoj grupi), dok su nivoi hormona T3 takođe bili dozno zavisno smanjeni pod uticajem PCB, ali je to smanjenje bilo statistički značajno tek pri dozama  $\geq 2$  mg PCB/kg t.m./dan. U brojnim studijama na životinjama pokazano je da PCB smanjuju nivo T4 hormona. U studiji koja je ispitivala efekat različitih doza Aroclor 1254 (4, 8, 16, 32 mg/kg/dan) primenjenih oralnom gavažom tokom 7 dana na tiroidne hormone uočen je drastičan pad serumskih nivoa T4 i FT4 (Martin i Klaassen, 2010). Rezultati ove studije u skladu su sa rezultatima naše studije, pri čemu je deo primenjenih doza u našoj studiji bio niži, ali je period izloženosti bio duži (28 dana naspram 7 dana). Hemikalije, poput PCB, koje indukuju hepaticni mikrozomalni enzim UDP-glukuroniltransferazu su od posebnog značaja jer mnoge dovode do remećenja homeostaze T4 hormona. Smatra se da ove hemikalije dovode do poremećaja u ravnoteži T4 povećavajući glukuronidaciju T4 hormona što predstavlja značajan metabolički put razgradnje T4 u pacova (Liu i sar, 1995). Međutim, u studiji koju su sproveli Kato i sar (2004) pacovima *Wistar* i *Gunn* soja (mutiranog soja *Wistar* pacova koji ima deficijenciju enzima UDP-glukuroniltransferaze) davano je 100 mg/kg t.m./dan komercijalne mešavine PCB Kanechlor-500, tokom 4 dana kako bi se ispitala veza između smanjenja serumskog nivoa T4 hormona i porasta

aktivnosti UDP-glukuroniltransferaza u jetri. Utvrđen je drastičan pad ukupnog i slobodnog T4 hormona u serumu u oba soja pacova, iako je povišena aktivnost enzima UDP-glukuroniltransferaze utvrđena samo u pacova *Wistar* soja. Zaključeno je da ovaj mehanizam delom učestvuje u smanjenju nivoa T4 hormona pod uticajem PCB, ali da svakako nije jedini. Neki od mehanizama koji takođe mogu doprineti smanjenju sadržaja T4 hormona su uticaj PCB na hipotalamusno-hipofizno-tiroidnu osovinu (Khan i Hansen, 2003), te uticaj na povećanje aktivnosti estrogen sulfotransferaze koja efikasno katalizuje sulfataciju ovog hormona (Kester i sar, 1999). Još jedan od potencijalnih mehanizama redukcije totalnih serumskih nivoa T4 od strane PCB i uopšte mehanizma njihovog ometanja funkcije štitaste žlezde mogao bi se dešavati preko njihovih metabolita. Naime, PCB se metabolišu do hidrosilovanih PCB u jetri, a ovi metaboliti mogu interferirati sa transportom tireoidnih hormona i inhibirati njihovu sulfataciju (Wang i James, 2006). Pokazano je da hidrosilovani PCB mogu da se vežu za transtiretin koji je ciljno mesto vezivanja T4 što je dokazano na pacovima, polarnim medvedima i ljudima (Gutleb i sar, 2010).

Dok su nivoi hormona T4 bili sniženi pri svim primenjenim dozama, nivoi hormona T3 bili su sniženi samo u grupama koje su tretirane dozama 2, 4, 8 i 16 mg/kg t.m/dan, pri čemu je nivo hormona T3 u grupi koja je primala najvišu dozu PCB i dalje predstavljao 80% kontrolnih nivoa, pa se može reći da je uticaj PCB na hormon T3 bio manje izražen nego na hormon T4. Dramatičan pad nivoa T4 i umereni efekat na nivoe T3 po primeni Aroclor 1254 su u skladu sa rezultatima drugih studija (Hood i sar, 1999; Martin i Klaassen, 2010; Vansell i Klaassen, 2002). Varijabilno smanjenje nivoa T3 može se objasniti činjenicom da Aroclor 1254 na različit način indukuje aktivnost UDP-glukuroniltransferaze u mikrozomima jetre, kada je u pitanju aktivnost ovog enzima prema T4 i T3 hormonu (Hood i Klaassen, 2002). Naime, utvrđeno je da Aroclor 1254 povećava aktivnost ovog enzima kada je supstrat T4 za čak 430%, dok je uticaj Aroclor 1254 na aktivnost ovog enzima kada je supstrat bio T3 izostao.

Nemogućnost Aroclor 1254 da indukuje aktivnost ovog enzima prema T3 dokazana je i u *in vivo* studiji u kojoj je uočeno odsustvo povećane bilijarne ekskrecije T3-glukuronida pod uticajem PCB (Vansell i Klaassen, 2002). Ove razlike mogu se objasniti postojanjem različitih izoformi UGT enzima. Predložen je još jedan mehanizam, odnosno enzim čija bi aktivnost mogla biti razlog razlika u uticaju PCB na T4 i T3 hormone. Enzimi 5'-dejodinaze odgovorni su za konverziju T4 hormona u T3 hormon u različitim tkivima. Tako, 5'-dejodinaza I se primarno nalazi u jetri, bubrezima i štitastoj žlezdi, dok 5'-dejodinaza II je dominantna u smeđem adipoznom tkivu, mozgu i hipofizi. Hood i Klaassen (2000) smatrali su da upravo konverzija T4 u T3, katalizovana enzimima tipa I i/ili II dejodinaza spoljašnjeg prstena može objasniti dobijene razlike u efektima PCB. Međutim, u studiji u kojoj su primenjivane različite doze PCB (25, 50, 100, 200 ppm PCB) tokom 7 dana utvrđeno je da je ukupna aktivnost ovih enzima u brojnim tkivima pod uticajem PCB bila čak snižena, a ne povišena kao što je očekivano. Stoga su autori predložili drugi mehanizam prema kome relativno stabilne nivoe T3 održava *de novo* sinteza ovog hormona u samoj žlezdi. Zaista je i utvrđeno da je preuzimanje joda u štitastu žlezdu, prvi korak u *de novo* sintezi tireodnih hormona, povišeno u pacova koji su tretirani PCB (Liu i sar, 1995). Smanjena aktivnost enzima 5'-dejodinaze je, u studiji u kojoj je ispitivana sposobnost različitih doza TCDD da izazovu promene u statusu hormona štitaste žlezde, objašnjena kompenzatornim odgovorom organizma na smanjenje nivoa T4 s obzirom na to da je smanjenje aktivnosti enzima uočeno nekoliko dana nakon što je već došlo do smanjenja nivoa T4 hormona (Viluksela i sar, 2004).

U pogledu efekata PCB na TSH, rezultati eksperimentalnih studija uglavnom su kontradiktorni. Neke studije pokazale su povećanje nivoa TSH kao odgovor na smanjeni sadržaj T4 (Fisher i sar, 2006), dok su drugi autori ukazali da PCB ne ispoljavaju efekat na ovaj hormon hipofize (Kato i sar, 2004; Martin i Klaassen, 2010). Pojedine studije su čak ukazale da efekti koje PCB izazivaju kod životinja u razvoju ne odgovaraju u potpunosti efektima koji bi se

razvili u uslovima deficijencije tireoidnih hormona. Tako je studija koju su sprovedeli Zoeller i sar (2000) pokazala je da iako su PCB doveli do smanjenja nivoa tireoidnih hormona ispod granice detekcije, t.m. tretiranih pacova nisu bile smanjenje, za razliku od studija gde su kao endokrini ometači korišćene druge hemikalije. Stoga je pretpostavljeno da se neki pojedinačni kongeneri PCB mogu vezivati za receptore tireodnih hormona (TR) i delovati kao TR agonisti. U studiji koja je sprovedena na pacovima i koja je uključivala nekoliko različitih kongenera PCB predložen je dvostepeni proces prema kome AhR ligandi odnosno dioksinima slični PCB indukuju CYP1A1 enzim koji potom deluje na PCB koji nemaju sličnosti sa dioksinima stvarajući metabolite koji aktiviraju TR (Gauger i sar, 2007). Ovim efektima PCB može se objasniti izostanak efekta na TSH. U našoj studiji nije ispitivan nivo hormona TSH, ali se izostanak efekta PCB na nivoe ovog hipofiznog hormona može pretpostaviti s obzirom da nije dobijeno povećanje relativne mase štitaste žlezde do kojeg bi svakako došlo u uslovima povećanog sadržaja TSH. Naprotiv, uočeno je smanjenje relativne mase štitaste žlezde, koje bi se moglo objasniti direktnim efektima PCB na štitastu žlezdu (ATSDR, 2000).

Vrlo niske CED vrednosti izračunate za nivoe T4 hormona ( $CE_{D5}=0,542$  mg/kg t.m/dan uz donju granicu pouzdanosti 0,504 mg/kg t.m/dan) kao i niska procenjena NOAEL vrednost za ovaj efekat ( $<0,5$  mg/kg t.m/dan) u skladu su sa literaturnim podacima (ATSDR, 2000; Chen i sar, 2015) i ukazuju da PCB remete homeostazu funkcije štitaste žlezde pri vrlo niskim dozama, što imajući u vidu značaj hormona štitaste žlezde za pravilno funkcionisanje celog organizma potvrđuje izuzetan toksikološki značaj ovih hemikalija. Upravo se brojni toksični efekti PCB uočeni u ovoj i drugim studijama, poput efekata na rast i razvoj, neurotoksičnih efekata, efekata na bubrege i drugi mogu tumačiti upravo njihovim uticajem na ravnotežu tireoidnih hormona koji se javlja, kako je pokazano u našoj studiji, već pri niskim dozama ovih hemikalija.

### 5.3. TOKSIČNI EFEKTI SMEŠE KADMIJUMA I POLIHLOROVANIH BIFENILA

Toksični metali i perzistentne organske supstance su od velikog toksikološkog i ekotoksikološkog značaja, a efekte ovih supstanci kada se u organizam unesu istovremeno, što je i realan scenario izloženosti u životnoj sredini, teško je predvideti na osnovu podataka o toksičnosti pojedinačnih supstanci. Postoji konsenzus u oblasti toksikologije smeša da primena koncepta u kome se rizik od hemikalija procenjuje za svaku hemikaliju pojedinačno nosi sa sobom opasnost od potcenjivanja rizika koje hemikalije predstavljaju po zdravlje ljudi i životnu sredinu (EC, 2009).

Pored profesionalne izloženosti Cd i PCB i opšta populacija je izložena povećanom unosu ovih toksičnih agenasa posebno putem hrane. Iako se po svojim fizičko-hemijskim osobinama Cd i PCB veoma razlikuju, ove hemikalije ispoljavaju donekle slične efekte na jetru, bubrege, štitastu žlezdu, hematopoetski i imunološki sistem, koji se delimično mogu objasniti nastankom oksidativnog stresa i interakcijama sa bioelementima, kao što je i potvrđeno u našoj studiji. Međutim, toksični efekti i mehanizmi toksičnosti smeša Cd i PCB su nedovoljno istraženi, te je ova studija imala za cilj da utvrdi karakter i intenzitet ispitivanih efekata smeše u odnosu na toksične efekte pojedinačno primenjenih toksičnih agenasa na ispitivanim organima i sistemima organa pacova. U cilju boljeg sagledavanja efekata zajedničke ekspozicije Cd i PCB, u eksperimentu je korišćeno ukupno 9 različitih doznih kombinacija koje su uključile i kombinacije relativno niskih doza ovih toksičnih agenasa, jer u proceni rizika pri izloženosti smešama, ključni problem predstavlja činjenica da se efekti smeše mogu javiti i pri izloženosti niskim dozama komponenata smeše, čak nižim od NOAEL/BMD (Kortenkamp i sar, 2007).



### 5.3.1. Efekti na prirast telesne mase

Gotovo sve primenjene smeše su dovele do statistički značajno manjeg prirasta t.m. pacova u odnosu na grupe koje su primale samo jednu supstancu. U studiji koja je sprovedena na zamorcima primena doza od 10 mg Cd/kg t.m. i 10 ili 50 mg PCB/kg t.m. tokom 12 nedelja i u dva različita svetlosna režima (16h svetlo/8 h mrak i 8h svetlo/16 h mrak) nije dovela do promena t.m, koja nije uočena ni pri primeni pojedinačnih supstanci (Włostowski i sar, 2008). Za razliku od navedenih ispitivanja, u našoj studiji dokazano je značajno smanjenje prirasta t.m. primenom svih pojedinačnih doza Cd (korišćenih u okviru doznog režima smeša) u odnosu na kontrolnu grupu, kao i značajno smanjenje prirasta t.m. pri davanju svih pojedinačnih doza PCB u odnosu na kontrolne vrednosti. Efekat smeše na prirast t.m. bio je intenzivniji od efekta koji su ispoljile pojedinačne supstance, iako nije moguće dati odgovor da li ove supstance doprinose nastanku smanjenja prirasta t.m. potpuno odvojenim mehanizmima, odnosno delujući aditivno, ili stupaju u interakcije na različitim nivoima, odnosno deluju sinergistički. Naime, kako nije utvrđena dozna zavisnost ovog parametra za obe hemikalije, ne može se utvrditi da li ove supstance stupaju u interakciju kada je u pitanju njihov direktan efekat na prirast t.m.

### 5.3.2. Efekti na hematološke parametre

Primenjenje smeše Cd i PCB su ispoljile statistički značajne promene sadržaja svih ispitivanih hematoloških parametara, ali ne u svim doznim režimima. Primena smeša najviše doze Cd i svih doza PCB dovela je do statistički značajnog smanjenja broja Er dok je isti efekat na sadržaj Hb konstatovan pri primeni najviše doze Cd i najviše doze PCB. Ovi uočeni efekti smeša Cd i PCB od posebnog su značaja ako se u obzir uzme činjenica da pojedinačna primena Cd ili PCB nije ispoljila efekat na broj Er, kao ni na sadržaj Hb u krvi tretiranih pacova. Već je navedeno da Cd može doprineti smanjenju broja Er i sadržaja Hb u krvi različitim mehanizmima poput razvoja

oksidativnog stresa u krvi, smanjenja koncentracije Fe u krvi, te smanjene produkcije eritropoetina u bubrezima (Horiguchi i sar, 2011). Pomenuti mehanizmi mogli bi se pretpostaviti i za PCB s obzirom na to da je u ovoj studiji dokazan uticaj PCB na sadržaj Fe i biomarkere funkcije bubrega. Istovremena primena ovih hemikalija dovela je i do statistički značajnog pada nivoa Fe u krvi u odnosu na nivo u krvi pacova tretiranih pojedinačnim supstancama, čime se može objasniti smanjenje broja Er i sadržaja Hb u krvi. Interakcije na nivou ADME procesa, koje su u novijoj literaturi označene kao toksikokinetičke interakcije, nisu dokazane, s obzirom na to da nivoi Cd u krvi grupa koje su istovremeno primale obe hemikalije nisu promenjeni u odnosu na nivo u grupama koje su primale samo Cd. Nažalost, ne može se govoriti o uticaju istovremene primene Cd i PCB na nivo PCB u krvi budući da u našoj studiji nije ispitivan nivo PCB u krvi. Za efekte pojedinačnog davanja Cd ili PCB na Er i Hb nije utvrđena dozna zavisnost, te se ni ne može primeniti koncept ispitivanja razlike u nagibima kriva doza-odgovor u cilju utvrđivanja prisustva interakcija. Ovi rezultati su u skladu sa empirijskim dokazima dobijenim u studijama ispitivanja efekta smeša hemikalija sličnog mehanizma toksičnosti, a koje upućuju na mogućnost javljanja toksičnih efekata smeše i pri primeni doza koje se pojedinačno smatraju „sigurnim“ (EFSA, 2008; Kortenkamp i sar, 2007).

Primena smeše Cd i PCB je kao i pojedinačno davanje ovih toksičnih agenasa, dovela do smanjenja broja Tr, pri čemu je to smanjenje bilo izraženije. Kako je pri pojedinačnim tretmanima dokazana dozna zavisnost smanjenja broja Tr bilo je moguće ispitati prisustvo interakcija hemikalija, ali je utvrđen aditivni efekat na nivou ovog parametra.

Daljom analizom hematoloških parametara utvrđeno je da smeše Cd i PCB dovode do statistički značajnog smanjenja broja Leu u odnosu na smanjenje broja ovih krvnih elemenata pri pojedinačnoj primeni PCB. Dobijeni nalazi ukazuju na aditivni efekat Cd i PCB na Leu. Suprotno PCB, pojedinačno davanje Cd izazvalo je dozno zavisni imunomodulatorni efekat u pravcu porasta broja Leu te se u ovom slučaju ne može govoriti o njihovom aditivnom

efektu. Može se zaključiti da je pri istovremenoj primeni ovih hemikalija, efekat PCB preovladao efekat Cd na nivou Leu. Treba istaći da je ovo jedini slučaj kada smo dobili dva različita efekta ispitivanih agenasa Cd i PCB u zavisnosti od toga da li je efekat smeše posmatran u odnosu na Cd ili u odnosu na PCB. Literaturni podaci ukazuju da PCB izazivaju smanjenje broja Leu indukcijom oksidativnog stresa u krvi, te apoptozom monocita i timocita (Narayanan i sar, 1998; Shin i sar, 2000; Tan i sar, 2003), dok izloženost Cd rezultira porastom broja Leu usled razvoja inflamacije (Yamano i sar, 2000). Međutim, poznato je da Cd izaziva i nastanak oksidativnog stresa u krvi, kao i apoptozu (Buha i sar, 2012; Mladenovic i sar, 2014, Thevenod i Lee, 2013) te se može pretpostaviti da je i ovaj mehanizam dejstva Cd od značaja za tumačenje efekta smeše na Leu.

Studija u kojoj je korišćena smeša PCB, PCDD i PCDF, kao i smeša MeHg, PCB, PCDD i PCDF nije dovela do efekata na izolovanim Leu pacova (Omara i sar, 1997). Sa druge strane, u studiji na pacovima izloženih kompleksnoj smeši od 18 različitih perzistentnih organskih zagađivača i metala (između ostalih i PCB i Cd) tokom 70 dana, najviše doze su izazvale efekat na imunološki sistem, odnosno smanjenu proliferaciju T limfocita u slezini (Wade i sar, 2002a). Uticaj na NK ćelije bio je dvofazan, inicijalni porast konstatovan je pri nižim dozama smeše, dok su najviše doze koje su sadržale 1 mg PCB/kg t.m./dan i 0,7 mg CdCl<sub>2</sub>/kg t.m./dan, dovele do smanjenja broja NK ćelija ispod kontrolnih vrednosti što je u skladu sa rezultatima naše studije. Međutim, imunotoksični efekat uočen u našoj studiji ne mora biti siguran uzročnik povećane osetljivosti na infekcije.

### 5.3.3. Efekti na jetru

Utvrđeno je da istovremena primena PCB i Cd izaziva toksične efekte na jetru pacova. Naime, primena smeše u svim doznim opsezima dovela je do statistički značajnog povećanja relativne mase jetre, u odnosu na mase jetre pacova tretiranih samo jednom hemikalijom. Smeše Cd i PCB su izazvale

smanjenje sadržaja albumina u serumu eksperimentalnih životinja što je uočeno i pri primeni pojedinačnih hemikalija, i za taj efekat je dokazana aditivnost. Dobijeni rezultati ukazuju da oba ispitivana agensa davana pojedinačno ili u smeši negativno utiču na sintetsku funkciju jetre.

Interesantni su podaci dobijeni za efekat smeša Cd i PCB na enzime AST, ALT i ALP u serumu, kao biomarkere funkcije jetre, s obzirom na to da je uočeno povećanje aktivnosti AST (aditivan efekat Cd i PCB), izostanak efekta na aktivnost ALT i čak smanjenje aktivnosti ALP pod datim eksperimentalnim uslovima. Uočeni efekti se bitno razlikuju i od efekata samog Cd koji nije izazvao promene aktivnosti ovih enzima i od PCB koji su samo pri najvišoj dozi doveli do porasta aktivnosti AST. Smeša je prema tome ispoljila uticaj na aktivnost ovih enzima i u dozama koje su se pojedinačno mogle smatrati bezbednim, što je u skladu sa zabrinutošću koji je izrazila Evropska komisija u svojoj strategiji o tome da čak i izloženost niskim dozama kompleksnih „koktela zagađivača“ prisutnih u vazduhu, vodi, hrani i različitim proizvodima tokom dužeg perioda može imati značajan uticaj na zdravlje (CEC, 2003). Ipak, postavlja se pitanje koliko se uočeni porast aktivnosti AST zaista može smatrati biološki značajnim pokazateljem oštećenja jetre. Naime, smatra se da tek porast AST vrednosti za 10X u odnosu na kontrolne praćen porastom aktivnosti ALT i uz poremećen odnos ALT/AST koji postaje  $>1$  ukazuje na oštećenja hepatocita (Ceriotti i sar, 2010). U našoj studiji porast AST pri primeni smeše nije bio veći od 2X, nije bio praćen porastom aktivnosti ALT a odnos ALT/AST ostao je manji od 1 u svim tretiranim grupama. S obzirom na činjenicu da je ALP Zn zavisni enzim, uočeno smanjenje aktivnosti ALP u serumu može se objasniti smanjenim nivoima Zn dokazanim u jetri pacova.

Međutim, imajući u vidu da su smeše ispoljile efekat na relativnu masu jetre kao i na nivoe albumina u serumu, ali i donekle i na nivoe enzima jetre, može se zaključiti da smeša Cd i PCB ispoljava hepatotoksične efekte pri čemu su ti efekti izraženiji nego pri primeni pojedinačnih hemikalija. Rezultati naše studije u skladu su sa rezultatima studije u kojoj je ispitivan uticaj subhronične

primene smeše organohlorinih hemikalija i metala na funkciju jetre (Wade i sar, 2002a). Primena ove kompleksne smeše takođe je dovela do hepatotoksičnih efekata i to u najvišim dozama (1000 veće od procenjenih MRL odnosno NOAEL doza pojedinačnih komponenata) što je procenjeno na osnovu povećanja relativne mase i aktivnosti mikrozomalnih enzima jetre, kao i uočenih histopatoloških promena. Naši rezultati pak nisu u saglasnosti sa ispitivanjima Wlostowskog i sar (2008) koji su utvrdili da pri istovremenoj izloženosti PCB ne povećava toksičnost Cd u jetri, a da Cd, čak smanjuje PCB-indukovanu hepatotoksičnost. Smanjenje hepatoksičnosti PCB u prisustvu Cd objašnjeno je sposobnošću Cd da stimuliše sintezu MT koji su značajna komponenta antioksidativnog sistema zaštite, kao i dokazanom inhibicijom aktivnosti CYP P450 enzima, odgovornog za metabolizam PCB i produkciju ROS, pod uticajem Cd (Elbekai i El-Kadi, 2004). Tri puta više doze PCB (50 mg/kg t.m/dan naspram 16 mg/kg t.m/dan kao najviše doze korišćene u našoj studiji), duži period izloženosti smeši (12 nedelja naspram 4 nedelje izloženosti u našoj studiji), upotreba različitih eksperimentalnih životinja (zamorci naspram pacova), različiti fotoperiodi (16 h svetlost/8 h tama naspram 12 h svetlost/12 h tama u našoj studiji) mogli bi biti razlog različitih efekata smeše PCB i Cd na jetru pokazanih u ovim dvema studijama. U navedenoj studiji je dokazano i da PCB dovode do smanjenje akumulacije Cd za razliku od rezultata naše studije u kojoj su primenjene smeše Cd i PCB dovele do povećanja koncentracija oba toksična agensa u jetri u odnosu na koncentracije određene pri primeni pojedinačnih supstanci.

Jače izražen toksični efekat na jetru pri primeni smeša uočen u našoj studiji bi se upravo mogao i tumačiti povećanim sadržajem Cd i PCB dokazanim u jetri pacova tretiranih smešama. Povećani sadržaj ispitivanih hemikalija u jetri nakon njihove istovremene primene je teško objasniti budući da se ove supstance ne apsorbuju, niti distribuiraju istim mehanizmima. Međutim, ove činjenice ne isključuju mogućnost specifičnih toksikokinetičkih interakcija Cd i PCB i njihov međusobni uticaj na obim i brzinu apsorpcije u

digestivnom traktu i/ili distribuciju u jetru, na šta ukazuju i istraživanja u kojima je pokazano da fenantren povećava preuzimanje Cd u amfipodama (Gust i Fleeger, 2005).

Smatra se da je oksidativni stres jedan od značajnih mehanizama hepatotoksičnosti obe ispitivane hemikalije što je pokazano i u našoj studiji, pa je stoga ispitano kako smeše deluju na oksidativni status u jetri odnosno da li ove supstance stupaju u interakcije kada su u pitanju parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Ispitivanje oksidativnog statusa u jetri ukazalo je da istovremena primena ovih hemikalija ispoljava aditivni efekat na nivoe MDA u jetri dovodeći do značajno viših izmerenih vrednosti MDA u pacova tretiranih smešama nego pojedinačnim hemikalijama. Sa druge strane, nivoi ukupnih –SH grupa u jetri bili su statistički značajno niži u odnosu na nivoe ukupnih –SH grupa izmerenih pri pojedinačnoj primeni PCB, što se može objasniti potentnijim efektom koji Cd ispoljava na nivoe –SH grupa, jer se može i direktno vezivati za ove grupe. Ipak, kako u našoj studiji nije dokazana zavisnost nivoa ukupnih –SH grupa od doza Cd, ni efekat koji je pokazan u smešama ne može se sa sigurnošću pripisati Cd. Uočeno povećanje nivoa MDA i smanjenje nivoa ukupnih –SH pri primeni smeša moglo bi se bar delom, pripisati statistički značajno povećanom nivoe Fe u jetri uočenom pri primeni smeša u gotovo svim doznim opsezima. Ispitivanjem parametara antioksidativne zaštite, dobijene su značajno niže aktivnosti CuZnSOD kod životinja trovanih smešom Cd i PCB, u odnosu na one koje su primale iste dozne nivoe pojedinačnih supstanci, što bi se moglo dovesti u vezu sa uočenim smanjenjem koncentracije Zn u jetri pacova tretiranih smešama koje nije bilo uočeno pri pojedinačnom tretmanu ovim hemikalijama. Ipak, o tačnim mehanizmima koji dovode do povećanja ovog efekta, kao i eventulanim interakcijama između ove dve supstance ne može se za sada govoriti, posebno imajući u vidu da nije dokazana zavisnost doze Cd i ovog parametra. Treba istaći da je uticaj smeša na GSH bio intenzivniji nego uticaj pojedinačnih supstanci, a analizom nagiba krivih doza smeše-odgovor dokazan je aditivan

efekat Cd i PCB na GSH. Svakako da se preko aditivnog efekta koji je pokazan za ove supstance na sadržaj GSH, može delom objasniti i aditivni efekat Cd i PCB dokazan na nivou lipidne peroksidacije u jetri, a samim tim i njihov aditivan efekat na sadržaj albumina kao parametra funkcije jetre.

Može se zaključiti da je primena smeša Cd i PCB izazvala izraženije hepatotoksične efekte u odnosu na pojedinačnu primenu Cd ili PCB, pri čemu nisu uočene toksikodinamičke interakcije ovih supstanci na ispitivanim parametrima funkcije jetre, kao ni na ispitivanim parametrima oksidativnog statusa jetre, što ipak ne isključuje mogućnost interakcija ovih supstanci na toksikokinetičkom nivou.

#### 5.3.4. Efekti na bubrege

Za razliku od jetre, nakon primene smeše nije došlo do promene koncentracija Cd, niti PCB u bubregu u odnosu na koncentracije izmerene nakon primene pojedinačnih supstanci, te se sve eventualne interakcije ovih supstanci na nivou bubrega mogu tumačiti toksikodinamskim interakcijama.

Nesumnjivo je da je bubreg ciljni organ dejstva Cd, posebno pri produženoj izloženosti, a oštećenja bubrega se karakterišu promenama na nivou glomerularne filtracije i poremećenom funkcijom tubularne reapsorpcije, prvenstveno u proksimalnom delu tubula (Nordberg, 2009). Sa druge strane, nefrotoksičnost PCB nije dovoljno ispitana. U našoj studiji pokazana je nefrotoksičnost obe supstance, pa je očekivan razvoj nefrotoksičnosti i pri njihovoj istovremenoj primeni. Zaista, istovremena primena svih ispitivanih doza Cd i PCB izazvala je statistički značajan porast sadržaja uree u serumu u odnosu na grupe životinja koje su pojedinačno tretirane Cd ili PCB, dok je do značajnog porasta nivoa kreatinina i relativne mase bubrega došlo primenom smeše najviše doze Cd (5 kg/kg t.m/dan) i svih ispitivanih doza PCB u odnosu na grupe tretirane samo jednom supstancom. Treba istaći da je primena smeša Cd i PCB dovela do pojave novih efekata na funkciju bubrega i to na relativnu

masu bubrega i kreatinin, parametre koji nisu bili promenjeni pri pojedinačnom tretmanu ispitivanim toksičnim agensima. Kao veoma značajan efekat navodimo i efekat koji su ispoljile smeše na sadržaj uree, s obzirom na to da je tokom pojedinačne aplikacije do povećanja sadržaja uree u serumu došlo samo primenom doze Cd od 5 mg/kg t.m/dan. Može se zaključiti da su pod datim eksperimentalnim uslovima uočeni efekti koji ukazuju na znatno izraženiji efekat smeša na bubrege u odnosu na efekte pojedinačnih supstanci. Ispitivanjem interakcija dokazan je sinergistički efekat na ureu, dok se za druga dva parametra ne može govoriti o karakteru interakcija jer nije dokazana zavisnost doza Cd/PCB-efekat.

Dobijeni efekti smeša na bubrege su u skladu sa rezultatima dobijenim u drugim studijama u kojima je ispitivan efekat smeša organohlorinih jedinjenja i metala. Tako je primena najviših doza kompleksne smeše u već navedenoj studiji sprovedenoj na pacovima dovela do povećanja relativne mase bubrega pacova, kao i do promena u izvesnim parametrima u serumu (nivo mokraćne kiseline i azota u vidu uree u serumu) koji mogu ukazivati na poremećaje bubrežne funkcije (Wade i sar, 2002a). U nedavnoj studiji u kojoj je ispitivana toksičnost smeše BDE209 i Cd na pacovima utvrđeno je povećanje stepena oštećenja bubrega pri koekspoziciji Cd i BDE209 u odnosu na promene nastale nakon izlaganja pojedinačnim komponentama (Ćurčić, 2015).

Posmatrajući efekat smeše Cd i PCB na parametre oksidativnog stresa u bubregu, kao mehanizma toksičnosti koji učestvuje u nefrotoksičnosti obe ispitivane supstance, zapaža se da smeša ima sinergistički uticaj na nivoe MDA u bubrezima. Primena smeša dovela je do statistički značajnog smanjenja ukupnih -SH grupa u odnosu na nivoe izmerene pri primeni pojedinačnih supstanci, iako ne u svim doznim režimima. Analizom nagiba krivih dokazan je sinergizam ukoliko se poređenje vrši sa efektom pojedinačno datog PCB, dok je aditivnost dokazana pri poređenju sa efektima pojedinačno primenjenih doza Cd. Ovaj nalaz upućuje na zaključak da je za iskazani efekat smeše na sadržaj



ukupnih -SH grupa najvećim delom odgovoran Cd za koji se i zna da u organizmu reaguje sa -SH grupama različitih endogenih supstanci.

Sinergistički efekat smeše dokazan je na aktivnost enzima CuZnSOD u svim doznim opsezima smeše. Uočeno statistički značajno smanjenje aktivnosti ovog enzima pri svim doznim režimima smeše može se delom objasniti dejstvom smeša na homeostazu Cu u bubrezima, s obzirom na to da je uočeno povećanje nivoa Cu u bubrezima pacova koji su u kombinacijama primali najviše doze PCB uz Cd u odnosu na pacove koji su primali samo Cd. Povećan sadržaj Cu se može objasniti njegovom interakcijom sa Cd (Moullis, 2010) koji može da ga istisne iz aktivnog centra enzima CuZnSOD, a literaturni podaci ukazuju i na uticaj PCB na homeostazu ovog bioelementa (Lai i sar, 2013). Ipak, ovaj efekat ne može biti odgovoran za synergizam uočen za aktivnost CuZnSOD pri svim doznim nivoima ispitivane smeše, pa se mogu pretpostaviti i drugi mehanizmi regulisanja aktivnosti ovog enzima pri istovremenoj izloženosti ovim agensima. Može se pretpostaviti da Cd i PCB mogu da utiču na aktivnost CuZnSOD i indirektno uticajem na enzim CAT, koja štiti SOD od dejstva H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Banudevi i sar, 2006 ; Renugadevi i Prabu, 2010).

U pogledu sadržaja GSH u bubrezima pacova tretiranih smešama, statistički značajno smanjenje dokazano je u odnosu na sve primenjene doze PCB, kao i u odnosu na najvišu dozu Cd. Sinergizam između Cd i PCB na nivou GSH u bubregu potvrđen je pri poređenju nagiba kriva doza smeše-GSH odgovor sa nagibom krive Cd doza-GSH odgovor, ali samo pri primeni najviše doze PCB u smešama, dok je pri ostalim dozama uočen aditivan efekat. Međutim, ukoliko uporedimo krive doza smeše-GSH odgovor sa krivom doza PCB-GSH odgovor uočava se synergizam u svim doznim opsezima smeše. Može se zaključiti da je Cd potentniji kada je u pitanju efekat smanjenja GSH u bubrezima odnosno da se i pri dejstvu smeša rezerve ovog peptida prvenstveno troše direktnim dejstvom Cd na GSH odnosno njegovim vezivanjem za -SH grupu GSH, ali i indirektno preko uticaja na aktivnost enzima GR i G6PD (Renugadevi i Prabu, 2010). Literaturni podaci potvrđuju štetni efekat ovih

PCB na GSH (Banudevi i sar, 2006), a u našoj studiji pokazano je da se PCB uključuju u složene mehanizme održavanja nivoa GSH u bubrezima samo pri visokim dozama.

#### 5.3.5. Efekti na štitastu žlezdu

Rezultati dela studije koja se odnosila na efekat smeše Cd i PCB na nivo hormona T3 i T4 u serumu su ukazali da smeše ovih supstanci ispoljavaju izraženije efekte na nivo hormona štitaste žlezde nego što čine pojedinačne supstance. Efekti različitih doznih kombinacija Cd i PCB na ispitivane hormone štitaste žlezde upoređeni su sa efektima samog Cd i utvrđen je sinergizam u svim doznim režimima smeše, pri čemu su interakcije bile najizraženije kada je primenjena najviša doza PCB. Ova zapažanja podržana su i rezultatima dobijenim za prirast t.m. koji predstavlja jedan od pokazatelja funkcije štitaste žlezde, jer je do najizrazitijeg pada prirast t.m. došlo upravo pri upotrebi najviše doze PCB u smešama. Efekti istovremene izloženosti Cd i PCB upoređeni su i sa efektima izloženosti samo PCB. Za hormon T3 je takođe utvrđen sinergistički efekat pri istovremenoj primeni svih doznih režima smeše, dok je za hormon T4 sinergizam utvrđen samo pri ko-tretmanu sa najvišom dozom Cd. Ovaj fenomen se može objasniti izraženijim efektom PCB na hormon T4 o čemu je bilo reči u poglavlju 5.2.5. Sinergističko delovanje metala i perzistentnog organskog zagađivača na nivo tireoidnih hormona uočeno je i pri primeni smeše Pb i BDE-209 u zebričama (Zhu i sar, 2014). Rezultati studije koja je ispitivala efekte smeše Cd i BDE-209 na tireoidnu funkciju u pacova takođe je ukazala na izraženije toksične efekte smeše na nivo hormona T3 i T4 u serumu u odnosu na efekte pojedinačno primenjenih supstanci (Curcic i sar, 2012). Smeša 16 organohloriniranih jedinjenja, Pb i Cd nakon 70 dana oralne primene takođe je dovela je do promena u funkcionisanju hipotalamusno-hipofizno-tireoidne osovine na šta su ukazali poremećaji u nivoima T3, T4 i TSH hormona u serumu, histomorfologiji štitaste žlezde i u metabolizmu hormona štitaste

žlezde u jetri (Wade i sar, 2002b). Crofton i sar. (2005) ispitivali su efekte smeše 18 polihalogenovanih ugljovodonika u studiji na pacovima i dokazali sinergističke efekte na nivoe T4 hormona.

Funkcija štitaste žlezde regulisana je osetljivim mehanizmima u samoj štitastoj žlezdi, ali i mehanizmima povratne sprege regulisanim na nivou hipotalamusno-hipofizne osovine, te ekstratireoidnim mehanizmima koji uključuju vezivanje za transportne proteine u serumu, periferni metabolizam hormona i njihovu razgradnju (Boas i sar, 2012). Stoga su mehanizmi koji mogu biti uključeni u ometanje funkcije štitaste žlezde do kog dovode ove dve hemikalije brojni i kompleksni, baš kao i potencijalna mesta njihovih interakcija. Literaturni podaci ukazuju na jetru kao organ u kojem se dešavaju različiti procesi koji kontrolišu funkciju štitaste žlezde. Tako je pokazano da Cd utiče na 5'D-I, enzim u jetri koji vrši konverziju T4 u T3 (Gupta i Kar, 1999), a rezultati dobijeni u delu naše studije u kojem su ispitivani efekti Cd na nivoe T3 i T4 hormona takođe su potvrdili ove navode. Stoga bi se jetra, a pre svega lipidna peroksidacija ćelijskih membrana za koje se ovaj enzim mora vezati da bi ispoljio svoju funkciju (Chaurasia i sar, 1996) mogla pretpostaviti kao mesto mogućih sinergističkih interakcija ove dve hemikalije, tim pre što je pokazano da obe supstance izazivaju porast MDA u jetri. Ipak, u našoj studiji utvrđeno je odsustvo interakcija ove dve supstance na nivou MDA nivoa u jetri, kao i odsustvo sinergizma u delovanju Cd i PCB na sve ispitivane parametre funkcije jetre, te se jetra može isključiti kao relevantno mesto interakcija ove dve hemikalije kada je u pitanju funkcija štitaste žlezde. Oslanjajući se na ovo zapažanje, može se pretpostaviti da se sinergističke interakcije ove dve supstance dešavaju upravo na nivou same štitaste žlezde što donekle potvrđuju i rezultati dobijeni za relativne mase štitaste žlezde u našoj studiji, budući da je u grupama pacova tretiranih smešama uočeno smanjenje relativne mase štitaste žlezde koje ukazuje na razvoj hipotrofije žlezde.

Sagledavajući izuzetan značaj homeostaze funkcije štitaste žlezde za pravilan rast i razvoj organizma sa jedne strane i dobijene rezultate koji ukazuju

na sinergistički toksični efekat ispitivanih hemikalija na funkciju ove žlezde, može se reći da ova studija ukazuje na važnost problema istovremene izloženosti supstancama koje su dokazani endokrini ometači, s obzirom na to da se efekti njihove istovremene primene ne mogu u potpunosti proceniti na osnovu rezultata dobijenih u studijama u kojima su ispitivane pojedinačne supstance.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja pojedinačne primene Cd ili PCB, kao i njihove smeše doneti su sledeći zaključci.

Zaključci koji se odnose na ispitivanje toksičnosti šest različitih doza Cd su sledeći:

- Izloženost pacova opsegu doza Cd od 0,3 do 10 mg/kg t.m/dan, koje odgovaraju opsegu doza od izloženosti opšte populacije pa do visoke profesionalne izloženosti, dovela je do toksičnih efekata na rast pacova, hematološke parametre, funkciju jetre, bubrega i štitaste žlezde pacova. Prirast t.m. pacova bio je snižen pod uticajem doza Cd  $\geq 1,25$  mg/kg t.m/dan. Intoksikacija Cd dovela je do toksičnih efekata na krv tako što je izazvala porast broja Leu u svim primenjenim dozama i smanjenje nivoa Tr do koga je došlo samo pri primeni najviše doze. Efekat Cd na broj Er i sadržaj Hb je izostao. Rezultati koji se odnose na ispitivanje uticaja Cd na jetru, pokazali su povećanje relativne mase jetre čak i pri najnižim primenjenim dozama Cd što može ukazati na nastanak hepatomegalije, dok se smanjenje nivoa albumina u serumu uočeno pri primeni svih doza Cd može tumačiti smanjenom sintetskom funkcijom jetre. Nefrotoksičnost Cd manifestovala se povećanim nivoima uree i kreatinina u serumu pri primeni najviših doza. Takođe, dokazana je sposobnost Cd da remeti funkciju štitaste žlezde dovodeći do smanjenja nivoa T3 i T4 hormona u serumu. Budući da je do sniženja nivoa hormona T3 došlo i pri primeni najnižih doza Cd dok su snižene nivoe hormona T4 izazvale doze  $\geq 1,25$  mg Cd/kg t.m/dan, može se zaključiti da su procesi regulacije nivoa ovih hormona koji se dešavaju izvan štitaste žlezde osetljiviji na dejstvo Cd od procesa koji se odigravaju u samoj žlezdi.

- Ispitivanje mehanizama toksičnosti Cd ukazalo je na značajnu ulogu oksidativnog stresa u dokazanim toksičnim efektima Cd na funkciju jetre, bubrege, ali i na funkciju štitaste žlezde. Kadmijum je u jetri izazvao smanjenje

nivoa GSH, kao i akumulaciju Fentonovog metala Fe čime se može objasniti i uočeni porast lipidne peroksidacije u ovom organu. Osim oksidativnog stresa i interakcije Cd sa bioelementima, porast broja Leu ukazuje na inflamaciju kao još jedan mehanizam hepatotoksičnosti ovog metala. Sposobnost Cd da dovodi do poremećaja funkcije štitaste žlezde može se takođe, bar delom, objasniti dokazanim nastankom oksidativnog stresa u jetri, kao i smanjenim sadržajem Se u jetri koji je kofaktor enzima koji vrši konverziju hormona T4 u T3 u jetri. Rezultati ove teze ukazuju i na značajno mesto oksidativnog stresa u nefrotoksičnosti Cd i to uticajem Cd na enzimsku komponentu antioksidativne zaštite citosolni enzim CuZnSOD.

- Utvrđena je jaka korelacija između eksternih doza Cd i internih doza Cd u krvi, jetri i bubrezima pacova. Za brojne parametre ispitivane u ovoj studiji dokazana je zavisnost od doze Cd: prirast t.m, broj Leu i Tr, sadržaj Hb, nivo albumina i aktivnost enzima AST u serumu, nivoi MDA i GSH u jetri, nivoi uree i kreatinina u serumu, svi ispitivani parametri oksidativnog stresa u bubrezima, nivoi hormona štitaste žlezde u serumu. Veoma niske BMDL5 vrednosti dobijene pri primeni Cd za efekat povećanja broja Leu u krvi, smanjenja sadržaja GSH u jetri, smanjenja aktivnosti enzima CuZnSOD u bubrezima i smanjenja nivoa T3 hormona u serumu upućuju da bi se ovi efekti Cd mogli smatrati kritičnim. Izračunate BMDL5 vrednosti u najvećem broju slučajeva bile su niže od NOAEL vrednosti procenjenih u ovoj studiji, kao i NOAEL vrednosti dobijenih u drugim studijama, čime ova studija otvara mogućnost izračunavanja nižih referentnih doza pri predviđanju zdravstvenih rizika od izloženosti Cd. Naročito treba istaći niske BMDL5 vrednosti dobijene za efekat Cd na nivoe T3, s obzirom na to da su efekti na štitastu žlezdu i generalno hormonalni status od izuzetnog značaja za pravilan rast, razvoj i funkcionisanje organizma.

Bazirano na rezultatima ispitivanja toksičnosti šest ispitivanih doza PCB mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Izloženost pacova opsegu doza od 0,5 do 16 mg PCB/kg t.m./ dan, koje odgovaraju opsegu doza od izloženosti opšte populacije pa do visoke profesionalne izloženosti, dovela je do toksičnih efekata na prirast t.m, hematološke parametre, funkciju jetre, bubrega i štitaste žlezde pacova. Primena svih doza PCB dovela je do smanjenja prirasta t.m. pacova. Primena PCB dovela je do toksičnih efekata na krv, što je pokazano smanjenim brojem Leu i Tr pri primeni najviše doze PCB, dok je efekat na broj Er i Hb, kao i pri primeni Cd, izostao. Hepatotoksičnost PCB dokazana je povećanjem relativne mase jetre i pri najnižim dozama PCB, kao i povećanjem nivoa AST u serumu pod uticajem najviše doze. Nefrotoksičnost PCB je ispoljena dozno zavisnim porastom nivoa uree u serumu. Efekat PCB kao ometača funkcije štitaste žlezde i to u smislu hipotireoidizma, dokazan je izraženim padom nivoa T4 posebno pri visokim dozama, te umerenim smanjenjem nivoa T3, kao i hipotrofijom štitaste žlezde.

- Ispitivanja mehanizama toksičnosti PCB ukazuju na ulogu oksidativnog stresa u hepatotoksičnosti PCB, pri čemu su, nasuprot Cd, PCB ispoljili izražen uticaj na enzimsku komponentu sistema antioksidativne zaštite CuZnSOD koji se bar delom može objasniti smanjenjem sadržajem Zn u jetri. Dobijeni rezultati ukazuju da se i nefrotoksičnost PCB može delom objasniti oksidativnim oštećenjima lipida i proteina u bubrezima kao rezultat smanjene aktivnosti CuZnSOD. Sposobnost PCB da izazovu poremećaj funkcije štitaste žlezde, odnosno hipotireoidizam, se pre svega objašnjava njihovim direktnim uticajem na štitastu žlezdu, a ovom efektu može doprineti i nastanak oksidativnog stresa u jetri.

- Utvrđena je jaka korelacija između eksternih doza PCB i internih doza u jetri i bubrezima pacova. Za brojne parametre ispitivane u ovoj studiji dokazana je zavisnost od doze PCB: broj Leu i Tr, relativna masa jetre, nivo albumina i aktivnost enzima AST u serumu, svi ispitivani parametri

oksidativnog stresa u jetri, nivo uree u serumu, svi ispitivani parametri oksidativnog stresa u bubrezima, relativna masa štitaste žlezde, nivoi hormona štitaste žlezde u serumu. Predloženi kritični efekti intoksikacije PCB su smanjenje broja Leu u krvi, smanjenje aktivnosti enzima CuZnSOD u jetri i bubrezima, kao i smanjenje nivoa T4 hormona u serumu. Uočeni efekti pri niskim dozama PCB potvrđeni su NOAEL vrednostima procenjenim na osnovu dobijenih rezultata kao i izračunatim BMDL5 dozama koje su niže od nekih do sada prihvaćenih NOAEL vrednosti što ukazuje da je dosadašnji rizik od ovih hemikalija možda potcenjen.

Na osnovu rezultata ispitivanja devet različitih doznih opsega smeše Cd i PCB mogu se doneti sledeći zaključci:

- Ispitivanje toksičnih efekata devet različitih doznih kombinacija Cd i PCB pokazalo je da smeša ima izraženiji uticaj na prirast t.m. u odnosu na pojedinačno primenjene supstance. Uočena je i veća hematotoksičnost smeša u odnosu na pojedinačne supstance što potvrđuje intenzivnije smanjenje nivoa Leu i Tr u poređenju sa efektom pojedinačnih supstanci, dok je smeša Cd i PCB dovela i do statistički značajnog smanjenja broja Er i sadržaja Hb, efekata koji nisu ni uočeni pri davanju pojedinačnih supstanci. Izraženija hepatotoksičnost smeše u odnosu na pojedinačne supstance potvrđena je većim povećanjem relativne mase jetre, kao i izraženijim efektom smeše na koncentraciju albumina i aktivnost AST enzima u serumu. Rezultati dobijeni za relativnu masu bubrega, kao i za parametre funkcije bubrega u serumu svedoče o većoj toksičnosti smeše na bubrege. Dokazan je i veći potencijal smeše Cd i PCB da ometa funkciju štitaste žlezde o čemu svedoči manja relativna mase štitaste žlezde, kao i niži nivoi T3 i T4 hormona u serumu.

- Uloga oksidativnog stresa u hepatotoksičnosti i nefrotoksičnosti dokazana je i za smešu Cd i PCB koja je dovela do izraženijeg efekta na oksidativni status i u jetri i u bubrezima u odnosu na efekat pojedinačnih supstanci. Zajedničko davanje Cd i PCB se ispoljilo i izraženijim efektom na



sadržaj Fe u jetri i Cu u bubrežima i to u smislu povećanja, dok je u jetri zabeleženo veće smanjenje nivoa Zn. Izraženiji oksidativni stres uočen u jetri i bubrežima uočen nakon primene smeše može biti objašnjenje povećanog efekta smeše na funkciju štitaste žlezde, s obzirom na to da je jetra mesto ekstratireoidnih mehanizama regulacije nivoa hormona štitaste žlezde u serumu.

- Rezultati ispitivanja interakcija komponenata smeše pri delovanju na definisane parametre ukazuju da Cd i PCB stupaju u interakcije na nivou bubrega i štitaste žlezde. Dokazani sinergizam na nivou funkcije bubrega može, bar delom, biti objašnjen sinergizmom Cd i PCB na nivou parametara oksidativnog statusa u tom organu. Sinergizam je bio najizraženiji pri primeni najviših doza komponenata smeše, što ukazuje i na doznu zavisnost ovih interakcija. Sinergizam uočen pri delovanju smeše na funkciju štitaste žlezde može se objasniti interakcijama komponenata na nivou same žlezde, budući da na nivou parametara oksidativnog stresa u jetri nisu dokazane interakcija.

\*\*\*

Sprovedena studija doprinosi boljem sagledavanju toksičnih efekata pri subakutnoj ekspoziciji različitim dozama Cd ili PCB i ukazuje da i veoma niske doze Cd odnosno PCB mogu izazvati izvesne toksične efekte na ispitivane organe koji se bar delom mogu objasniti nastankom oksidativnog stresa i remećenjem homeostaze bioelemata uočenim u jetri i bubrežima. Na bazi procene odnosa doza-odgovor i izračunatih BMDL5 vrednosti utvrđeni su kritični toksični efekti ovih supstanci, a kako su izračunate BMDL5 vrednosti u izvesnom broju slučajeva niže od prihvaćenih NOAEL vrednosti, ova studija skreće pažnju na mogućnost potcenjivanja zdravstvenih rizika ovih hemikalija.

Ova doktorska disertacija je dala poseban doprinos ispitivanju toksikologije smeša, problematici koja je do sada nedovoljno ispitivana, a poslednjih godina dobija sve više na aktuelnosti, budući da je i čovek

svakodnevno izložen „koktelu“ hemikalija. Naročito treba istaći da je ovo studija u kojoj su, prema našim saznanjima, po prvi put uporedno analizirani efekti pojedinačno primenjenih Cd ili PCB sa efektima njihove smeše u različitim doznim opsezima. Dokazano je da smeša Cd i PCB ispoljava veću toksičnost na brojne ispitivane parametre, a na nivou bubrega i štitaste žlezde dokazan je sinergistički efekat ovih agenasa. Smeša je čak ispoljila toksične efekte na broj Er i sadržaj Hb, odnosno efekte koji se nisu ni javili pri tretiranju pacova pojedinačnim dozama Cd ili PCB. Rezultati ove doktorske disertacije stoga dokazuju da primena koncepta u kome se rizik od hemikalija procenjuje za svaku hemikaliju pojedinačno nosi sa sobom opasnost od potcenjivanja rizika koje smeše hemikalija predstavljaju po zdravlje ljudi i životnu sredinu što otvara ogromno polje daljih istraživanja.

## 7. LITERATURA

- Agudo, A., Goñi, F., Etxeandia, A., Vives, A., Millán, E., López, R., Amiano, P., Ardanaz, E., Barricarte, A., Dolores Chirlaque, M., Dorronsoro, M., Jakszyn, P., Larrañaga, N., Martínez, C., Navarro, C., Rodríguez, L., José Sánchez, M., José Tormo, M., González, C.A., 2009. Polychlorinated biphenyls in Spanish adults: Determinants of serum concentrations. *Environ. Res.* 109, 620–628.
- Al-Waeli, A., Pappas, A.C., Zoidis, E., Georgiou, C.A., Fegeros, K., Zervas, G., 2012. The role of selenium in cadmium toxicity: Interactions with essential and toxic elements. *Br. Poult. Sci.* 53, 817–827.
- Aly, H.A.A., Domènech, O., 2009. Aroclor 1254 induced cytotoxicity and mitochondrial dysfunction in isolated rat hepatocytes. *Toxicology* 262, 175–183.
- Andrews, J.E., 1989. Polychlorinated biphenyl (aroclor 1254) induced changes in femur morphometry calcium metabolism and nephrotoxicity. *Toxicology* 57, 83–96.
- Asagba, S.O., Eriyamremu, G.E., Adaikpoh, M.A., Ezeoma, A., 2004. Levels of lipid peroxidation, superoxide dismutase, and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in some tissues of rats exposed to a Nigerian-like diet and cadmium. *Biol. Trace Elem. Res.* 100, 75–86.
- ATSDR, 2004. Assessment of Joint Toxic Action of Chemical Mixtures. Agency Toxic Subst. Dis. Regist.
- ATSDR, 2010. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR POLYCHLORINATED BIPHENYLS (PCBs). Agency Toxic Subst. Dis. Regist.
- ATSDR, 2012. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR CADMIUM. Agency Toxic Subst. Dis. Regist.
- ATSDR - Priority List of Hazardous Substances [WWW Document], n.d. URL <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/> (accessed 11.12.15).
- Axelrad, D.A., Goodman, S., Woodruff, T.J., 2009. PCB body burdens in US women of childbearing age 2001-2002: An evaluation of alternate summary metrics of NHANES data. *Environ. Res.* 109, 368–378.
- Badiei, K., Nikghadam, P., Mostaghni, K., 2009. Effect of cadmium on thyroid function in sheep. *Comp. Clin. Pathol.* 18, 255–259.
- Badisa, V.L.D., Latinwo, L.M., Odewumi, C.O., Ikediobi, C.O., Badisa, R.B., Ayuk-Takem, L.T., Nwoga, J., West, J., 2007. Mechanism of DNA damage by cadmium and interplay of antioxidant enzymes and agents. *Environ. Toxicol.* 22, 144–151.
- Baker, R.G., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2011. NF- $\kappa$ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.* 13, 11–22.
- Banudevi, S., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Vignesh, C., Aruldas, M.M., Arunakaran, J., 2006. Role of  $\alpha$ -tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCB exposed male albino rats. *Food Chem. Toxicol.* 44, 2040–2046.
- Bao, L., Gao, C., Li, M., Chen, Y., Lin, W., Yang, Y., Han, N., Bian, H., Zhu, M., Wang, J., 2013. Biomonitoring of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls in transgenic Arabidopsis using the mammalian pregnane X receptor system: A role of pectin in pollutant uptake. *PLoS ONE* 8.

- Beebe, L.E., Fornwald, L.W., Riggs, C.W., Anderson, L.M., 1995. Suppression of pulmonary p4502b and induction of hepatic, intestinal and kidney p4501a-1 and 1a-2 in the ah-responsive and non-responsive mouse by aroclor 1254. *Xenobiotica* 25, 541-551.
- Beischlag, T.V., Morales, J.L., Hollingshead, B.D., Perdew, G.H., 2008. The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18, 207-250.
- Benchmark Dose Technical Guidance | Office of Science Advisor | US EPA [WWW Document], n.d. URL <http://www.epa.gov/raf/publications/benchmarkdose.htm> (accessed 9.2.15).
- Berenbaum, M.C., 1985. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J Theor Biol* 114, 413-431.
- Bergkvist, C., Berglund, M., Glynn, A., Wolk, A., Åkesson, A., 2015. Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and risk of myocardial infarction - A population-based prospective cohort study. *Int. J. Cardiol.* 183, 242-248.
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Main, K.M., 2012. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355, 240-248.
- Bonefeld-Jorgensen, E.C., Andersen, H.R., Rasmussen, T.H., Vinggaard, A.M., 2001. Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* 158, 141-153.
- Boujelben, M., Ghorbel, F., Vincent, C., Makni-Ayadi, F., Guermazi, F., Croute, F., El-Feki, A., 2006. Lipid peroxidation and HSP72/73 expression in rat following cadmium chloride administration: Interactions of magnesium supplementation. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 437-443.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bruscalupi, G., Massimi, M., Devirgiliis, L.C., Leoni, S., 2009. Multiple parameters are involved in the effects of cadmium on prenatal hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* 23, 1311-1318.
- Brzóska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem. Toxicol.* 39, 967-980.
- Brzoska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Pilat-Marcinkiewicz, B., Sawicki, B., 2003. Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol Alcohol* 38, 2-10.
- Buha, A., Bulat, Z., Dukić-Ćosić, D., Matović, V., 2012. Effects of oral and intraperitoneal magnesium treatment against cadmium-induced oxidative stress in plasma of rats. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 63, 247-254.
- Bulat, Z.P., Djukić-Ćosić, D., Maličević, Ž., Bulat, P., Matović, V., 2008. Zinc or magnesium supplementation modulates Cd intoxication in blood, kidney, spleen, and bone of rabbits. *Biol. Trace Elem. Res.* 124, 110-117.
- Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C., Landriscina, C., 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 179, 37-50.

- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, C., 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: The possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 346, 171–179.
- Casey, A.C., Berger, D.F., Lombardo, J.P., Hunt, A., Quimby, F., 1999. Aroclor 1242 inhalation and ingestion by Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health - Part A* 56, 311–342.
- CDC Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services, 2009. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. CDC, Atlanta, SAD.
- CEC. 2003. A European Environment and Health Strategy. Communication from the Commission to the Council, the European Parliament and the European Economics and Social Committee, final. Brussels, Belgium: Commission of the European Communities.
- Cerioti, F., Henny, J., Queraltó, J., Ziyu, S., Özarda, Y., Chen, B., Boyd, J.C., Panteghini, M., 2010. Common reference intervals for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT) in serum: Results from an IFCC multicenter study. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48, 1593–1601.
- Chauhan, K.R., Kodavanti, P.R.S., McKinney, J.D., 2000. Assessing the role of ortho-substitution on polychlorinated biphenyl binding to transthyretin, a thyroxine transport protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162, 10–21.
- Chaurasia, S.S., Gupta, P., Kar, A., Maiti, P.K., 1996. Free radical mediated membrane perturbation and inhibition of TYPE-I iodothyronine 5'-monodeiodinase activity by lead and cadmium in rat liver homogenate. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 765–770.
- Chen, H., Zhang, X., Jia, X., Li, Q., Su, Q., Wang, W., Liu, Z., 2015. Thyroid disrupting effects of polychlorinated biphenyls in ovariectomized rats: A benchmark dose analysis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 733–740.
- Chen, X., Zhu, G., Jin, T., Zhou, Z., Gu, S., Qiu, J., Xiao, H., 2012. Cadmium stimulates the osteoclastic differentiation of RAW264.7 Cells in presence of osteoblasts. *Biol. Trace Elem. Res.* 146, 349–353.
- Chevrier, J., Eskenazi, B., Holland, N., Bradman, A., Barr, D.B., 2008. Effects of exposure to polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides on thyroid function during pregnancy. *Am. J. Epidemiol.* 168, 298–310.
- Chu, I., Poon, R., Yagminas, A., Lecavalier, P., Håkansson, H., Valli, V.E., Kennedy, S.W., Bergman, Å., Seegal, R.F., Feeley, M., 1998. Subchronic toxicity of PCB 105 (2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl) in rats. *J. Appl. Toxicol.* 18, 285–292.
- Chu, I., Villeneuve, D.C., Yagminas, A., LeCavalier, P., Poon, R., Feeley, M., Kennedy, S.W., Seegal, R.F., Hakansson, H., Ahlborg, U.G., Valli, V.E., 1994. Subchronic toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in the rat. I. Clinical, biochemical, hematological, and histopathological changes. *Fundam. Appl. Toxicol.* 22, 457–468.
- Cohen, J., 1988. Statistical power analysis for behavioural sciences. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates. Inc.:[sn].
- Consonni, D., Sindaco, R., Bertazzi, P.A., 2012. Blood levels of dioxins, furans, dioxin-like PCBs, and TEQs in general populations: A review, 1989-2010. *Environ. Int.* 44, 151–162.

- Cox, M.B., Miller, C.A., 2004. Cooperation of heat shock protein 90 and p23 in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Cell Stress Chaperones* 9, 4–20.
- Craft, E.S., DeVito, M.J., Crofton, K.M., 2002. Comparative responsiveness of hypothyroxinemia and hepatic enzyme induction in long-evans rats versus C57BL/6J mice exposed to TCDD-like and phenobarbital-like polychlorinated biphenyl congeners. *Toxicol. Sci.* 68, 372–380.
- Crinnion, W.J., 2011. Polychlorinated biphenyls: Persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences. *Altern. Med. Rev.* 16, 5–13.
- Crofton, K.M., 2004. Developmental disruption of thyroid hormone: Correlations with hearing dysfunction in rats. *Risk Anal.* 24, 1665–1671.
- Crofton, K.M., Craft, E.S., Hedge, J.M., Gennings, C., Simmons, J.E., Carchman, R.A., Carter Jr., W.H., DeVito, M.J., 2005. Thyroid-hormone-disrupting chemicals: Evidence for dose-dependent additivity or synergism. *Environ. Health Perspect.* 113, 1549–1554.
- Ćurčić, M., Janković, S., Jačević, V., Stanković, S., Vučinić, S., Durgo, K., Bulat, Z., Antonijević, B., 2012. Combined effects of cadmium and decabrominated diphenyl ether on thyroid hormones in rats. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 63, 255–262.
- Ćurčić M. Subakutna toksičnost smeše dekabromovanog difeniletra i kadmijuma kod pacova. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet. 2015.
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A.R., Munters, E., Artois, T.J., Nawrot, T., Vangronsveld, J., Smeets, K., 2010. Cadmium stress: An oxidative challenge. *BioMetals* 23, 927–940.
- De Coster, S., van Larebeke, N., 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J. Environ. Public Health* 2012, 713696.
- Demenesku, J., Mirkov, I., Ninkov, M., Popov Aleksandrov, A., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Kataranovski, M., 2014. Acute cadmium administration to rats exerts both immunosuppressive and proinflammatory effects in spleen. *Toxicology* 326, 96–108.
- Den Hollander, J.G., Wulkan, R.W., Mantel, M.J., Berghout, A., 2005. Correlation between severity of thyroid dysfunction and renal function. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 62, 423–427.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342.
- Djukić-Ćosić, D., Ćurčić Jovanović, M., Plamenac Bulat, Z., Ninković, M., Maličević, Z., Matović, V., 2008. Relation between lipid peroxidation and iron concentration in mouse liver after acute and subacute cadmium intoxication. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 22, 66–72.
- Djukić-Ćosić, D., Ninković, M., Maličević, Z., Matović, V., Soldatović, D., 2007. Effect of magnesium pretreatment on reduced glutathione levels in tissues of mice exposed to acute and subacute cadmium intoxication: A time course study. *Magnes. Res.* 20, 177–186.

- Dobrila-Dintinjana, R., Vanis, N., Dintinjana, M., Radić, M., 2012. Etiology and oncogenesis of pancreatic carcinoma. *Coll. Antropol.* 36, 1063–1067.
- Dreiem, A., Rykken, S., Lehmler, H.-J., Robertson, L.W., Fonnum, F., 2009. Hydroxylated polychlorinated biphenyls increase reactive oxygen species formation and induce cell death in cultured cerebellar granule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 306–313.
- Dudley, R.E., Klaassen, C.D., 1984. Changes in hepatic glutathione concentration modify cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72, 530–538.
- EC European Commission, 2009. State of the Art Report on Mixture Toxicity. European Union.
- EC European Commission, 2012. Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. European Union.
- Eichler, T., Ma, Q., Kelly, C., Mishra, J., Parikh, S., Ransom, R.F., Devarajan, P., Smoyer, W.E., 2006. Single and combination toxic metal exposures induce apoptosis in cultured murine podocytes exclusively via the extrinsic caspase 8 pathway. *Toxicol. Sci.* 90, 392–399.
- EFSA European Food Safety Authority, 2013. International Framework Dealing with Human Risk Assessment of Combined Exposure to Multiple Chemicals. *EFSA Journal*, 11(7):3313. [69 pp.]
- Elabbas, L.E., Herlin, M., Finnilä, M.A., Rendel, F., Stern, N., Trossvik, C., Bowers, W.J., Nakai, J., Tuukkanen, J., Viluksela, M., Heimeier, R.A., Åkesson, A., Håkansson, H., 2011. In utero and lactational exposure to Aroclor 1254 affects bone geometry, mineral density and biomechanical properties of rat offspring. *Toxicol. Lett.* 207, 82–88.
- Elbekai, R.H., El-Kadi, A.O.S., 2004. Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated gene expression by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology* 202, 249–269.
- 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 Chem. Toxicol.* 42, 1563–1571.
- Eljarrat, E., Caixach, J., Rivera, J., 2003. A comparison of TEQ contributions from PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in sewage sludges from Catalonia, Spain. *Chemosphere* 51, 595–601.
- Ellman, G.L., 1959. The sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70–77.
- El-Sokkary, G.H., Nafady, A.A., Shabash, E.H., 2010. Melatonin administration ameliorates cadmium-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of rat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 456–463.
- EPA, Office of Water. Water Quality Standards Database. Available from: <http://www2.epa.gov/eg/toxic-and-priority-pollutants-under-clean-water-act>
- Esteban, J., Elabbas, L.E., Borg, D., Herlin, M., Åkesson, A., Barber, X., Hamscher, G., Nau, H., Bowers, W.J., Nakai, J.S., Viluksela, M., Håkansson, H., 2014. Gestational and lactational exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 modulates retinoid homeostasis in rat offspring. *Toxicol. Lett.* 229, 41–51.

- Everett, C.J., Frithsen, I., Player, M., 2011. Relationship of polychlorinated biphenyls with type 2 diabetes and hypertension. *J. Environ. Monit.* 13, 241–251.
- Fernández Santiago, M., López-Aparicio, P., Recio, M.N., Pérez-Albarsanz, M.A., 2007. Effect of Aroclor 1248 and two pure PCB congeners on phospholipase D activity in rat renal tubular cell cultures. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21, 68–75.
- Fisher, J.W., Campbell, J., Muralidhara, S., Bruckner, J.V., Ferguson, D., Mumtaz, M., Harmon, B., Hedge, J.M., Crofton, K.M., Kim, H., Almekinder, T.L., 2006. Effect of PCB 126 on hepatic metabolism of thyroxine and perturbations in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat. *Toxicol. Sci.* 90, 87–95.
- Fonnum, F., Mariussen, E., Reistad, T., 2006. Molecular mechanisms involved in the toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and brominated flame retardants (BFRs). *J. Toxicol. Environ. Health - Part A* 69, 21–35.
- Fortier, M., Omara, F., Bernier, J., Brousseau, P., Fournier, M., 2008. Effects of physiological concentrations of heavy metals both individually and in mixtures on the viability and function of peripheral blood human leukocytes in vitro. *J. Toxicol. Environ. Health - Part Curr. Issues* 71, 1327–1337.
- Fournier, M., Dégas, V., Colborn, T., Omara, F.O., Denizeau, F., Potworowski, E.F., Brousseau, P., 2000. Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence Estuary and the Arctic populations. *Toxicol. Lett.* 112–113, 311–317.
- Friberg, L., 1948. Proteinuria and kidney injury among workers exposed to cadmium and nickel dust. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 30, 32–36.
- Fujishiro, H., Okugaki, S., Yasumitsu, S., Enomoto, S., Himeno, S., 2009. Involvement of DNA hypermethylation in down-regulation of the zinc transporter ZIP8 in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 195–201.
- Fujiwara, Y., Lee, J.-Y., Tokumoto, M., Satoh, M., 2012. Cadmium renal toxicity via apoptotic pathways. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 1892–1897.
- Galán, A., Troyano, A., Vilaboa, N.E., Fernández, C., De Blas, E., Aller, P., 2001. Modulation of the stress response during apoptosis and necrosis induction in cadmium-treated U-937 human promonocytic cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1538, 38–46.
- Gauger, K.J., Giera, S., Sharlin, D.S., Bansal, R., Iannacone, E., Zoeller, R.T., 2007. Polychlorinated biphenyls 105 and 118 form thyroid hormone receptor agonists after cytochrome P4501A1 activation in rat pituitary GH3 cells. *Environ. Health Perspect.* 115, 1623–1630.
- Gauger, K.J., Kato, Y., Haraguchi, K., Lehmler, H.-J., Robertson, L.W., Bansal, R., Zoeller, R.T., 2004. Polychlorinated biphenyls (PCBs) exert thyroid hormone-like effects in the fetal rat brain but do not bind to thyroid hormone receptors. *Environ. Health Perspect.* 112, 516–523.
- Gennings, C., Carter, W.H., Carchman, R.A., Teuschler, L.K., Simmons, J.E., Carney, E.W., 2005. A unifying concept for assessing toxicological interactions: Changes in slope. *Toxicol. Sci.* 88, 287–297.



- Girotti, M.J., Khan, N., McLellan, B.A., 1991. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J. Trauma - Inj. Infect. Crit. Care* 31, 32-35.
- Glauert, H.P., Tharappel, J.C., Lu, Z., Stemm, D., Banerjee, S., Chan, L.S., Lee, E.Y., Lehmler, H.-J., Robertson, L.W., Spear, B.T., 2008. Role of oxidative stress in the promoting activities of PCBs. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 247-250.
- Gobe, G., Crane, D., 2010. Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. *Toxicol. Lett.* 198, 49-55.
- Goyer, R.A., Liu, J., Waalkes, M.P., 2004. Cadmium and cancer of prostate and testis. *BioMetals* 17, 555-558.
- Gray Jr., L.E., Ostby, J., Marshall, R., Andrews, J., 1993. Reproductive and Thyroid Effects of Low-Level Polychlorinated Biphenyl (Aroclor 1254) Exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.* 20, 288-294.
- Gunnarsson, D., Svensson, M., Selstam, G., Nordberg, G., 2004. Pronounced induction of testicular PGF2 $\alpha$  and suppression of testosterone by cadmium - Prevention by zinc. *Toxicology* 200, 49-58.
- Gupta, P., Chaurasia, S.S., Maiti, P.K., Kar, A., 1997. Cadmium induced alterations in extrathyroidal conversion of thyroxine to triiodothyronine by type-I iodothyronine 5'-monodeiodinase in male mouse. *Horm. Metab. Res.* 29, 151-152.
- Gupta, P., Kar, A., 1999. Cadmium induced thyroid dysfunction in chicken: Hepatic type I iodothyronine 5'-monodeiodinase activity and role of lipid peroxidation. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 39-44.
- Gust, K.A., Fleeger, J.W., 2005. Exposure-related effects on Cd bioaccumulation explain toxicity of Cd-phenanthrene mixtures in *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2918-2926.
- Gutleb, A.C., Cenijn, P., Velzen, M.V., Lie, E., Ropstad, E., Skaare, J.U., Malmberg, T., Bergman, Å., Gabrielsen, G.W., Legler, J., 2010. In vitro assay shows that PCB metabolites completely saturate thyroid hormone transport capacity in blood of wild polar bears (*Ursus maritimus*). *Environ. Sci. Technol.* 44, 3149-3154.
- Hallett, C.J., Cook, J.G.H., 1971. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-coupled reaction for emergency blood urea estimation. *Clin. Chim. Acta* 35, 33-37. doi:10.1016/0009-8981(71)90289-0
- Hammouda, F., Messaoudi, I., El Hani, J., Baati, T., Saïd, K., Kerkeni, A., 2008. Reversal of cadmium-induced thyroid dysfunction by selenium, zinc, or their combination in rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 126, 194-203.
- Hansen, L.G., Li, M.-H., Saeed, A., Bush, B., 1995. Environmental polychlorinated biphenyls: Acute toxicity of landfill soil extract to female prepubertal rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 334-343.
- Hanson, M.L., Brundage, K.M., Schafer, R., Tou, J.C., Barnett, J.B., 2010. Prenatal cadmium exposure dysregulates sonic hedgehog and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the thymus resulting in altered thymocyte development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 136-145.

- Hood, A., Klaassen, C.D., 2000. Differential effects of microsomal enzyme inducers on in vitro thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) glucuronidation. *Toxicol. Sci.* 55, 78-84.
- Horiguchi, H., Oguma, E., Kayama, F., 2011. Cadmium induces anemia through interdependent progress of hemolysis, body iron accumulation, and insufficient erythropoietin production in rats. *Toxicol. Sci.* 122, 198-210.
- Hori, M., Kondo, H., Ariyoshi, N., Yamada, H., Hiratsuka, A., Watabe, T., Oguri, K., 1997. Changes in the hepatic glutathione peroxidase redox system produced by coplanar polychlorinated biphenyls in Ah-responsive and -less-responsive strains of mice: Mechanism and implications for toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3, 267-275.
- Houkpatin, Y, A.S., Etorh, A, P., Guedenon, P, Alimba, G, C., Ogunkanmi, A, Dougnon, V, T., Boni, G, Aissi, A, K., Montcho, S, Loko, F, Ouazzani, N, M, i, L, Boko, M, Creppy, E, E., 2013. Haematological evaluation of Wistar rats exposed to chronic doses of cadmium, mercury and combined cadmium and mercury. *Afr. J. Biotechnol.* 12, 3731-3737.
- Huang, D., Zhang, Y., Qi, Y., Chen, C., Ji, W., 2008. Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation. *Toxicol. Lett.* 179, 43-47.
- Hu, X., Adamcukova-Dodd, A., Lehmler, H.-J., Hu, D., Hornbuckle, K., Thorne, P.S., 2012. Subchronic inhalation exposure study of an airborne polychlorinated biphenyl mixture resembling the Chicago ambient air congener profile. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9653-9662.
- Hu, Y., Jin, T., Zhou, T., Pang, B., Wang, Y., 2004. Effects of zinc on gene expressions induced by cadmium in prostate and testes of rats. *BioMetals* 17, 571-572.
- IARC, 2012. Cadmium and cadmium compounds, In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 100C. Arsenic, Metals, Fibres and Dusts. IARC, Lyon, pp. 121-145.
- IARC, 2012. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 100F. Chemical agents and related occupations. IARC, Lyon, pp. 339-378.
- IARC, 2015. Polychlorinated Biphenyls, In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans I. Vol. 107. Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Biphenyls. IARC, Lyon, pp. 47-421.
- Jacquillet, G., Barbier, O., Cougnon, M., Tauc, M., Namorado, M.C., Martin, D., Reyes, J.L., Poujeol, P., 2006. Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 290, F127-F137.
- Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68, 167-182.
- Jihen, E.H., Sonia, S., Fatima, H., Mohamed Tahar, S., Abdelhamid, K., 2011. Interrelationships between cadmium, zinc and antioxidants in the liver of the rat exposed orally to relatively high doses of cadmium and zinc. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 2099-2104.

- Jiménez-Ortega, V., Cano Barquilla, P., Fernández-Mateos, P., Cardinali, D.P., Esquifino, A.I., 2012. Cadmium as an endocrine disruptor: Correlation with anterior pituitary redox and circadian clock mechanisms and prevention by melatonin. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 2287–2297. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.533
- Johri, N., Jacquillet, G., Unwin, R., 2010. Heavy metal poisoning: The effects of cadmium on the kidney. *BioMetals* 23, 783–792.
- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65–87.
- Kato, Y., Ikushiro, S., Haraguchi, K., Yamazaki, T., Ito, Y., Suzuki, H., Kimura, R., Yamada, S., Inoue, T., Degawa, M., 2004. A possible mechanism for decrease in serum thyroxine level by polychlorinated biphenyls in Wistar and Gunn rats. *Toxicol. Sci.* 81, 309–315.
- Kester, M.H.A., Bulduk, S., Tibboel, D., Meinl, W., Glatt, H., Falany, C.N., Coughtrie, M.W.H., Bergman, A.K.E., Safe, S.H., Kuiper, G.G.J.M., Schuur, A.G., Brouwer, A., Visser, T.J., 2000. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: A novel pathway explaining the estrogenic activity of PCB's. *Endocrinology* 141, 1897–1900.
- Khan, M.A., Hansen, L.G., 2003. ortho-substituted polychlorinated biphenyl (PCB) congeners (95 or 101) decrease pituitary response to thyrotropin releasing hormone. *Toxicol. Lett.* 144, 173–182.
- Kido, S., Fujihara, M., Nomura, K., Sasaki, S., Shiozaki, Y., Segawa, H., Tatsumi, S., Miyamoto, K., 2012. [Fibroblast growth factor 23 mediates the phosphaturic actions of cadmium]. *Nihon Eiseigaku Zasshi Jpn. J. Hyg.* 67, 464–471.
- Kirchner, C., Liedl, T., Kudera, S., Pellegrino, T., Javier, A.M., Gaub, H.E., Stölzle, S., Fertig, N., Parak, W.J., 2005. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett.* 5, 331–338.
- Kjellström, T., 1992. Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. *IARC Sci. Publ.* 301–310.
- Kodavanti, P.R.S., Kannan, N., Yamashita, N., Derr-Yellin, E.C., Ward, T.R., Burgin, D.E., Tilson, H.A., Birnbaum, L.S., 2001. Differential effects of two lots of Aroclor 1254: Congener-specific analysis and neurochemical end points. *Environ. Health Perspect.* 109, 1153–1161.
- Köhrle, J., 2000. The deiodinase family: Selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1853–1863.
- Korashy, H.M., El-Kadi, A.O.S., 2004. Differential effects of mercury, lead and copper on the constitutive and inducible expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR)-regulated genes in cultured hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *Toxicology* 201, 153–172.
- Kortenkamp, A., 2007. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 115, 98–105.
- Kortenkamp, A., Faust, M., Scholze, M., Backhaus, T., 2007. Low-level exposure to multiple chemicals: Reason for human health concerns? *Environ. Health Perspect.* 115, 106–114. doi:10.1289/ehp.9358
- Kretschmer, X.C., Baldwin, W.S., 2005. CAR and PXR: Xenosensors of endocrine disrupters? *Chem. Biol. Interact.* 155, 111–128.

- Krocova, Z., MacEla, A., Kroca, M., Hernychova, L., 2000. The immunomodulatory effect(s) of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. *Toxicol. In Vitro* 14, 33–40.
- Kutlu, S., Colakoglu, N., Halifeoglu, I., Sandal, S., Seyran, A.D., Aydin, M., Yilmaz, B., 2007. Comparative evaluation of hepatotoxic and nephrotoxic effects of aroclors 1221 and 1254 in female rats. *Cell Biochem. Funct.* 25, 167–172.
- Kwon, H.Y., Choi, S.Y., Won, M.H., Kang, T.-C., Kang, J.H., 2001. Oxidative modification and inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1543, 69–76.
- Kwon, O., Lee, E., Moon, T.C., Jung, H., Lin, C.X., Nam, K.-S., Baek, S.H., Min, H.-K., Chang, H.W., 2002. Expression of cyclooxygenase-2 and pro-inflammatory cytokines induced by 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) in human mast cells requires NF- $\kappa$ B activation. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1165–1168.
- Lai, I., Chai, Y., Simmons, D., Luthe, G., Coleman, M.C., Spitz, D., Haschek, W.M., Ludewig, G., Robertson, L.W., 2010. Acute toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) in male Sprague-Dawley rats: Effects on hepatic oxidative stress, glutathione and metals status. *Environ. Int.* 36, 918–923.
- Lai, I.K., Chai, Y., Simmons, D., Watson, W.H., Tan, R., Haschek, W.M., Wang, K., Wang, B., Ludewig, G., Robertson, L.W., 2011. Dietary selenium as a modulator of PCB 126-induced hepatotoxicity in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* 124, 202–214.
- Lai, I.K., Klaren, W.D., Li, M., Wels, B., Simmons, D.L., Olivier, A.K., Haschek, W.M., Wang, K., Ludewig, G., Robertson, L.W., 2013. Does dietary copper supplementation enhance or diminish PCB126 toxicity in the rodent liver? *Chem. Res. Toxicol.* 26, 634–644.
- Larregle, E.V., Varas, S.M., Oliveros, L.B., Martinez, L.D., Antón, R., Marchevsky, E., Giménez, M.S., 2008. Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1786–1792.
- Lee, B.-K., Kim, Y., 2012. Association of blood cadmium with hypertension in the Korean general population: Analysis of the 2008-2010 Korean national health and nutrition examination survey data. *Am. J. Ind. Med.* 55, 1060–1067.
- Litterst, C.L., Farber, T.M., Baker, A.M., Van Loon, E.J., 1972. Effect of polychlorinated biphenyls on hepatic microsomal enzymes in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23, 112–122.
- Liu, H., Nie, F.-H., Lin, H.-Y., Ma, Y., Ju, X.-H., Chen, J.-J., Gooneratne, R., 2014. Developmental toxicity, oxidative stress, and related gene expression induced by dioxin-like PCB 126 in zebrafish (*Danio rerio*).
- Liu, J., Liu, Y., Barter, R.A., Klaassen, C.D., 1995. Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats: A dose-response study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273, 977–985.
- Lizotte, J., Abed, E., Signor, C., Malu, D.T., Cuevas, J., Kevorkova, O., Sanchez-Dardon, J., Satoskar, A., Scorza, T., Jumarie, C., Moreau, R., 2012. Expression

- of macrophage migration inhibitory factor by osteoblastic cells: Protection against cadmium toxicity. *Toxicol. Lett.* 215, 167–173.
- Longnecker, M.P., Klebanoff, M.A., Brock, J.W., Zhou, H., Collaborative Perinatal Project (CPP), 2001. Polychlorinated biphenyl serum levels in pregnant subjects with diabetes. *Diabetes Care* 24, 1099–1101.
- López-Aparicio, P., Merino, M.J., Sánchez, E., Recio, M.N., Pérez-Albarsanz, M.A., 1997. Effect of Aroclor 1248 and two pure PCB congeners upon the membrane fluidity of rat renal tubular cell cultures. *Pestic. Biochem. Physiol.* 57, 54–62.
- Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A., Moulis, J.-M., 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 88, 1807–1814.
- Marth, E., Barth, S., Jelovcan, S., 2000. Influence of cadmium on the immune system. Description of stimulating reactions. *Cent. Eur. J. Public Health* 8, 40–44.
- Martin, L., Klaassen, C.D., 2010. Differential effects of polychlorinated biphenyl congeners on serum thyroid hormone levels in rats. *Toxicol. Sci.* 117, 36–44.
- Matović, V., Buha, A., Bulat, Z., Dukić-Ćosić, D., 2011. Cadmium toxicity revisited: Focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 62, 65–76.
- Matović, V., Buha, A., Bulat, Z., Dukić-Ćosić, D., Miljković, M., Ivanišević, J., Kotur-Stevuljević, J., 2012. Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver. *Food Chem. Toxicol.* 50, 552–557.
- Matović, V., Buha, A., Dukić-Ćosić, D., Bulat, Z., 2015. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem. Toxicol.* 78, 130–140.
- Matović, V., Bulat, Z.P., Djukić-Ćosić, D., Soldatović, D., 2010. Antagonism between cadmium and magnesium: A possible role of magnesium in therapy of cadmium intoxication. *Magnes. Res.* 23, 19–26.
- Matović, V., Dukić-Ćosić, D., Buha, A., Bulat, Z., 2013. Route, dose and duration of exposure to cadmium-relevance to oxidative stress induction, in: *Peroxidases: Biochemical Characteristics, Functions and Potential Applications*. pp. 159–175.
- McElroy, J.A., Shafer, M.M., Trentham-Dietz, A., Hampton, J.M., Newcomb, P.A., 2006. Cadmium exposure and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 869–873.
- Méplan, C., Mann, K., Hainaut, P., 1999. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 274, 31663–31670.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Mladenovic, J., Ognjanovic, B., Dordevic, N., Matic, M., Knezevic, V., Stajn, A., Saicic, Z., 2014. Protective effects of oestradiol against cadmium-induced changes in blood parameters and oxidative damage in rats. *Arh. Za Hig. Rada Toksikol.-Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 65, 37–46.

- Modi, H.R., Katyare, S.S., 2009. Cadmium exposure-induced alterations in the lipid/phospholipids composition of rat brain microsomes and mitochondria. *Neurosci. Lett.* 464, 108–112.
- Moon, H.-B., Kim, H.-S., Choi, M., Yu, J., Choi, H.-G., 2009. Human health risk of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides resulting from seafood consumption in South Korea, 2005-2007. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1819–1825.
- Morales, A.I., Vicente-Sánchez, C., Sandoval, J.M.S., Egido, J., Mayoral, P., Arévalo, M.A., Fernández-Tagarro, M., López-Novoa, J.M., Pérez-Barriocanal, F., 2006. Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food Chem. Toxicol.* 44, 2092–2100.
- Moskovitz, J., Yim, M.B., Chock, P.B., 2002. Free radicals and disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 354–359.
- Moulis, J.-M., 2010. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *BioMetals* 23, 877–896.
- Muller, L., Stacey, N.H. 1988. Subcellular toxicity of low level cadmium in rats: Effect on cytochrome C oxidase. *Toxicology* 51, 25-34.
- Murugesan, P., Muthusamy, T., Balasubramanian, K., Arunakaran, J., 2005. Studies on the protective role of vitamin C and E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) - Induced oxidative damage in Leydig cells. *Free Radic. Res.* 39, 1259–1272.
- Nair, A.R., DeGheselle, O., Smeets, K., Van Kerkhove, E., Cuypers, A., 2013. Cadmium-induced pathologies: Where is the oxidative balance lost (or not)? *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6116–6143.
- Narayanan, P.K., Caarter, W.O., Ganey, P.E., Roth, R.A., Voytik-Harbin, S.L., Robinson, J.P., 1998. Impairment of ghuman neutrophil oxidative burst by polichlorinated byphenyls: Inhibition of superoxide dismutase activity. *J. Leukocyte Biol.* 63, 216-224.
- Nordberg, G.F., 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 192–200.
- Nordberg, G.F., Nogawa, K., Nordberg, M., Friberg, L.T., 2007. Cadmium, in: *Handbook on the Toxicology of Metals*. pp. 445–486.
- Ohsawa, M., 2009. Heavy metal-induced immunotoxicity and its mechanisms. *Yakugaku Zasshi* 129, 305–319. doi:10.1248/yakushi.129.305
- Oishi, S., Nakagawa, J.-I., Ando, M., 2000. Effects of cadmium administration on the the endogenous metal balance in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 76, 257–278.
- Omara, F.O., Brochu, C., Flipo, D., Denizeau, F., Fournier, M., 1997. Immunotoxicity of environmentally relevant mixtures of polychlorinated aromatic hydrocarbons with methyl mercury on rat lymphocytes in vitro. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 576–581.
- Pacini, S., Fiore, M.G., Magherini, S., Morucci, G., Branca, J.J.V., Gulisano, M., Ruggiero, M., 2012. Could cadmium be responsible for some of the neurological signs and symptoms of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Med. Hypotheses* 79, 403–407.
- Parizek, J., 1957. The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *J. Endocrinol.* 15, 56-63.

- Pawa, S., Ali, S., 2004. Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: Protection by oxyanionic form of tungsten. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1688, 210–222.
- Piłat-Marcinkiewicz, B., Brzóska, M.M., Sawicki, B., Moniuszko-Jakoniuk, J., 2003. Structure and function of thyroid follicular cells in female rats chronically exposed to cadmium. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 47, 157–163.
- Pleasant, E.W., Waslien, C., Naughton, B.A., 1993. Dietary modulation of the symptoms of cadmium toxicity in rats: Effects of vitamins A, C, D, D hormone, and fluoride. *Nutr. Res.* 13, 839–850.
- Prozialeck, W.C., Lamar, P.C., Lynch, S.M., 2003. Cadmium alters the localization of N-cadherin, E-cadherin, and  $\beta$ -catenin in the proximal tubule epithelium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189, 180–195.
- Ramirez, D.C., Gimenez, M.S., 2003. Induction of redox changes, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by chronic cadmium exposure in mouse peritoneal macrophages. *Toxicol. Lett.* 145, 121–132.
- Ramis, R., Diggle, P., Boldo, E., Garcia-Perez, J., Fernandez-Navarro, P., Lopez-Abente, G., 2012. Analysis of matched geographical areas to study potential links between environmental exposure to oil refineries and non-Hodgkin lymphoma mortality in Spain. *Int. J. Health Geogr.* 11.
- Renugadevi, J., Milton Prabu, S., 2010. Quercetin protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cadmium in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 62, 471–481.
- Renugadevi, J., Prabu, S.M., 2009. Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology* 256, 128–134.
- Rikans, L.E., Yamano, T., 2000. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 110–117.
- Robertson, W.S., 1981. Optimizing determination of plasma albumin by the bromocresol green dye-binding method. *Clin. Chem.* 27, 144–146.
- Roegge, C.S., Morris, J.R., Villareal, S., Wang, V.C., Powers, B.E., Klintsova, A.Y., Greenough, W.T., Pessah, I.N., Schantz, S.L., 2006. Purkinje cell and cerebellar effects following developmental exposure to PCBs and/or MeHg. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 74–85.
- Roland Ritter, M.S., 2010. Intrinsic Human Elimination Half-Lives of Polychlorinated Biphenyls Derived from the Temporal Evolution of Cross-Sectional Biomonitoring Data from the United Kingdom. *Environ. Health Perspect.* 119, 225–31.
- Roos, R., Andersson, P.L., Halldin, K., Håkansson, H., Westerholm, E., Hamers, T., Hamscher, G., Heikkinen, P., Korkalainen, M., Leslie, H.A., Niittynen, M., Sankari, S., Schmitz, H.-J., van der Ven, L.T.M., Viluksela, M., Schrenk, D., 2011. Hepatic effects of a highly purified 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB 180) in male and female rats. *Toxicology* 284, 42–53.
- Ryu, D.-Y., Lee, S.-J., Park, D.W., Choi, B.-S., Klaassen, C.D., Park, J.-D., 2004. Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. *Toxicol. Lett.* 152, 19–25.
- Salama, A.F., Kasem, S.M., Tousson, E., Elsisy, M.K.H., 2012. Protective role of L-carnitine and vitamin e on the kidney of atherosclerotic rats. *Biomed. Aging Pathol.* 2, 212–215.

- Satarug, S., Moore, M.R., 2012. Emerging roles of cadmium and heme oxygenase in type-2 diabetes and cancer susceptibility. *Tohoku J. Exp. Med.* 228, 267–288.
- Schantz, S.L., Widholm, J.J., Rice, D.C., 2003. Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environ. Health Perspect.* 111, 357–376.
- Schell, L.M., Gallo, M.V., Denham, M., Ravenscroft, J., DeCaprio, A.P., Carpenter, D.O., 2008. Relationship of thyroid hormone levels to levels of polychlorinated biphenyls, lead, p,p'-DDE, and other toxicants in Akwesasne Mohawk Youth. *Environ. Health Perspect.* 116, 806–813.
- Schettgen, T., Alt, A., Esser, A., Kraus, T., 2015. Current data on the background burden to the persistent organochlorine pollutants HCB, p,p'-DDE as well as PCB 138, PCB 153 and PCB 180 in plasma of the general population in Germany. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218, 380–385.
- Schleizinger, J.J., Struntz, W.D.J., Goldstone, J.V., Stegeman, J.J., 2006. Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. *Aquat. Toxicol.* 77, 422–432.
- Schumann, G., Bonora, R., Ceriotti, F., Féraud, G., Ferrero, C.A., i sar, 2002a. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, 725–733.
- Schumann, G., Bonora, R., Ceriotti, F., Féraud, G., Ferrero, C.A., i sar, 2002b. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, 718–724.
- Schumann, G., Klauke, R., Canalias, F., Bossert-Reuther, S., Franck, P.F.H., i sar, 2011. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 9: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Scientific Division, Committee on Reference Systems of Enzymes (C-RSE) 1). *Clin. Chem. Lab. Med.* 49, 1439–1446.
- Scott Obach, R., Dobo, K.L., 2008. Comparison of metabolite profiles generated in Aroclor-induced rat liver and human liver subcellular fractions: Considerations for in vitro genotoxicity hazard assessment. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 631–641.
- Sekaran, S., Kandaswamy, S., Gunasekaran, K., Perumal, E., Afsar Basha, F.Y., Madhan Mohan, B.J., Jagadeesan, A., 2012. Protective Role of Quercetin on Polychlorinated Biphenyls (Aroclor-1254) Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Liver of Adult Male Rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 26, 522–532.
- Selvakumar, K., Bavithra, S., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunakaran, J., 2012. Polychlorinated biphenyls-induced oxidative stress on rat hippocampus: A neuroprotective role of quercetin. *ScientificWorldJournal* 2012.
- Shagirtha, K., Muthumani, M., Milton Prabu, S., 2011. Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 15, 1039–1050.



- Shaikh, Z.A., Vu, T.T., Zaman, K., 1999. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 256-263.
- Shin, K.-J., Bae, S.S., Hwang, Y.-A., Seo, J.K., Ryu, S.H., Suh, P.-G., 2000. 2,2',4,6,6'-Pentachlorobiphenyl induces apoptosis in human monocytic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169, 1-7.
- Silva, N., Peiris-John, R., Wickremasinghe, R., Senanayake, H., Sathiakumar, N., 2012. Cadmium a metalloestrogen: Are we convinced? *J. Appl. Toxicol.* 32, 318-332.
- Slob, W., 2002. Dose-response modeling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66, 298-312.
- Smialowicz, R.J., Andrews, J.E., Riddle, M.M., Rogers, R.R., Luebke, R.W., Copeland, C.B., 1989. Evaluation of the immunotoxicity of low level PCB exposure in the rat. *Toxicology* 56, 197-211.
- Souza, V., Bucio, L., Gutiérrez-Ruiz, M.C., 1997. Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* 120, 215-220.
- Steinbrenner, H., Sies, H., 2009. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790, 1478-1485.
- Tang, L., Qiu, R., Tang, Y., Wang, S., 2014. Cadmium-zinc exchange and their binary relationship in the structure of Zn-related proteins: A mini review. *Metallomics* 6, 1313-1323.
- Tang, W., Shaikh, Z.A., 2001. Renal cortical mitochondrial dysfunction upon cadmium metallothionein administration to sprague-dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health - Part A* 63, 221-235.
- Tan, Y., Li, D., Song, R., Lawrence, D., Carpenter, D.O., 2003. Ortho-substituted PCBs kill thymocytes. *Toxicol. Sci.* 76, 328-337.
- Teuschler, L., Klaunig, J., Carney, E., Chambers, J., Conolly, R., Gennings, C., Giesy, J., i sar, 2002. Support of science-based decisions concerning the evaluation of the toxicology of mixtures: A new beginning. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36, 34-39.
- Thévenod, F., 2009. Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 221-239.
- Thévenod, F., Lee, W.-K., 2013. Cadmium and cellular signaling cascades: Interactions between cell death and survival pathways. *Arch. Toxicol.* 87, 1743-1786.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Edited by CA Burtis, ER Ashwood. Philadelphia, WB Saunders Company, 1994.
- Tryphonas, H., Luster, M.I., Schiffman, G., Dawson, L.-L., Hodgen, M., Germolec, D., Hayward, S., Bryce, F., Loo, J.C.K., Mandy, F., Arnold, D.L., 1991. Effect of chronic exposure of PCB (Aroclor 1254) on specific and nonspecific immune parameters in the rhesus (*Macaca mulatta*) monkey. *Fundam. Appl. Toxicol.* 16, 773-786.
- Turyk, M.E., Anderson, H.A., Persky, V.W., 2007. Relationships of thyroid hormones with polychlorinated biphenyls, dioxins, furans, and DDE in adults. *Environ. Health Perspect.* 115, 1197-1203.
- Twaroski, T.P., O'Brien, M.L., Robertson, L.W., 2001. Effects of selected polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on hepatic glutathione,

- glutathione-related enzymes, and selenium status: Implications for oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 62, 273–281.
- UNEP. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants; <http://chm.pops.int/>
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161–1208.
- Van Den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., Van Leeuwen, F.X.R., Liem, A.K.D., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Wærn, F., Zacharewski, T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106, 775–792.
- Van Der Ven, L.T.M., Van De Kuil, T., Verhoef, A., Leonards, P.E.G., Slob, W., Cantón, R.F., Germer, S., Hamers, T., Visser, T.J., Litens, S., Håkansson, H., Fery, Y., Schrenk, D., van den Berg, M., Piersma, A.H., Vos, J.G., 2008. A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of a purified technical pentabromodiphenyl ether (pentaBDE) mixture in Wistar rats. *Toxicology* 245, 109–122.
- Van Kerkhove, E., Pennemans, V., Swennen, Q., 2010. Cadmium and transport of ions and substances across cell membranes and epithelia. *BioMetals* 23, 823–855.
- Vansell, N.R., Klaassen, C.D., 2002. Increase in rat liver udp-glucuronosyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation. *Drug Metab. Dispos.* 30, 240–246.
- Venkataraman, P., Krishnamoorthy, G., Vengatesh, G., Srinivasan, N., Aruldas, M.M., Arunakaran, J., 2008. Protective role of melatonin on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress and changes in acetylcholine esterase and membrane bound ATPases in cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of adult rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26, 585–591.
- Viluksela, M., Raasmaja, A., Lebofsky, M., Stahl, B.U., Rozman, K.K., 2004. Tissue-specific effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the activity of 5'-deiodinases I and II in rats. *Toxicol. Lett.* 147, 133–142.
- Voie, O.A., Tysklind, M., Andersson, P.L., Fonnum, F., 2000. Activation of respiratory burst in human granulocytes by polychlorinated biphenyls: A structure-activity study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 167, 118–124.
- Wade, M.G., Foster, W.G., Younglai, E.V., McMahon, A., Leingartner, K., Yagminas, A., Blakey, D., Fournier, M., Desaulniers, D., Hughes, C.L., 2002a. Effects of Subchronic Exposure to a Complex Mixture of Persistent Contaminants in Male Rats: Systemic, Immune, and Reproductive Effects. *Toxicol. Sci.* 67, 131–143.
- Wade, M.G., Parent, S., Finnson, K.W., Foster, W., Younglai, E., McMahon, A., Cyr, D.G., Hughes, C., 2002b. Thyroid toxicity due to subchronic exposure to a complex mixture of 16 organochlorines, lead, and cadmium. *Toxicol. Sci.* 67, 207–218.

- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95–117.
- Wang, B., Schneider, S.N., Dragin, N., Girijashanker, K., Dalton, T.P., He, L., Miller, M.L., Stringer, K.F., Soleimani, M., Richardson, D.D., Nebert, D.W., 2007. Enhanced cadmium-induced testicular necrosis and renal proximal tubule damage caused by gene-dose increase in a Slc39a8-transgenic mouse line. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 292, C1523–C1535.
- Wang, J., Zhu, H., Liu, X., Liu, Z., 2014. Oxidative Stress and Ca<sup>2+</sup> Signals Involved on Cadmium-Induced Apoptosis in Rat Hepatocyte. *Biol. Trace Elem. Res.* 161, 180–189.
- Wang, L.-Q., James, M.O., 2006. Inhibition of sulfotransferases by xenobiotics. *Curr. Drug Metab.* 7, 83–104.
- Wang, L., Zhang, S., Lin, R., Li, L., Zhang, D., Li, X., Liu, S., 2013. PCB-77 disturbs iron homeostasis through regulating hepcidin gene expression. *Gene* 532, 146–151.
- Wang, Y., Lu, C., Sheng, Z., Liu, G., Fu, Z., Zhu, B., Peng, S., 2011. Enhanced hepatotoxicity induced by repeated exposure to polychlorinated biphenyls and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in combination in male rats. *J. Environ. Sci.* 23, 119–124.
- Wätjen, W., Beyersmann, D., 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: Influence of oxidative stress. *BioMetals* 17, 65–78.
- WHO Regional Office for Europe, 2000. *Air Quality Guidelines. Second Edition.* WHO, Copenhagen, Denmark, pp 1–22.
- Włostowski, T., Krasowska, A., Bonda, E., 2008. Joint effects of dietary cadmium and polychlorinated biphenyls on metallothionein induction, lipid peroxidation and histopathology in the kidneys and liver of bank voles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 403–410.
- Wu, F., Zheng, Y., Gao, J., Chen, S., Wang, Z., 2014. Induction of oxidative stress and the transcription of genes related to apoptosis in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) larvae with Aroclor 1254 exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 110, 254–260.
- Xiao, W., Son, J., Vorrink, S.U., Domann, F.E., Goswami, P.C., 2015. Ligand-independent activation of aryl hydrocarbon receptor signaling in PCB3-quinone treated HaCaT human keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 233, 258–266.
- Yalin, S., Comelekoglu, U., Bagis, S., Sahin, N.O., Ogenler, O., Hatungil, R., 2006. Acute effect of single-dose cadmium treatment on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 140–144.
- Yamano, T., DeCicco, L.A., Rikans, L.E., 2000. Attenuation of cadmium-induced liver injury in senescent male Fischer 344 rats: Role of kupffer cells and inflammatory cytokines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162, 68–75.
- Yan Cheng, C., Mruk, D.D., 2012. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol. Rev.* 64, 16–64.
- Yilmaz, S., Ozan, S., Benzer, F., Canatan, H., 2003. Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. *Cell Biochem. Funct.* 21, 325–330.

- Yorita Christensen, K.L., 2013. Metals in blood and urine, and thyroid function among adults in the United States 2007-2008. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 624-632.
- Yoshizuka, M., Mori, N., Hamasaki, K., Tanaka, I., Yokoyama, M., Hara, K., Doi, Y., Umezu, Y. -i., Araki, H., Sakamoto, Y., Miyazaki, M., Fujimoto, S., 1991. Cadmium toxicity in the thyroid gland of pregnant rats. *Exp. Mol. Pathol.* 55, 97-104.
- Zalups, R.K., Ahmad, S., 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186, 163-188.
- Zhu, B., Wang, Q., Wang, X., Zhou, B., 2014. Impact of co-exposure with lead and decabromodiphenyl ether (BDE-209) on thyroid function in zebrafish larvae. *Aquat. Toxicol.* 157, 186-195.
- Zoeller, R.T., Dowling, A.L.S., Vas, A.A., 2000. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls exerts thyroid hormone-like effects on the expression of RC3/neurogranin and myelin basic protein messenger ribonucleic acids in the developing rat brain. *Endocrinology* 141, 181-189.

## 8. PRILOZI

### BIOGRAFIJA AUTORA

Aleksandra Buha rođena je 22. decembra 1984. godine u Sarajevu. Na Farmaceutski fakultet, Univerziteta u Beogradu upisala se 2003/04. godine i tokom studija bila stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije, grada Beograda i Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka. Diplomirala je 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,68. Sledeće školske godine godine upisala je doktorske akademske studije. Specijalističke akademske studije, program Toksikološka procena rizika od zagađivača životne sredine završila je 2014. godine.

U periodu od 2010-2014. godine pohađala je brojne kurseve edukacije iz različitih oblasti toksikologije. Bila je stipendista Evropskog Udruženja toksikologa, Karolinska Instituta - Švedska (*Institute of Environmental Medicine*), NATO Instituta za nauku i sigurnost i Evropskog programa za medicinske nauke (*SafeSciMET*). Dobitnica je nagrade za mlade istraživače Udruženja toksikologa Hrvatske (CROTOX 2012) kao i prve nagrade u okviru poster sesije „Zagađivači oko nas i u nama“ VI Kongresa farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem (2014). Tokom 2015. godine bila je na studijskom boravku u *Elsie Widdowson* laboratoriji, *MRC Human Nutrition Research Unit*, Univerziteta u Kembridžu-Velika Britanija.

Na radno mesto saradnika na Katedri za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Farmaceutskog fakulteta, primljena je 2009. godine, u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Toksikološka hemija izabrana 2011. i reizabrana 2014. godine. Od januara 2011. angažovana je kao istraživač na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Autor je ili koautor više od 70 publikacija objavljenih u međunarodnim i domaćim časopisima te prezentovanim na međunarodnim i domaćim konferencijama, kao i udžbenika „Trovanja lekovima odabrana poglavlja“.

## OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

### **Radovi u međunarodnim časopisima (M20)**

Buha A, Antonijević B, Milovanović V, Janković S, Bulat Z, Matović V. Polychlorinated biphenyls as oxidative stress inducers in liver of subacutely exposed rats: Implication for dose-dependence toxicity and benchmark dose concept. *Environ Res.* 2015, 136: 309-17. (IF=4.373; M21)

Buha A, Antonijević B, Bulat Z, Jačević V, Milovanović V, Matović V. The impact of prolonged cadmium exposure and co-exposure with polychlorinated biphenyls on thyroid function in rats. *Toxicol Lett* 2013, 221: 83-90. (IF=3.262; M21)

### **Rad u međunarodnom naučnom časopisu**

Buha A, Milovanović V, Antonijević B, Bulat Z, Matović V. (2013) Relative Liver Weight in Rats Subacutely Exposed to Polychlorinated Biphenyls In Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe Simeonov, Lubomir I.; Macaev, Fliur Z.; Simeonova, Biana G. (Eds.), 287-294, Springer Netherlands.

### **Radovi saopšteni u izvodu na međunarodnim naučnim skupovima (M34)**

Buha A, Bulat Z, Antonijević B, Dukic-Cosic D, Jacevic V, Vucinic, S, Matovic, V. Estimation of benchmark dose for thyroid hormone levels in rats exposed to prolonged cadmium intoxication. *Toxicol Lett*, 221, 2013, S222.

Matović V, Buha A, Antonijević B, Milovanović V. Estimation of Benchmark Dose for Relative Thyroid Gland Weight in Rats Subacutely Exposed to Polychlorinated Biphenyls. The XIII International Congress of Toxicology, June 30-July 4, 2013, Coex, Seoul, Korea, Abstract Book: 173.

Buha A, Milovanović V, Janković S, Bulat Z, Antonijević B, Matović V. BMD Approach as Alternative to Traditionally Used NOAEL in Assessing the Hepatotoxicity Risk from PCBs. 11<sup>th</sup> Serbian

Congress of Toxicology »New Frontiers and Challenges in Toxicology« Abstract Book, ISBN 978-86-917867-0-0, 2014, 155-156.

Buha A, Milovanović V, Antonijević B, Bulat Z, Vukomanović P, Matović V. Subacute toxicity of PCBs in rats: Is hepatic oxidative stress induction dose dependent? *Toxicol Lett*, 2014, 229, S54.

Matović V, Buha A. Prolonged Cd and PCBs co-exposure and thyroid function in rats: Is the liver relevant point of their interactions? *International Cadmium Symposium 2015, Sassari, June 25-27, 2015. Congress Proceedings, 27. (usmeno saopštenje)*

Buha A, Milovanović V, Antonijević B, Ćurčić M, Lukić V, Matović V. Prolonged PCBs and Cd co-exposure and hepatic GSH levels in liver of rats: Is the combined effect additive, synergistic or antagonistic? *Toxicol Lett*, 2015, 238, S353.

Buha A, Milovanović V, Nikolić D, Đukić-Ćosić D, Vukomanović P, Matović V. Dose dependence of Cd effects of antioxidant defense system in liver of subacutely exposed rats. *Toxicol Lett*, 2015, 238, S123.

#### **Saopštenja sa nacionalnih skupova štampana u izvodu (M64)**

Buha A, Ćurčić M, Milovanović V, Antunović M, Džoković M, Jačević V, Vučinić S, Bulat Z, Antonijević B, Matović V. Lipidna peroksidacija u jetri: efekti izloženosti perzistentnim polihalogenovanim zagađivačima. *Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Zbornik sažetaka*. 424-5.

IZJAVE

**Прилог 1.**

Изјава о ауторству

Потписана Александра Буха  
број индекса 15/09

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ ПРОДУЖЕНЕ ИЗЛОЖЕНОСТИ КАДМИЈУМУ  
И/ИЛИ ПОЛИХЛОРОВАНИМ БИФЕНИЛИМА У ПАЦОВА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 12.11.2015.

*Aleksandra Buhar*



## Прилог 2.

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александра Буха

Број индекса 15/09

Студијски програм Токсикологија

Наслов рада ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ ПРОДУЖЕНЕ ИЗЛОЖЕНОСТИ  
КАДМИЈУМУ И/ИЛИ ПОЛИХЛОРОВАНИМ БИФЕНИЛИМА У  
ПАЦОВА

Ментор проф. др Весна Матовић

Потписана Александра Буха

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 12.11.2015.

*Aleksandra Buba*

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ ПРОДУЖЕНЕ ИЗЛОЖЕНОСТИ КАДМИЈУМУ И/ИЛИ ПОЛИХЛОРОВАНИМ БИФЕНИЛИМА У ПАЦОВА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 12.11.2015.

*Aleksandra Banja*

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.