

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Katarina S. Živančević

**TOKSIČNI EFEKTI SMEŠE OLOVA,  
KADMIJUMA, ŽIVE I ARSENA NA MODELU  
SUBAKUTNE IZLOŽENOSTI PACOVA:  
PROTEKTIVNO DEJSTVO PROBIOTIKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Katarina S. Živančević

**TOXIC EFFECTS OF LEAD, CADMIUM,  
MERCURY AND ARSENIC MIXTURE IN A  
SUBACUTE EXPOSURE MODEL FOR RATS:  
PROTECTIVE EFFECT OF PROBIOTICS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2025

## Mentor

---

dr sc. Danijela Đukić-Ćosić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

## Članovi komisije

---

dr sc. Biljana Antonijević, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

dr sc. Petar Bulat, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

---

dr sc. Zorica Bulat, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

dr sc. Marijana Ćurčić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

dr sc. Aleksandra Buha Đorđević, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

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

## Toksični efekti smeše olova, kadmijuma, žive i arsena na modelu subakutne izloženosti pacova: protektivno dejstvo probiotika

### Sažetak

U okviru ove doktorske disertacije ispitivana je subakutna toksičnost smeše metal(oid)a olova (Pb), kadmijuma (Cd), žive (Hg) i arsena (As) kod pacova, kao i utvrđivanje potencijalnog protektivnog efekta probiotika na umanjeње štetnih efekata ispitivane smeše metal(oid)a. Studija je sprovedena na mužjacima *Wistar* pacova podeljenim u 8 grupa po 5 jedinki od kojih je jedna grupa bila kontrolna, a 7 grupa je tretirano oralnim putem tokom 28 dana rastućim dozama smeše (MIX: Pb+Cd+Hg+As), od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6), kao i monokomponentnim ( $5,16 \times 10^8$  CFU/kg/dan; *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*) i multikomponentnim probiotikom ( $8,78 \times 10^8$  CFU/kg/dan; *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* LP 6595, i *Lactobacillus plantarum* HEAL9) uz smešu najvišeg doznog nivoa MIX 5. Ispitani su nivoi toksičnih metal(oid)a u krvi, hematološki, biohemijski, hormonski i parametri redoks statusa, kao i nivoi bioelementa, dok su organi analizirani histopatološki, uz određivanje toksičnih metal(oid)a, bioelemenata i redoks parametara, kao i aktivnosti acetilholinesteraze u mozgu. Modelovan je odnos doza-odgovor i određene su *Benchmark* doze za toksične efekte pojedinačnih metal(oid)a u smeši. Značajan porast nivoa Pb, Cd Hg i As u krvi uočen je samo u grupi kojoj je davana najviša doza, dok je akumulacija toksičnih metala dobijena prvenstveno u jetri, bubrezima, mozgu i femuru. Izlaganje najnižoj dozi ispitivane smeše metala dovodi do značajnijih promena parametara anemije u krvi, odnosno sniženja broja eritrocita, hemoglobina, hematokrita, i nivoa gvožđa, kao i značajnog povećanja parametra oksidativnog stresa,  $O_2^-$ , PAB i AOPP. Tkiva ispoljavaju različitu osetljivost na oksidativni stres izazvan rastućim dozama smeše toksičnih metala (Pb, Cd, Hg, As). Najizraženije promene zabeležene su mozgu i plućima, dok je u jetri dobijeno smanjenje SOD i GSH pri većini doznih nivoa, dok je MDA snižen u srednjem i dva najviša dozna nivoa u bubrezima. Dodatno, više doze smeše Pb, Cd, Hg i As značajno su smanjile aktivnost enzima AChE u mozgu. Histopatološka analiza ukazuje na progresivna oštećenja većine organa pri izloženosti smeši metal(a), sa uočljivijim efektima pri većim doznim nivoima. *Benchmark* analiza utvrdila je postojanje doza-odgovor pri čemu je najniža BMD vrednost za nivo srednjeg volumena eritrocita (MCV), koji predstavlja kritični toksični efekat za svaki metal(oid) u ispitivanoj smeši i iznosi  $3,15E-04$  mg Pb/kg t.m./dan,  $1,05E-03$  mg Cd/kg t.m./dan,  $2,10E-05$  mg Hg/kg t.m./dan i  $2,10E-04$  mg As/kg t.m./dan. Probiotici, monokomponentni i multikomponentni, uticali su značajno na smanjenje Cd, Hg i As u krvi, kao i umanjeње pojedinih metala u jetri, bubrezima, plućima i femuru. Primena oba probiotika dovodi do normalizovanja izmenjenih vrednosti hematoloških parametara i TAS parametra u krvi, dok primena multikomponentnog probiotika normalizuje vrednosti TAS u jetri, IMA u plućima, TOS i  $O_2^-$  u pankreasu i MDA u testisima i aktivnost enzima acetilholinesteraze u mozgu koji su značajno promenjeni pod uticajem smeše ispitivanih metal(oid)a. Dobijeni rezultati ukazuju da je multikomponentni probiotik efikasniji u umanjeњу štetnih efekata ispitivane smeše olova, kadmijuma, žive i arsena u odnosu na monokomponentni probiotik.

Ključne reči: smeša olova, kadmijuma, žive i arsena, subakutna toksičnost, mono- i multikomponentni probiotik, protektivni efekat, *Benchmark* doze

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Toksikologija

## **Toxic effects of lead, cadmium, mercury and arsenic mixture in a subacute exposure model for rats: protective effect of probiotics**

### **Abstract**

In this doctoral dissertation, the subacute toxicity of the metal(oid) mixture of lead (Pb), cadmium (Cd), mercury (Hg) and arsenic (As) in rats was examined, as well as the determination of the potential protective effect of probiotics on reducing the harmful effects of the investigated metal(oid) mixture. The study was conducted on male Wistar rats divided into 8 groups of 5 individuals, one group was a control group, and 7 groups were treated orally for 28 days with increasing doses of the mixture (MIX: Pb+Cd+Hg+As), from the lowest dose level - MIX 1 to the highest dose level - MIX 5 (mg/kg bw/day) (Pb: 0.003, 0.01, 0.1, 0.3, 1; Cd: 0.01, 0.9, 3; Hg: 0.0006, 0.018, 0.06; As: 0.002, 0.006, 0.18, 0.6). ( $5.16 \times 10^8$  CFU/kg/day; *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*) and a multicomponent probiotic ( $8.78 \times 10^8$  CFU/kg/day; *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* LP 6595, and *Lactobacillus plantarum* HEAL9) with the mixture of the highest dose level MIX 5. The levels of toxic metal(oids) in the blood, hematological, biochemical, hormonal and redox status parameters were examined, as well as the levels of bioelements, while the organs were analyzed histopathologically, with the determination of toxic metal(oids), bioelements and redox parameters, as well as acetylcholinesterase activity in the brain. A dose-response relationship was modeled and Benchmark doses for the toxic effects of individual metal(oids) in the mixture were determined. A significant increase in the levels of Pb, Cd, Hg and As in the blood was observed only in the group that received the highest dose, while the accumulation of toxic metals was obtained primarily in the liver, kidneys, brain and femur. Exposure to the lowest dose of the examined metal mixture leads to significant changes in the parameters of anemia in the blood, i.e. a decrease in the number of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, and iron levels, as well as a significant increase in the parameters of oxidative stress, O<sub>2</sub>·-, PAB and AOPP. Tissues exhibit different sensitivity to oxidative stress caused by increasing doses of a mixture of toxic metals (Pb, Cd, Hg, As). The most pronounced changes were recorded in the brain and lungs, while SOD and GSH were reduced in the liver at most dose levels, while MDA was decreased in the middle and two highest dose levels in the kidneys. Additionally, higher doses of a mixture of Pb, Cd, Hg and As significantly decreased the activity of the AChE enzyme in the brain. Histopathological analysis indicates progressive damage to most organs upon exposure to the metal(s) mixture, with more noticeable effects at higher dose levels. Benchmark analysis established the existence of a dose-response, where the lowest BMD value for the mean erythrocyte volume (MCV) level, which represents the critical toxic effect for each metal(oid) in the tested mixture, is  $3.15 \times 10^{-4}$  mg Pb/kg bw/day,  $1.05 \times 10^{-3}$  mg Cd/kg bw/day,  $2.10 \times 10^{-5}$  mg Hg/kg bw/day and  $2.10 \times 10^{-4}$  mg As/kg body weight/day. Probiotics, monocomponent and multicomponent, had a significant effect on the reduction of Cd, Hg and As in the blood, as well as the reduction of certain metals in the liver, kidneys, lungs and femur. The use of both probiotics leads to the normalization of the changed values of hematological parameters and the TAS parameter in the blood, while the use of the multicomponent probiotic normalizes the values of TAS in the liver, IMA in the lungs, TOS and O<sub>2</sub>·- in the pancreas and MDA in the testicles and the activity of the acetylcholinesterase enzyme in the brain, which were significantly changed under the influence of the mixture of investigated metal(oids). The obtained results indicate that the multi-component probiotic is more effective in reducing the harmful effects of the examined mixture of lead, cadmium, mercury and arsenic compared to the mono-component probiotic.

Keywords: mixture of lead, cadmium, mercury and arsenic, subacute toxicity, mono- and multicomponent probiotic, protective effect, Benchmark doses

Academic expertise: Pharmacy

Major in: Toxicology

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	
<b>1.1. Toksični metali.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Olovo.....	1
1.1.2. Kadmijum.....	3
1.1.3. Živa.....	5
1.1.4. Arsen.....	7
<b>1.2. Toksičnost smeše metala.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Protektivno dejstvo probiotika.....</b>	<b>11</b>
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Hemikalije.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Probiotik.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. In vivo ispitivanje na modelu pacova.....</b>	<b>15</b>
3.3.1. Eksperimentalne životinje.....	15
3.3.2. Eksperimentalni protokol.....	16
3.3.3. Anamortem analiza.....	17
3.3.3.1. Testovi ponašanja .....	17
3.3.3.2. Prirast telesne mase.....	17
3.3.4. Postmortem analiza.....	18
3.3.4.1. Priprema i uzorkovanje krvi i organa.....	18
3.3.4.2. Određivanje hematoloških parametara, biohemijskih parametara i hormona.....	18
3.3.4.3. Određivanje toksičnih metala i bioelemenata.....	18
3.3.4.4. Određivanje parametara redoks statusa.....	19
3.3.4.5. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze.....	20
3.3.4.6. Histopatološka analiza.....	20
3.3.4.7. Statistička obrada podataka.....	20
3.3.4.8. Modelovanje odnosa doza-odgovor.....	20
<b>3.1. In silico ispitivanje toksičnosti smeše olova, kadmijuma, žive i arsena.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. In vitro ispitivanje potencijala probiotika za vezivanje toksičnih metala.....</b>	<b>24</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Ispitivanje toksičnosti smeše olova, kadmijuma, žive i arsena.....</b>	<b>26</b>
4.1.1. In vivo rezultati subakutne toksičnosti smeše olova, kadmijuma, žive i arsena na modelu pacova.....	26
4.1.1.1. Promene u ponašanju, unos hrane i vode.....	26
4.1.1.2. Prirast telesne mase i relativna masa organa.....	29
4.1.1.3. Nivoi toksičnih metal(oid)a u krvi.....	30
4.1.1.4. Hematološki parametri.....	31
4.1.1.5. Biohemijski parametri.....	34
4.1.1.6. Nivoi hormona.....	39
4.1.1.7. Parametri oksidativnog statusa u krvi.....	41
4.1.1.8. Nivoi bioelemenata u krvi.....	43
4.1.1.9. Nivoi toksičnih metal(oid)a i bioelemenata u fecesu.....	44
4.1.1.10. Nivoi metal(oid)a u tkivima.....	46
4.1.1.11. Parametri redoks statusa u tkivima.....	51
4.1.1.12. Nivoi bioelemenata u tkivima.....	64
4.1.1.13. Aktivnost acetilholinesteraze.....	69
4.1.1.14. Promena strukture očuvanosti tkiva.....	70
4.1.2. In silico rezultati ispitivanja toksičnosti smeše olova, kadmijuma, žive i arsena.....	83
4.1.2.1. Uticaj smeše toksičnih metal(oid)a na razvoj bolesti.....	83
4.1.2.2. Uticaj smeše toksičnih metal(oid)a na hematološke promene.....	85
4.1.2.3. Uticaj smeše toksičnih metal(oid)a na razvoj neurodegenerativnih bolesti.....	91
<b>4.2. Ispitivanje protektivnog dejstva probiotika.....</b>	<b>98</b>

4.2.1.	<i>In vitro</i> rezultati uticaja probiotika na smanjenje koncentracije metal(oid)a.....	98
4.2.2.	<i>In vivo</i> rezultati uticaja probiotika na smanjenje toksičnosti metal(oid)a.....	100
4.2.2.1.	Promene u ponašanju, unosu hrane i vode.....	100
4.2.2.2.	Prirast telesne mase i relativna masa organa.....	102
4.2.2.3.	Nivoi ispitivanih metal(oid)a u krvi i tkivima.....	104
4.2.2.4.	Hematološki parametri.....	107
4.2.2.5.	Biohemijski parametri.....	110
4.2.2.6.	Nivoi hormona.....	115
4.2.2.7.	Parametri redoks statusa u krvi.....	117
4.2.2.8.	Nivoi bioelemenata u krvi i tkivima.....	119
4.2.2.9.	Nivoi elemenata u fecesu.....	123
4.2.2.10.	Parametri oksidativnog statusa u tkivima.....	125
4.2.2.11.	Aktivnost acetilholinesteraze.....	135
4.2.2.12.	Parametri očuvanosti strukture tkiva.....	136
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>145</b>
<b>5.1.</b>	<b>Toksičnost smeše olova, kadmijuma, žive i arsena.....</b>	<b>145</b>
5.1.1.	Subakutna toksičnost kod pacova.....	145
5.1.1.1.	Toksični efekti na parametre u krvi.....	145
5.1.1.2.	Toksični efekti na jetru.....	148
5.1.1.3.	Toksični efekti na bubrege.....	151
5.1.1.4.	Toksični efekti na mozak.....	154
5.1.1.5.	Toksični efekti na srce.....	157
5.1.1.6.	Toksični efekti na pluća.....	159
5.1.1.7.	Toksični efekti na pankreas.....	159
5.1.1.8.	Toksični efekti na slezinu.....	160
5.1.1.9.	Toksični efekti na testise.....	161
5.1.1.10.	Toksični efekti na femur.....	163
5.1.1.11.	Kritični toksični efekat.....	163
5.1.2.	<i>In silico</i> toksikogenomska analiza smeše olova, kadmijuma, žive i arsena.....	164
<b>5.2.</b>	<b>Protektivno dejstvo probiotika na toksičnost smeše olova, kadmijuma, žive i arsena.....</b>	<b>177</b>
5.2.1.	Hematološki, biohemijski parametri i hormoni.....	177
5.2.2.	Nivoi toksičnih metal(oid) u krvi, fecesu i tkivima.....	180
5.2.3.	Nivoi bioelemenata u krvi, fecesu i tkivima.....	180
5.2.4.	Parametri redoks statusa u krvi i tkivima.....	180
5.2.5.	Aktivnost acetilholinesteraze u mozgu.....	183
5.2.6.	Histopatološke promene u tkivima.....	184
5.2.7.	Mehanizmi dejstva probiotika u ublažavanju štetnih efekata toksičnih metal(oid)a.....	185
5.2.7.1.	Površinsko vezivanje, bioakumulacija i faktori koji utiču na efikasnost.....	185
5.2.7.2.	<i>In vivo</i> mehanizmi (modulacija crevne mikrobiote, antioksidativna svojstva, modulacija imunog sistema).....	186
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>187</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>191</b>
<b>8.</b>	<b>PRILOZI.....</b>	<b>226</b>
8.1.	Prilog 1 – Dodatak rezultati.....	226
8.2.	Prilog 2 – Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije.....	250
<b>9.</b>	<b>BIOGRAFIJA AUTORA.....</b>	<b>251</b>
<b>10.</b>	<b>IZJAVE AUTORA DOKTORSKE DISERTACIJE.....</b>	<b>252</b>

# 1. UVOD

## 1.1. TOKSIČNI METALI

Prirodne i daleko više antropogene aktivnosti dovele su do značajnog zagađenja životne sredine brojnim toksičnim supstancama, među kojima se nalaze i toksični metali i metaloidi. Ove supstance su normalni sastojak Zemljine kore, ali su različite pojave, poput erupcije vulkana, požara, eksplozija, kao i njihova široka primena u brojnim industrijama doprineli da se njihova koncentracija u životnoj sredini značajno poveća. Prisutni su u zemljištu, vodi i vazduhu, akumuliraju se u biljkama i životinjama, što doprinosi sve većoj izloženosti ljudi, i to ne pojedinačnom toksičnom metalu/metaloidu, već njihovim smešama (1). Imajući ovo u vidu, kao i dobro poznat toksični potencijal, Svetska zdravstvena organizacija (SZO) prepoznala je metale olovo (Pb), kadmijum (Cd) i živu (Hg) i metaloid arsen (As) kao supstance od posebnog značaja za javno zdravlje (5). Osim toga, o toksikološkom značaju ovih supstanci u 21. veku, govori i činjenica da su As, Pb, Hg i Cd navedeni na prvom, drugom, trećem i sedmom mestu na Listi prioritetnih supstanci objavljenoj od strane Agencije za registar toksičnih supstanci i bolesti (engl. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, ATSDR) u 2022. godini, a uzimajući za kriterijume toksičnost same supstance, učestalost izloženosti populacije i prisutnost u životnoj sredini (5). Široka upotreba metala trajala je do devedesetih godina prošlog veka, nakon čega se postepeno smanjuje, dok ograničenja i zabrane njihovog korišćenja, kao i prisustva u vodi, hrani i vazduhu, dodatno doprinose njihovom manjem prisustvu u životnoj sredini i smanjenju izloženosti (5).

Uprkos značajnim naporima da se nivoi toksičnih metala i metaloida u životnoj sredini smanje, izloženost Pb, Cd, Hg i As preko zagađene hrane, vode, vazduha, predmeta opšte upotrebe, kao i duvanskog dima i dalje predstavlja rizik po zdravlje ljudi. Dodatno, svojstvo metala da ostaju otporni na razgradnju u prirodnom okruženju predstavlja ključni razlog njihove dugotrajne prisutnosti u životnoj sredini (2). Ovi metal(oid)i nemaju prepoznatu biološku ulogu u ljudskom organizmu i njihovi toksični efekti se ispoljavaju kroz interakciju s različitim fiziološkim sistemima (3,4).

Pokazano je da toksični metali i metaloidi izazivaju niz štetnih efekata po zdravlje ljudi ispoljavajući negativno dejstvo na sve organe i sisteme organa, a posebno na nervni, renalni, respiratorni, reproduktivni i kardiovaskularni sistem. Neki od njih, poput As i Cd su humani karcinogeni, odnosno svrstani su u prvu grupu karcinogena prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje karcinoma (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) (5). Pojedini metali su prepoznati i kao endokrini ometači (5). U organizmu deluju toksično brojnim mehanizmima od kojih su primarni vezivanje za funkcionalne grupe proteina, interakcija sa bioelementima, izazivanje oksidativnog stresa, zatim epigenetski mehanizmi, indukcija inflamacije i apoptoze (6–10). Iako su ovi mehanizmi odavno proučavani još uvek nije dovoljno jasno koji su najznačajniji mehanizmi kojima metali i metaloidi deluju toksično pri produženoj izloženosti niskim dozama, a posebno kada su prisutni u smeši (11,12). Rezultati istraživanja u poslednje dve decenije sve više ukazuju da se izloženost upravo niskim dozama Pb, Cd, Hg i As može dovesti u vezi sa razvojem brojnih bolesti, poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, zatim metaboličkih poremećaja, poremećaja endokrine funkcije, kao i nastanka različitih karcinoma (13).

### 1.1.1. Olovo

Olovo (Pb) je toksični metal koji, zbog svoje široke primene u industriji i rasprostranjenosti u životnoj sredini, predstavlja ozbiljan rizik po zdravlje (14). Njegove jedinstvene karakteristike, kao što su mekoća, velika savitljivost, niska tačka topljenja i otpornost na koroziju, doprinele su širokoj primeni u različitim industrijskim sektorima, uključujući automobilsku industriju, proizvodnju boja, keramike i plastike (12).

Prirodni izvori olova su Zemljina kora, gde se nalazi u stenama, zemljištu i vodi, a u životnu sredinu dospeva kroz procese poput razlaganja stena i vulkanske aktivnosti, pri čemu se često nalazi u obliku minerala, poput galenita (PbS), ali i drugih olovnih ruda (15). Antropogeni izvori olova u životnoj sredini su gradski otpad, kanalizacioni sistemi, termoelektrane, keramička proizvodnja, galvanizacija, upotreba đubriva, pesticida, ali i nekih igračkaka i nameštaja (16). Iako je upotreba olovnih boja postepeno smanjivana od druge polovine 20. veka i zabranjena u mnogim zemljama, one i dalje predstavljaju značajan izvor izloženosti olovu u pojedinim delovima sveta (17) 5). Pored toga, Pb može dospeti u životnu sredinu atmosferskim taloženjem povezanim sa korišćenjem olovnog benzina koji se decenijama koristio zbog poboljšanja performansi motora. Međutim, zbog ozbiljnih zdravstvenih rizika poput neuroloških poremećaja kod dece, njegova upotreba se postepeno smanjivana od 1970-ih godina, dok nije u potpunosti zabranjena 2021. na globalnom nivou (16) 5).

Profesionalna izloženost Pb najčešće se javlja u industrijskim procesima kao što su topljenje i sagorevanje ovog metala, proizvodnji grnčarije, izgradnji čamaca, radu sa cevima od olova reciklaža baterija (rad u sekundarnim topionicama), proizvodnji oružja, kao i upotrebi boja i pigmenata koje sadrže olovne komponente u zemljama gde još uvek nije zabranjena njihova upotreba (17). Opšta populacija je izložena Pb putem zagađene vode, vazduha i hrane, dok dodatne izvore izloženosti predstavljaju prisustvo Pb u predmetima svakodnevne upotrebe, u prašini, kao i izloženost duvanskom dimu (17).

Primarni putevi unosa Pb u organizam su oralni i inhalacioni, dok je apsorpcija kroz kožu takođe moguća, iako manje zastupljena (17). Apсорpcija Pb u gastrointestinalnom traktu zavisi od unosa hrane, pri čemu prisustvo hrane može smanjiti apсорpciju Pb rastvorljivog u vodi, dok određeni nutritivni elementi, poput Ca, Fe,  $PO_4^{3-}$  i Zn, smanjuju njegovu bioraspoloživost (4). Takođe, apсорpcija Pb zavisi od opšteg stanja organizma i starosne dobi, pri čemu deca apсорbuju 4-5 puta više Pb u poređenju s odraslima (5). Deca su posebno osetljiva na uticaj Pb zbog aktivnog procesa razvoja nervnog sistema, kao i specifičnih ponašanja koja povećavaju rizik od izloženosti, poput aktivnosti koja uključuje kontakt ruke sa ustima (5). Nakon apсорpcije, oko 95% Pb se u krvi vezuje za proteine eritrocita, dok preostali deo ostaje u plazmi (5). Iz krvotoka, Pb se dalje distribuira ka različitim ciljnim organima, uključujući centralni i periferni nervni sistem, kardiovaskularni sistem, bubrege, reproduktivni sistem, mišično-skeletne strukture i hematopoetska tkiva (18). Olovo se primarno deponuje u mineralizovanim tkivima, poput kostiju, kod odraslih oko 95%, a kod dece približno 70%, odakle se može osloboditi u krvotok čak i nakon prestanka izlaganja, tokom resorpcije kostiju. Primarno meko tkivo akumulacije Pb je jetra (5). Eliminacija Pb se dominantno vrši putem bubrega, prolazeći kroz proces glomerularne filtracije i tubularne reapsorpcije, dok sekundarni putevi izlučivanja, poput fecesa, znoja, majčinog mleka, semene tečnosti i kose, doprinose znatno manjem delu ukupne eliminacije (5). Eliminacija Pb iz ljudskog organizma odvija se u više faza, što odražava njegovo distribuiranje u različite telesne rezervoare sa specifičnim dinamikama zadržavanja i izlučivanja. U longitudinalnoj studiji sprovedenoj na radnicima u penziji, identifikovane su tri faze eliminacije olova iz krvi sa poluživotima od približno 34 dana (22%), 1,2 godine (28%) i 13 godina (50%), ukazujući na kompleksnu redistribuciju između krvi, mekih tkiva i skeleta. Procene monoeksponencijalnog poluživota olova u kostima iznose oko 16 godina, što potvrđuje ulogu kostiju kao glavnog dugotrajnog rezervoara. Kod dece je eliminacija značajno brža i zavisi od uzrasta: modelovanjem je utvrđeno da poluživot olova u krvi iznosi 6,9 dana kod dece uzrasta 1–3 godine, dok se kod starije dece poluživot produžava na oko 19 dana 5).

Olovo izaziva brojne štetne posledice narušavajući normalne fiziološke procese (17). Izloženost Pb ima posebno nepovoljan uticaj na funkcije nervnog, kardiovaskularnog, hematološkog i reproduktivnog sistema (12,17). Olovo inhibira enzim dehidratazu delta aminolevulinske kiseline ( $\delta$ -ALAD) i ostale enzime koji učestvuju u sintezi hema, te na taj način ometa sintezu hemoglobina i može dovesti do anemije (19). Centralni nervni sistem (CNS) je posebno osetljiv na izloženost Pb i njegovo dejstvo je povezano sa poremećajima ponašanja, smanjenjem kognitivnih sposobnosti,

anksioznošću, depresijom, glavoboljom itd. (20). Izlaganje Pb u kritičnom periodu razvoja kod dece, uključujući prenatalni period, takođe se dovodi u vezu sa intelektualnim deficitom, hiperaktivnošću i razvojnim poremećajima (21). Povišeni nivoi Pb u krvi uočeni su kod pacijenata sa različitim neurološkim bolestima kao što su: Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, amiotrofička lateralna skleroza, depresija, šizofrenija, bipolarni poremećaj itd. (22,23). Štetno dejstvo Pb na renalni sistem ogleda se u smanjenju glomerularne filtracije, oštećenju tubula i nastanku proteinurije (24). Smanjena brzina glomerularne filtracije povezana s prisustvom Pb u krvi, čak i pri koncentracijama manjim od 5 µg/dL, ukazuje na to da Pb utiče na disfunkcije renalnog sistema koje mogu značajno doprineti razvoju hipertenzije i povećanom riziku od kardiovaskularnih bolesti (25). Olovo ostvaruje štetne efekte i na reproduktivni sistem, dovodeći do hormonskih, histoloških i funkcionalnih poremećaja reproduktivnog sistema žena i muškaraca što za posledicu može imati smanjenje plodnosti (26,27).

Mehanizmi toksičnog delovanja Pb u organizmu su kompleksni i uključuju indukciju oksidativnog stresa, jonsku mimikriju, interakcije sa esencijalnim bioelementima, vezivanje za funkcionalne grupe proteina, epigenetske modifikacije, kao i pokretanje inflamatornih procesa i indukciju apoptoze (4,12);5).

Neorganska jedinjenja olova su prema IARC klasifikaciji svrstana u Grupu 2A, što znači da se smatraju verovatno karcinogenim za ljude (5). Ova klasifikacija temelji se na ograničenim dokazima iz epidemioloških istraživanja kod ljudi, kao i na rezultatima studija na životinjama, koje ukazuju na povezanost izloženosti Pb sa razvojem malignih oboljenja (5). Posebno se ističu rezultati istraživanja profesionalne izloženosti koje povezuju dugotrajnu izloženost Pb s povećanim rizikom od karcinoma pluća i drugih maligniteta (5). Karcinogeni potencijal Pb može se objasniti mehanizmima kao što su indukcija oksidativnog stresa, oštećenje DNK i ometanje signalnih puteva odgovornih za regulaciju ćelijskog rasta i apoptoze (5).

### 1.1.2. Kadmijum

Izuzetna savitljivost, duktilnost i električna provodljivost Cd omogućili su njegovu široku primenu u različitim komercijalnim proizvodima, kao što su elektrode, pigmenti, aditivi, stabilizatori i antikorozivna sredstva (28). Sredinom 20. veka u Japanu zabeležen je prvi poznati slučaj masovnog trovanja Cd. Jalovina iz rudnika cinka dospela je u reku, čija je voda korišćena za navodnjavanje pirinčanih polja. Lokalno stanovništvo, čija se ishrana temeljila na pirinču, pretrpelo je ozbiljne posledice u vidu oštećenja i bolova u kostima, spontanih preloma, bubrežne insuficijencije i problema sa gastrointestinalnim sistemom, dok su se mnogi slučajevi trovanja završili i fatalno (29). Bolest je nazvana itai-itai, što na japanskom znači „boli-boli“ ili „jao-jao“ (29).

Značajni prirodni izvori oslobađanja Cd u životnu sredinu su razlaganje stena, čestice tla u vazduhu (poput onih iz pustinja), šumski požari, vulkani, ali i podzemne vode i hidrotermalni izvori (30). Kadmijum je široko korišćen u industriji, prvenstveno kroz proizvodnju nikel-kadmijumskih baterija, što je označilo njegovu primarnu globalnu upotrebu (31). Glavni antropogeni izvori ovog metala uključuju profesionalnu izloženost u industrijama poput metalurgije, gde se koristi za proizvodnju obojenih metala, zatim u proizvodnji pigmentata (kadmijum-sulfata i kadmijum-selenida), kao stabilizator u polivinil plastici, te u industrijama gvožđa, čelika i cementa. Dodatni izvori Cd obuhvataju spaljivanje uglja, komunalnog i kanizacionog otpada, proizvodnju fosfatnih đubriva i primenu u automobilskom sektoru, gde se koristi za galvanizaciju (30,32,33). . Pored toga, značajan doprinos prisustvu Cd u životnoj sredini imaju saobraćajna prašina i korišćenje fosilnih goriva (30,32).

Dramatičan porast proizvodnje i potrošnje proizvoda koji sadrže Cd doveo je do njegovog povećanog oslobađanja u životnu sredinu i izloženosti opšte populacije (33,34). Neke biljke poseduju prirodnu sposobnost akumulacije i biokoncentracije kadmijuma, a među njima se posebno izdvajaju pečurke, pirinač, kakao i zeleno lisnato povrće. S druge strane, kroz zagađenu vodu i

zemljište, Cd dospeva i u druge biljne kulture, poput žitarica i raznih vrsta povrća, čime ulazi u lanac ishrane čoveka (5) (34). Takođe, namirnice koje predstavljaju značajan izvor Cd su školjke i lignje (34).

Glavni put izloženosti Cd je oralni unos kontaminirane hrane, dok inhalaciona izloženost predstavlja značajan rizik, posebno u profesionalnim okruženjima i kod osoba izloženih duvanskom dimu (5). Opšta populacija može biti izložena Cd i kroz vazduh u zagađenim područjima dok je dermalna apsorpcija Cd zanemarljiva (33).

Apsorpcija Cd nakon inhalacionog puta unosa iznosi 5-50%, nakon oralnog 1-10%, a nakon dermalnog 0,5% (5). Na stepen apsorpcije Cd iz digestivnog trakta utiče prisustvo nutrijenata, kao što su proteini i esencijalni metali (35). S obzirom na sličnost hemijske strukture Cd sa esencijalnim metalima kao što su gvožđe (Fe), cink (Zn) i kalcijum (Ca), ovaj element može ulaziti u ćelije putem mimikrije (35). Takođe, Cd i Zn mogu se vezivati za iste proteine u krvi (albumin) i u tkivima (metalotionein), pri čemu dolazi do kompeticije za ulaz u ćelije (35). Kadmijum se u krvi vezuje za eritrocite u kompleksima sa proteinima velike molekulske mase poput albumina, dok se manji deo nalazi u slobodnom obliku (36). Akumulacija Cd vrši se uglavnom u jetri i bubrezima, gde je prisutan u obliku vezanom za metalotioneine (5). Pored jetre i bubrega, Cd se akumulira u plućima, mišićima, masnom tkivu, kostima, koži, pankreasu, testisima (36). Eliminacija Cd je izuzetno spora i primarno se vrši putem u urina i fecesa (5). Zbog kumulativnih svojstava Cd, opterećenje organizma ovim metalom progresivno se povećava tokom života. Biološko poluvreme Cd u ljudskom telu je oko 30 godina, što omogućava dugotrajno prisustvo i ispoljavanje toksičnih efekata na različite organe (5).

Toksičnost Cd se manifestuje na različite načine, a prevashodno oštećenjem bubrega, uzrokujući proteinuriju, gubitak Ca i tubularne lezije (33). Ovi efekti nastaju usled oštećenja ćelijske strukture i narušene funkcionalnosti proksimalnih tubula, što dovodi do gubitka aminokiselina, enzima i proteina putem urina. Kada su zaštitni kapaciteti metal-vezujućih proteina poput metalotioneina iscrpljeni, slobodni Cd direktno interaguje sa organelama i biološkim makromolekulima unutar ćelija, izazivajući oksidativni stres, apoptozu i strukturne poremećaje (5). Hronična izloženost ovom metalu može dovesti do značajnih poremećaja funkcije respiratornog sistema, uključujući razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća, progresivne fibroze plućnog tkiva, kao i povećanog rizika od karcinoma pluća (33,37). Poznato je da Cd izaziva demineralizaciju kostiju i osteoporozu usled narušavanja metabolizma Ca (36). Kadmijum negativno utiče na kardiovaskularni sistem doprinoseći razvoju hipertenzije inhibicijom endotelne sintaze azot(II)-oksida i ometanjem vaskularne relaksacije posredovane acetilholinom (38,39). Istraživanja sugerišu da Cd ima direktan uticaj na pankreas, pri čemu postoje dokazi da Cd može uticati na regulaciju lučenja insulina iz beta-ćelija pankreasa i povećava aktivnost enzima odgovornih za glukoneogenezu (40). Kadmijum negativno utiče i na reproduktivni sistem, ometajući adheziju ćelija u testisu i migraciju germinativnih ćelija kroz epitel seminifera (39,41). Izloženost Cd utiče na poremećaje razvoja muškog reproduktivnog sistema (kriptorhizam, hipospadija), kao i poremećaju koncentracije testosterona u plazmi, te broja i pokretljivosti spermatozoida (33,41). Takođe, Cd ispoljava izraženu neurotoksičnost u centralnom i perifernom nervnom sistemu (33,42). Ovaj metal u mozgu može izazvati oštećenje ćelija, lipidnu peroksidaciju i inhibiciju aktivnosti monoamino oksidaze (MAO), što dovodi do povećanog stvaranja slobodnih radikala i slabljenja antioksidativne zaštite (33). Ovi procesi mogu utiču na poremećaje pažnje, pamćenja, psihomotorike, a dugotrajna izloženost Cd može biti povezana sa razvojem neurodegenerativnih bolesti poput Alchajmerove, Parkinsonove, Hantingtonove bolesti, ALS-a i multiple skleroze (33). Na ćelijskom nivou, Cd remeti proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu, dok su posebno značajni mehanizmi koji uključuju narušenu reparaciju DNK i povećanu produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (5). Dodatno, Cd se svrstava u metalohormone i endokrine ometače zato što imitira steroidne hormone, posebno estrogen, vezujući se za estrogenske receptore (ER $\alpha$  i GPER) i aktivira estrogene puteve signalizacije (5). Time

narušava hormonsku ravnotežu, a hronična izloženost povezana je s povećanim rizikom od hormonski zavisnih carcinoma, poput carcinoma dojke i endometrijuma (5).

Kadmijum ostvaruje svoj toksični efekat brojnim mehanizmima koji utiču na različite biološke procese, uključujući proliferaciju ćelija, diferencijaciju i apoptozu, kao i mehanizme popravke DNK. On uzrokuje smanjenje nivoa redukovano glutationa (GSH), vezuje se za sulfhidrilne (SH) grupe proteina i izaziva povećanu proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika, kao što su superoksidni joni, vodonik peroksid i hidrokسيلni radikali. Takođe, Cd inhibira aktivnost važnih antioksidativnih enzima, među kojima su CAT, Mn-SOD i CuZn-SOD (43). Osim toga, Cd se vezuje za mitohondrije, čime može ometati ćelijsko disanje i oksidativnu fosforilaciju (44,45).

Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma svrstava jedinjenja Cd u Grupu 1, što ukazuje na dovoljno dokaza o karcinogenosti kod ljudi (5). Epidemiološke studije su ustanovile povezanost između izloženosti kadmijumu i razvoja karcinoma pluća, kao i povećanog rizika od razvoja karcinoma prostate, bubrega, mokraćne bešike, dojke, pankreasa i nazofarinksa (36)(5). Mehanizmi koji su u osnovi karcinogeneze izazvane Cd uključuju genotoksične efekte stvaranjem reaktivnih vrsta kiseonika koje dovode do oštećenja i poremećaja mehanizama popravke DNK, kao i mutacija koje mogu pokrenuti tumorogenezu i ometanje signalnih puteva koji regulišu ćelijski rast i apoptozu (36,39).

### 1.1.3. Živa

Živa je toksični metal koji postoji u različitim oblicima, kao elementarna živa ( $Hg^0$ , u obliku metala i pare), soli žive ( $Hg^+$  i  $Hg^{2+}$ ) i organska živa (jedinjenja u kojima je Hg vezana za strukturu koja sadrži atome ugljenika (metil, etil, fenil ili slične grupe) (46).

Jedinjenja Hg nalaze široku primenu, posebno u industrijskim procesima i rudarstvu, naročito tokom procesa ekstrakcije zlata (14,47). Organometalna jedinjenja nekada su se koristila kao fungicidi za zaštitu biljaka od različitih infekcija, ali su danas uglavnom zabranjena ili strogo ograničena zbog njihove visoke toksičnosti i akumulacije u životnoj sredini (14). Elementarna Hg se ranije koristila u industriji i u proizvodnji fluorescentnih sijalica. Iako je u tečnom stanju na sobnoj temperaturi, zbog svoje visoke isparljivosti lako prelazi u gasovitu formu, pri čemu nastaju pare koje su znatno toksičnije od tečnog oblika Hg (14). Takođe,  $Hg^0$  se može osloboditi i razbijanjem toplomera i termometara koji sadrže Hg, pri čemu udisanje živinih para može imati fatalne posledice, što je dovelo i do zabrane korišćenja u ove svrhe (14). Zabrinutost zbog globalne kontaminacije živom, posebno u obliku metil-žive (MeHg) koja se akumulira u ribi i morskim plodovima i prenosi kroz prehrambene lance, dovela je do donošenja Minamata konvencije 2013. godine, koja je stupila na snagu u avgustu 2017. godine 5. Ključni uzroci koji su pokrenuli ovu međunarodnu inicijativu su povećane antropogene emisije Hg iz sagorevanja uglja, industrijskih procesa i naročito aktivnosti malih i zanatskih rudnika zlata, koje predstavljaju značajan izvor izloženosti ljudi u zemljama sa niskim i srednjim приходima 5. Informacije o toksičnosti žive, njenoj metilaciji u ekosistemima i bioakumulaciji u organizmima, kao i sposobnosti da se transportuje na velike udaljenosti putem atmosfere, stvorile su osnovu za donošenje sveobuhvatnog međunarodnog sporazuma 5. Minamata konvencija postavila je ciljeve za ograničavanje emisija u vazduh, ispuštanja u vode i upotrebe žive, što je doprinelo merljivom smanjenju prisustva ovog toksičnog elementa u životnoj sredini 5. Tokom istorije, Hg je imala značajnu ulogu u medicini, ali su je vremenom zamenili sigurniji farmaceutski preparati (Balali-Mood et al. 2021; Zhao et al. 2022). Na primer, organska jedinjenja Hg korišćena su kao diuretici, dok je fenilživa nitrat bio upotrebljavan kao dezinfekciono sredstvo (14,48). Iako je upotreba žive u kozmetičkim proizvodima zabranjena u mnogim zemljama zbog zdravstvenih rizika, određene kreme za izbeljivanje kože i sapuni i dalje mogu sadržati male količine Hg. Ovi proizvodi, često dostupni na neformalnim tržištima ili putem interneta, predstavljaju značajan rizik za korisnike (5 ; (14,48). Jedan od glavnih aktivnih sastojaka u ovim proizvodima, živa(II)-hlorid ( $HgCl_2$ ), koristila se za tretiranje hiperpigmentacija koje nastaju

zbog prekomerne proizvodnje melanina (14,48). Osim toga, organsko jedinjenje žive poznato kao tiomersal koristi se kao konzervans u višedoznim pakovanjima vakcina (14,48). Opšta populacija je u najvećoj meri izložena Hg putem ishrane (prvenstveno kontaminirane ribe, morskih plodova, pečuraka), ali i iz životne sredine u zagađenim područjima (49); 5).

Put unosa elementarne Hg je primarno inhalacija njenih isparenja, dok neorganske soli i organski oblici žive, osim putem respiratornog trakta, ulaze u organizam uglavnom putem oralnog unosa, pri čemu se organske forme Hg značajno efikasnije apsorbuju u poređenju s neorganskim solima (5). Metilživa predstavlja najčešći oblik organske žive u lancu ishrane (5). Zbog svojih svojstava akumulacije u živim organizmima, posebno kod riba, može doći do biomagnifikacije (49,50). Riba na vrhu lanca ishrane, poput tune, sabljarke ili ajkule, mogu akumulirati značajne količine Hg u svojim tkivima zbog ishrane manjim ribama koje sadrže živu u svom organizmu (49).

Elementarna Hg je veoma isparljiva i liposolubilna te lako prolazi krvno-moždanu barijeru. Vezuje se za eritrocite i proteine plazme i brzo oksiduje u  $Hg^{++}$  (5). Neorganska Hg, slično kao i elementarna forma, u krvi se vezuje prvenstveno za SH grupe, prisutne u molekulima GSH, metalotioneina (MT) i proteina poput albumina. Većim delom se nalazi unutar eritrocita vezana za ove strukture, dok se manji deo može detektovati u plazmi, uglavnom u obliku reverzibilnih kompleksa sa albuminom (51). Neorganska Hg se nagomilava u bubrezima i jetri, ali ne prolazi krvno-moždanu barijeru u velikoj meri (49);5). Živa u organskom obliku (aril-, kratkolančana i dugolančana alikil jedinjenja) je liposolubilna, vezuje se za SH grupe, formira komplekse sa cisteinom, često se nalazi u lancu ishrane i skoro potpuno se apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta (90-95%) (52). Aril-živa i dugolančana alikil jedinjenja Hg konvertuju se do  $Hg^{++}$ , dok kratkolančana jedinjenja žive ostaju stabilna (49,53). Akumulacija organskih jedinjenja Hg se dominantno vrši u mozgu, bubrezima, jetri, ali i kosi i koži (49); 5). Najznačajniji putevi eliminacije Hg su urin, feces i kosa (52); 5). Poluživot Hg u ljudskom organizmu značajno varira u zavisnosti od njenog hemijskog oblika i puta izloženosti. Kod ljudi izloženih metil-živi, prosečan poluživot eliminacije iz krvi iznosi između 44 i 75 dana, dok se eliminacija procenjuje na približno 70 dana (5). Terminalni poluživot inhalaciono unete  $Hg^0$  u organizmu varira od 30 do 90 dana. Neorganski oblici žive imaju prosečan poluživot eliminacije od 75,9 dana (raspon 49–120 dana) (5).

Kratkotrajna izloženost parama elementarne Hg može dovesti do teške upale pluća i respiratorne insuficijencije zbog plućnog edema (54), dok su neurološki i renalni efekti najznačajniji efekti hronične izloženosti ovom obliku Hg (55). Od neuroloških efekata uočeni su tremor, problemi u vidu, poremećena nervna provodljivost i brzina motorne koordinacije, smanjen kognitivni učinak, kao i promene raspoloženja, razdražljivost i nervoza, dok su epidemiološke studije utvrdile smanjenje glomerularne filtracije i oštećenje tubula u bubrezima (5).

Na toksičnost neorganskih soli Hg utiče njihova rastvorljivost. Jednovalentne soli Hg su, zbog smanjene rastvorljivosti, manje toksične od dvovalentnih soli (55). Akutna izloženost neorganskim solima Hg dovodi do gastrointestinalnog distresa i oštećenja bubrega, a ova forma Hg generalno deluje kao iritans kože (55). Ciljni organ hronične toksičnosti izazvane neorganskim solima Hg jeste bubreg. Klinička manifestacija trovanja neorganskim solima Hg obuhvata poliuriju i proteinuriju, dok u težim slučajevima može doći do razvoja nefritičkog sindroma i pojave hematurije i anurije (56). Hronična izloženost neorganskim solima Hg negativno utiče i na nervni, kardiovaskularni, imunološki i reproduktivni sistem (5).

Organskim jedinjenja Hg imaju slične kliničke manifestacije kao i elementarna Hg, dok su štetni efekti uporedivi sa efektima izloženosti neorganskim solima Hg (53). Neurološki i neurorazvojni efekti organskih jedinjenja Hg predstavljaju najosetljivije posledice izloženosti organskoj Hg (5). Živa, bez obzira na oblik, predstavlja ozbiljan rizik za fetus, pri čemu metilživa ima najveću sposobnost prodiranja kroz placentu. Čak i u slučajevima kada majka ne pokazuje simptome, izloženost ovoj supstanci može dovesti do toksičnih efekata na plod, ili do spontanog pobačaja

(53); 5). Svetska zdravstvena organizacija naglašava da izloženost fetusa metilživi može dovesti do zaostajanja u razvoju i kognitivnih oštećenja kod dece ().

Živa reaguje sa sulfhidrilnim grupama u celom organizmu i štetno utiče na ćelijske funkcije (51). Takođe, Hg remeti funkcije endoplazmatskog retikuluma i ribosoma, i posledično se narušava proces transkripcije DNK i sinteze proteina (49,57). Studije ukazuju da Hg oštećuje brojne strukture u centralnom i perifernom nervnom sistemu, izaziva poremećaje u funkciji i oslobađanju neurotransmitera i pojavu ekscitoksičnosti (49,56,58). Metil-živa je povezana sa smanjenjem aktivnosti prirodnih ćelija ubica (NK ćelija) i poremećajem u ravnoteži između Th2 i Th1 odgovora, što pogoduje razvoju autoimunskih reakcija (49). Neorganska živa ( $\text{HgCl}_2$ ) i  $\text{Hg}^0$ , nakon konverzije u  $\text{Hg}^{2+}$ , takođe ispoljavaju imunotoksične efekte kroz aktivaciju B-ćelija, produkciju autoantitela i promene u citokinskom profilu. Takođe, Hg izaziva generisanje slobodnih radikala, uzrokuje oštećenja mitohondrija, remeti integritet različito lokalizovanih ćelijskih membrane (49). Dodatno, postoje studije koje ukazuju da Hg remeti sintezu hema (49).

Iako IARC ne klasifikuje elementarnu živu i neorganska jedinjenja žive kao karcinogene, raste zabrinutost u vezi sa njenim potencijalnim indirektnim genotoksičnim efektima (59). S obzirom na nedostatak dokaza kod ljudi, nedostatak dokaza za elementarnu živu kod eksperimentalnih životinja, i ograničene dokaze za živa(II)-hlorid u studijama na eksperimentalnim životinjama, ova jedinjenja spadaju u Grupu 3 prema IARC klasifikaciji. Međutim, jedinjenja metil-žive su na osnovu dokaza kod eksperimentalnih životinja i neadekvatnih dokaza kod ljudi klasifikovani kao „verovatno karcinogena za ljude“ i svrstani su u Grupu 2B prema IARC klasifikaciji (59).

#### 1.1.4. Arsen

Arsen je poznat po svojim toksičnim efektima od davnina (60). Međutim, kroz istoriju je poznato i da je arsen korišćen u medicinske svrhe kao hemoterapeutik u lečenju karcinoma kože, dojke i leukemije (61). Takođe, primenjivan je u tretmanu različitih bolesti, poput astme, malarije, sifilisa, ekcema i psorijaze (62).

Profesionalna izloženost As može se javiti tokom procesa kao što su topljenje metala poput bakra i olova, obrada drveta ili primena pesticida. Opšta populacija je arsenu izložena primarno putem kontaminirane vode za piće, ali i zagađenog vazduha u rudarskim područjima, unošenjem kontaminirane hrane i udisanjem duvanskog dima.

U morskim plodovima As je prisutan u organskom obliku, poput arsenobetaina i arsenošećera, za koji se smatra da je manje toksičan u poređenju s neorganskim arsenom, kao što su arsenati i arseniti, koji se mogu naći u kontaminiranoj vodi za piće (60,63).

Put unosa As kod ljudi može biti oralni, inhalacioni i dermalni (64). Kod opšte populacije, najčešći načini unosa arsena su oralni, kroz konzumaciju vode i hrane, i izloženost preko vazduha, u područjima koja su kontaminirana ovim elementom (64).

Neorganske soli As se dobro apsorbuju iz gastrointestinalnog trakta, ili uneta inhalacijom, dok je dermalna apsorpcija niža. Arsen podleže promenama oksidacionog stanja, naročito između petovalentnog (+5) i trovalentnog (+3) oblika (65). Takođe, nakon apsorpcije As prolazi kroz proces biotransformacije – oksidaciju i metilaciju (65).

Dakle, neorganski arsenat ( $\text{As}^{5+}$ ) može se redukovati uz pomoć GSH ili drugog redukujućeg agensa, pri čemu nastaju neorganski arsenit ( $\text{As}^{3+}$ ) i glutation-disulfid. Arsenit ( $\text{As}^{3+}$ ) se potom transformiše u petovalentnu monometilarsonsku kiselinu, proces koji katalizuje enzim arsen-3-metiltransferaza, dok S-adenozil metionin služi kao donor metilne grupe. Tokom ovog postupka, S-adenozil metionin se razlaže na S-adenozil homocistein. Nadalje, petovalentna monometilarsonska kiselina se

redukuje u trovalentnu monometilarsinsku kiselinu uz posredovanje tioredoksina, dok naredni metilacioni korak vodi ka formiranju dimetilarsinske kiseline (66). Arsen se distribuira do različitih tkiva u ljudskom organizmu, a utvrđeno je da su nakon oralnog unosa najviše koncentracije arsena u jetri, a manje u bubregu, mišićima, srcu, slezini, pankreasu, plućima i mozgu. Arsen se uglavnom eliminiše putem urina, pri čemu je dimetilarsenska kiselina (DMA) najdominantniji oblik, dok su prisutni i neorganski arsen (+3 i +5) i monometilarsonska kiselina (MMA), dok se manje količine As se izlučuju putem fecesa (65). Deponovanje As u tkivima zavisi od efikasnosti i brzine metilacije (65). Poluživot As u ljudskom organizmu zavisi od njegove hemijske forme i načina izloženosti, ali se procenjuje da iznosi između 40 i 60 sati. Većina unetog neorganskog As se relativno brzo eliminiše putem urina – oko 45 do 85% u roku od 1 do 3 dana. Kod pojedinih jedinjenja, kao što je  $As_2O_3$ , eliminacija može biti bifazna, sa brzom fazom eliminacije (poluvreme oko 29 minuta) i sporijom fazom koja može trajati i do 75 dana. Brzina eliminacije je naročito izražena kod akutne inhalacione izloženosti, gde se nivoi As u urinu menjaju u skladu sa smenama izloženosti.

Toksični efekti As su kompleksni i mogu obuhvatiti različite organske sisteme. Akutna izloženost As obično se manifestuje naglo i uključuje simptome poput povraćanja, jakog bola u stomaku i dijareje. U težim slučajevima, mogu se javiti i neurološki simptomi poput utnulosti, trnjenja ekstremiteta, grčeva u mišićima, a u ekstremnim situacijama i smrt. Hronična izloženost As se takođe povezuje s progresivnim i ozbiljnijim posledicama uključujući kardiovaskularne bolesti, hiperkeratoze, poremećaje nervnog i perifernog vaskularnog sistema, hiperpigmentacije, poremećaje cirkulacije, poremećaje jetre i bubrega (67). Dermatološke promene, poput hiperpigmentacije i keratoze, često predstavljaju prve znake hronične izloženosti arsenu, pri čemu ove lezije mogu prethoditi razvoju karcinoma kože (67). Dugotrajno izlaganje može takođe dovesti do neuroloških oštećenja, pri čemu se najčešće primećuje oštećenje perifernog nervnog sistema koje izaziva slabost i poremećaj senzorne funkcije (67). Uz to, hronična izloženost As povezana je s povećanim rizikom od kardiovaskularnih oboljenja, uključujući hipertenziju i srčane bolesti (67). Pored ovih stanja, prisustvo As u organizmu povezuje se sa razvojem dijabetesa i ateroskleroze, hepatotoksičnošću i nefrotoksičnošću (66).

Vezivanje As za proteine i akumulacija u različitim ćelijama su ključne karakteristike za ispoljavanje toksičnih efekata arsena. Do sada je poznato da trovalentni As ima visok potencijal da se veže za SH grupe i da inhibira preko 200 enzima (68). Vezivanje As za proteine koji sadrže Zn, konkretno za "cinkove prste" (engl. *zinc-finger*), domene u čijoj strukturi  $Zn^{2+}$  stabilizuje konfiguraciju proteina kroz vezivanje za cisteinske i/ili histidinske ostatke, predstavlja značajan mehanizam toksičnosti. Arsen, naročito u formi metilovanih trivalentnih metabolite (monometilarsonska kiselina ima veći afinitet za ove strukture od trovalentnog arsena), indirektno interaguje sa Zn tako što konkuriše za iste tiolne grupe, izbacuje  $Zn^{2+}$  iz proteinske strukture i time narušava funkciju ovih protein (66). Mehanizmi toksičnosti As uključuju i ometanje metaboličkih procesa u mitohondrijama, smanjenje proizvodnje adenzin-trifosfata, inhibiciju reduktaza i akumulaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (66)).

Arsen je klasifikovan kao karcinogen Grupe 1 prema IARC, na osnovu dokaza o njegovoj karcinogenosti kod ljudi. Epidemiološke studije dosledno ukazuju na jasnu povezanost između izloženosti arsenu i razvoja malignog oboljenja, kako pri inhalacionoj, tako i pri oralnoj izloženosti. Pri inhalaciji, primarno se pri profesionalnoj izloženosti javljaju maligna oboljenja respiratornog sistema, dok kod opšte populacije koja je hronično izložena arsenu putem vode za piće, najčešći su maligniteti kože. Posebno je značajno da su populacije koje su bile hronično izložene visokim koncentracijama As putem vode za piće zadržale povećane stope obolevanja od karcinoma čak i decenijama nakon smanjenja nivoa izloženosti. Takođe, zabeležena je i povećana incidenca tumora ostalih organa, naročito tumora bešike, i manje zastupljenih karcinoma jetre, bubrega, prostate i gastrointestinalnog trakta (67). Mehanizmi karcinogenog delovanja arsena uključuju indukciju

oksidativnog stresa, oštećenje DNK i disfunkciju signalnih puteva odgovornih za regulaciju ćelijskog rasta i apoptoze.

## 1.2. TOKSIČNOST SMEŠE METALA

Većina studija u kojima se ispituje toksičnost, odnosi se na pojedinačne metale. Međutim, u realnom okruženju ljudi su istovremeno izloženi većem broju metal(oid)a, što ukazuje da bi pri proceni rizika trebalo posmatrati smeše, a ne pojedinačne metal(oid)e (69), posebno iz razloga što eksperimentalna istraživanja pokazuju da se toksični efekti koji nastaju kao rezultat izloženosti smeši metal(oid)a razlikuju od onih povezanih sa izloženošću pojedinačnom toksičnom metal(oid)u (70–72).

Rezultati studije na HepG2 ćelijama, gde su binarne smeše As, Cd, Pb i benzopirena izazvale povećanu proizvodnju ROS-a, smanjenje nivoa GSH i značajan sinergistički efekat na citotoksičnost u poređenju sa pojedinačnim supstancama, ukazuju da izloženost binarnim smešama supstanci dovodi do štetnih efekata koji se razlikuju od onih nakon izlaganja pojedinačnim toksičnim supstancama, sugerišući na potrebu za detaljnijom procenom rizika ovakvih smeša po ljudsko zdravlje (73). Studija na miševima pokazala je da kombinovano izlaganje Pb-As tokom 14 dana povećava preuzimanje Pb i uzrokuje oslobađanje dopamina, dok je studija na pacovima perinatalno (od 6. dana gestacije do 21. postnatalnog dana) izloženim smeši Pb i As uzrokovala oksidativni stres i apoptozu u mozgu (74,75). Takođe, postoje i istraživanja koja sugerišu da istovremena izloženost As, Pb i Cd dovodi do efekta većeg od aditivnog (72). Još osamdesetih godina 20. veka ispitivan je uticaj toksičnih metala na ponašanje dece i uočene su značajna Pb-As i Pb-Cd interakcije koje su povezane sa problemima u ponašanju, što je potvrđeno i u studiji koja je ispitivala uticaj metala na ponašanje dece školskog uzrasta gde je uočena interakcija između Pb i As. Sinergistički efekat ovih metal(oid)a je dodatno povećao rizik od teškoća sa pažnjom, agresivnog ponašanja i smetnji u ponašanju dece.

Izvesna istraživanja ukazuju da neke smeše toksičnih supstanci imaju sinergističke, aditivne i/ili antagonističke efekte na različitim *in vivo* modelima (76–78). Istraživanje na račiću *Amphiascus tenuiremis* analiziralo je akutnu toksičnost Cd, Cu, Ni, Pb i Zn u 96-časovnom sedimentnom bioeseju. Utvrđeno je da smeša metala ima sinergistički efekat, povećavajući smrtnost za 1,39 puta u odnosu na očekivanu aditivnu toksičnost (76). Rezultati ispitivanja akutne toksičnosti na larvama ribe *Pimephales promelas* pokazali su da su sve binarne smeše ispitivanih metala (Cu+Zn, Cu+Ni i Zn+Ni) ispoljile pretežno sinergističke efekte, pri čemu je najizraženiji efekat zabeležen kod smeše Cu+Ni (77). Na modelu vodene biljke *Spirodela polyrrhiza*, smeša Cu, Cr, Cd, Ni, Mn, Zn i Pb ispoljila je sinergistički efekat, pri čemu je indeks toksičnosti smeše (MTI, Mixture Toxicity Index) iznosio 2,6 (78). Nasuprot tome, kod kopnene biljke *Lepidium sativum*, analiza toksičnosti iste smeše pokazala je aditivni efekat (78). U određenim koncentracijama, posebno nižim, interakcija metala u smeši imala je antagonistički efekat kod *Lepidium sativum*, smanjujući očekivani toksični uticaj pojedinačnih elemenata (78).

Studija sprovedena na pacovima pokazala je da intravensko izlaganje različitim kombinacijama Hg, Cd, Pb i As tokom tri dana utiče na distribuciju ovih metala u ciljnim organima, kao što su bubrezi, jetra, mozak i krv. Rezultati sugerišu da smeše metala mogu smanjiti akumulaciju pojedinačnih metala, dok izloženost kombinaciji Pb i As dovodi do povećanja koncentracije ovih metala, naročito u jetri (79). Stoga je za očekivati da su studije koje procenjuju efekat smeša toksičnih metala i metaloida ključne za sveobuhvatnije razumevanje uticaja ovih supstanci iz životne sredine na zdravlje ljudi (79).

Mnogi štetni efekti toksičnih metala i metaloida i njihovih smeša ispitivani su u prethodnim istraživanjima, uključujući efekte na različite organe, poput bubrega, jetre, pluća, krvi, mozga, kao i na endokrini sistem i pojava različitih vrsta karcinoma koji nastaju pri izloženosti ovim

supstancama (80,81,90,82–89). Međutim, u većini istraživanja ispitivano je dejstvo relativno visokih doza pojedinačnih supstanci, ili pak visokih doza u smešama, dok nema dovoljno dostupnih podataka o štetnim dejstvima niskih doza smeša toksičnih metala i metaloida (91,92). Na primer, u studiji na Sprague-Dawley pacovima, tretiranim jednokratno oralnom dozom smeše osam metala (Zn, Cu, Mn, Cr, Ni, Cd, Pb, Hg) u dozi od 215, 464 ili 1000 mg/kg telesne mase, uočeno je da visoke doze izazivaju sistemsku toksičnost, uključujući oštećenje hematološkog sistema, hepatičnu i bubrežnu disfunkciju, poremećaj elektrolita, neurološke deficite i povećanu smrtnost pacova (93). Takođe, studija na *Wistar* pacovima je pokazala da izloženost smeši teških metala (Cd u dozi 2,3 mg/kg t.m. (telesne mase), Hg u dozi 1 mg/kg telesne mase, Pb u dozi 40 mg/kg telesne mase) kod pacova dovodi do gubitka telesne mase, histopatoloških promena i oksidativnog stresa u različitim organima (94). Ipak, u poslednje vreme sve više se prepoznaje značaj istraživanja efekata niskih doza smeša metala, kao i određivanja referentnih *Benchmark* doza za njihove toksične efekte (95–100).

U procesu toksikološke procene rizika po zdravlje ljudi jedan od ključnih koraka predstavlja ispitivanje odnosa između doze i jačine izazvanog toksičnog efekta kao i određivanje doze ispitivane supstance koja će se koristiti kao polazna osnova za evaluaciju odnosa izloženosti i toksičnog odgovora za efekte sa pragom. Najviša doza koja ne izaziva štetan efekat (engl. *No observed adverse effects level*, NOAEL) se dugo koristila kao polazna doza, međutim, Evropska agencija za bezbednost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) i SZO sugerišu zamenu NOAEL vrednosti *Benchmark* dozom (BMD) (101,102). *Benchmark* doza predstavlja statističku donju granicu pouzdanosti doze koja dovodi do malog povećanja efekta (5-10%) u odnosu na kontrolnu vrednost. *Benchmark* pristup je razvijen kao savremena alternativa NOAEL pristupu, imajući u vidu da *Benchmark* pristup daje širok opseg podataka o odnosu doza-odgovor i omogućava kvantifikaciju nesigurnosti što *Benchmark* pristup čini naučno naprednijom metodom od tradicionalnog NOAEL pristupa (101,103).

U poslednje poseban izazov predstavlja rasvetljavanje mehanizama toksičnosti sve većeg broja hemikalija i njihovih smeša (104), posebno toksičnih metala i metaloida poput Pb, Cd, Hg i As (105). Istovremeno, postoji potreba za smanjenjem upotrebe eksperimentalnih životinja, troškova i vremena testiranja, uz unapređenje razumevanja toksičnih mehanizama putem procene načina delovanja (MoA) (106). U tom kontekstu, *in silico* pristupi nude značajne prednosti, jer omogućavaju predviđanje bioloških efekata na osnovu bioinformatičkih analiza i modeliranja interakcija između hemikalija, gena i proteina. S obzirom na to da toksikogenomika istražuje vezu između gena i izloženosti iz okoline kombinovanjem bioinformatike sa klasičnom toksikološkim ispitivanjima (107,108)(Boverhof and Zacharewski 2006; Tung et al. 2020), ona može identifikovati ključne molekularne puteve uključene u toksične efekte i predložiti potencijalne biomarkere za dalja *in vitro* i *in vivo* istraživanja (109,110). Ovi pristupi omogućavaju dublje razumevanje složenih interakcija unutar smeša toksičnih metala i doprinose preciznijem predviđanju rizika po zdravlje.

### 1.3. PROTEKTIVNO DEJSTVO PROBIOTIKA

Za opštu populaciju, posebno za osobe koje nisu aktivno ili pasivno izložene duvanskom dimu, hrana se smatra jednim od glavnih puteva unosa toksičnih metala i metaloida u organizam (Mudgal et al. 2010). Stoga bi pronalazak agensa koji bi svojim prisustvom u gastrointestinalnom traktu sprečio apsorpciju toksičnih metala i metaloida ili umanjio njihove štetne efekte mogao biti ključan u zaštiti ljudi od štetnih efekata ovih supstanci (111). Do sada je pokazano da vitamini, antioksidansi i mnoge fitohemikalije deluju protektivno protiv toksičnih metala (112–114), dok probiotske kulture (živi mikrobiotski dodatak ishrani) teže da nađu svoje mesto među ovim supstancama. Mnogobrojni korisni efekti probiotskih kultura po zdravlje ljudi dobro su poznati, uključujući njihovo blagotvorno dejstvo na krvni pritisak, nivo glukoze, holesterola, triglicerida, itd. (115). Takođe, nekoliko studija pokazalo je sposobnost *Lactobacillus* (LAB) vrsta, uključujući

*Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus rhamnosus*, da povećavaju procenat izlučivanja različitih toksičnih supstanci iz organizma i na taj način ublaže njihove štetne efekte po zdravlje ljudi (116). Zahvaljujući strukturi svog ćelijskog zida, koja sadrži manan-oligosaharide i glukane, izvesne LAB su sposobne da u određenom procentu efikasno vežu i uklone toksične metale poput Cd, Pb i Mn i drugih metala iz hrane fizičkom adsorpcijom (117–120), ali i iz gastrointestinalnog trakta, smanjujući njihovu apsorpciju i, verovatno, povećavajuću eliminaciju putem fecesa (121). Takođe, ispitivanja sprovedena kod ljudi utvrdila su da suplementacija *Lactobacillus rhamnosus GR-1* smanjuje nivoe Hg i As u krvi trudnica i dece (122), što je povezano sa hemijskom strukturom ćelijskog zida bakterija, posebno sa hidrofobnim grupama i grupama koje doniraju elektrone (123). Osim kod ljudi, pozitivni efekti probiotskih kultura pokazani su i u eksperimentima na životinjama. Sojevi *Lactobacillus plantarum* su se pokazali kao agensi koji smanjuju toksične efekte Pb i Cd na modelu miševa time što vrše intestinalnu sekvencijaciju i zaštitu crevne barijere (124). Na istom eksperimentalnom modelu, značajan protektivni efekat na oksidativni stres indukovani primenom Cd u jetri i bubrezima ostvario je *Lactobacillus plantarum CCFM8610* (125), dok je *Lactobacillus plantarum CCFM8661* pokazao sposobnost da podstakne povećanu eliminaciju toksičnih metala putem fecesa (Pb, Cd i Hg) povećanjem peristaltike, kao i podsticanjem sinteze i ekskrecije žučnih kiselina u feces (126). Na modelu pacova pokazano je protektivno dejstvo *Lactobacillus plantarum* nakon intoksikacije živom (127). Takođe, dokazana je i sposobnost probiotskih kvasaca, kao što su *Saccharomyces boulardii* i *Saccharomyces cerevisiae*, da površinski vežu različite toksične supstance, naročito mikotoksine, kao i da smanjuju bioraspoloživost nekih metala (117,128), međutim nema dovoljno dostupnih podataka o ispitivanjima dejstva soja *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* na umanjeње štetnih efekata toksičnih metala, kao i smanjenje toksičnih efekata koje izazivaju njihove smeše, pri istovremenoj izloženosti većem broju toksičnih metala (129–131).

Iako postoje dokazi o pozitivnom dejstvu određenih probiotskih vrsta na umanjeње toksičnih efekata pojedinih metala i metaloida, studije o sposobnosti probiotika da ublaže štetne efekte smeše toksičnih supstanci su veoma ograničene. Osim toga, dosadašnji literaturni podaci se zasnivaju na ispitivanju pojedinačnih probiotskih vrsta, dok je nedovoljno podataka o dejstvu smeše probiotskih vrsta (*Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* LP 6595 i *Lactobacillus plantarum* HEAL9) na umanjeње štetnih efekata pri izloženosti smeši toksičnih metala. Do sada nisu sprovedena uporedna istraživanja uticaja probiotskih kultura (probiotskih bakterija i/ili probiotske gljivice) na umanjeње štetnih efekata smeše Pb, Cd, Hg i As.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu da su ljudi hronično izloženi niskim nivoima toksičnih supstanci putem različitih izvora, a da se podaci o toksičnosti iz dosadašnjih animalnih studija uglavnom baziraju na izloženosti pojedinačnom toksičnom metalu/metaloidu i to uglavnom pri visokim dozama, postoji potreba da se ispituju mehanizmi toksičnog dejstva smeše Pb, Cd, Hg i As u uslovima produžene izloženosti niskim dozama. Sprovedenjem animalne studije na *Wistar* pacovima i aplikacijom rastvora ispitivanih toksičnih supstanci putem oralne gavaže postiže se precizno doziranje, uz istovremenu simulaciju puta unosa koji je među najviše zastupljenim kod ljudi kada su ove toksične supstance u pitanju. Budući da je broj studija ograničen, još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi kojima toksični metali prisutni u smeši, i to u niskim dozama, dovode do toksičnih efekata. Primenom niskih doza smeša ispitivanih metala i metaloida omogućava se dobijanje podataka korisnih za evaluacije iz oblasti toksikološke procene rizika po zdravlje ljudi tj. izračunavanje *Benchmark* doza za određeni metal/metaloid primenjen u smeši za ispitivane toksične efekte.

Iako postoje istraživanja u kojima je ispitano protektivno dejstvo različitih probiotskih vrsta na toksičnost pojedinačnih supstanci Pb, Cd, Hg i As, kao i određenih njihovih kombinacija, studija u kojoj je istražena sposobnost probiotika da deluje protektivno protiv štetnih efekata smeše niskih doza Pb, Cd, Hg i As nije sprovedena. Takođe, do sada nije sprovedena studija kojom se ispituje protektivno svojstvo *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* na toksičnost smeše niskih doza ispitivanih supstanci. Iz tog razloga postoji potreba da se ispita efikasnost protektivnog dejstva probiotika na ispoljavanje toksičnosti ispitivane smeše Pb, Cd, Hg i As. Dodatno, pokazano je da je multikomponentan probiotik, koji u svom sastavu sadrži smešu korisnih mikroorganizama sposoban da veže toksične supstance efikasnije od monokomponentnih probiotskih vrsta, posebno što postoje pretpostavke da bi upotreba kombinacije mikrobiotskih sojeva mogla biti efikasnija za vezivanje smeša toksičnih supstanci (132,133). Iz ovih razloga, trebalo bi da upotreba smeše probiotskih kultura, u okviru ispitivanja ove doktorske disertacije bila obećavajuća u cilju umanjenja štetnih efekata niskih doza ispitivane smeše toksičnih supstanci.

Osnovni ciljevi istraživanja predložene doktorske disertacije bili su:

1. Ispitati subakutnu toksičnost smeše niskih doza Pb, Cd, Hg i As na eksperimentalnom modelu pacova i dodatno razjasniti mehanizme toksičnosti *in silico* toksikogenomskom analizom podataka;
2. Ispitati protektivno dejstvo probiotika na subakutnu toksičnost smeše Pb, Cd, Hg i As na eksperimentalnom modelu pacova, uz razjašnjenje mehanizma protektivnog dejstva *in vitro* određivanjem potencijala probiotskih kultura da vežu toksične metale Pb, Cd i Hg i metaloid As.

U svrhu realizacije prvog cilja nakon subakutne oralne ekspozicije smeši Pb, Cd, Hg i As u pet rastućih doza bilo je potrebno:

- Utvrditi promene u dnevnom unosu hrane i vode, kao i promene u telesnoj masi;
- Odrediti hematološke i biohemijske parametre;
- Izmeriti koncentraciju Pb, Cd, Hg i As u krvi, fecesu i tkivima pacova;
- Odrediti nivo bioelemenata: Cu, Zn, Mn i Fe u krvi, fecesu i tkivima pacova;
- Odrediti parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u krvi i tkivima pacova;
- Ispitati aktivnost acetilholinesteraze u mozgu pacova;
- Ispitati očuvanost strukture tkiva patohistološkom analizom;
- Proceniti BMD za svaki metal/metaloid u smeši za ispitivane toksične efekte;

- Proceniti BMD studije za svaki metal/metaloid primenjen u ispitivanoj smeši Pb, Cd, Hg i As.

Dodatno, *in silico* toksikogenomskom analizom podataka ispitana je toksičnost smeše Pb, Cd, Hg i As i utvrditi najznačajnije molekularne puteve, biološke procese i molekularne funkcije uključene u mehanizam toksičnosti ispitivane smeše toksičnih supstanci.

Za realizaciju drugog cilja i procenu protektivnog dejstva probiotika na subakutnu toksičnost smeše Pb, Cd, Hg i As na modelu pacova (*Rattus norvegicus*, soj *Wistar*) bilo je potrebno utvrditi efekat primene probiotika na toksično dejstvo ispitivane smeše Pb, Cd, Hg i As nakon subakutne izloženosti pacova na:

- Promene u dnevnom unosu hrane i vode, kao i promene u telesnoj masi;
- Praćene hematološke i biohemijske parametre;
- Koncentraciju Pb, Cd, Hg i As u krvi, fecesu i tkivima;
- Distribuciju biolemenata: bakra, cinka, mangana i gvožđa u krvi, fecesu i tkivima;
- Parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u krvi i tkivima;
- Aktivnost acetilholinesteraze u mozgu;
- Očuvanost strukture tkiva patohistološkom analizom.

Pored toga, u cilju razjašnjenja mehanizma protektivnog dejstva probiotika *in vitro* je ispitivan potencijal probiotskih kultura da vežu toksične metal(oid)e, umanje njihovu koncentraciju i time smanje mogućnost njihove resorpcije.

## 3. MATERIJALI I METODE ISPITIVANJA

### 3.1. Hemikalije i reagensi

Za pripremu rastvora su korišćeni su olovo-acetat ( $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ; Betahem, Beograd, Srbija), kadmijum-hlorid ( $\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ ; Betahem, Beograd, Srbija), živa(II)-hlorid ( $\text{HgCl}_2$ ; Thermo Fisher Scientific, Hempton, Nju Hempšir, Sjedinjene Američke Države), arsen(III)-oksid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ; Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, Sjedinjene Američke Države) i dejonizovana voda (Elga Purelab Prima, Bucks, Velika Britanija).

Svi reagensi korišćeni u analizi bili su komercijalno nabavljeni i bili su analitičke čistoće.

### 3.2. Probiotik

U eksperimentalnoj studiji korišćen je komercijalni monokomponentni probiotik (SB) – kvasac, Bulari<sup>®</sup> (Abela Pharm, Beograd, Srbija) i višekomponentni probiotik – smeša kvasca sa probiotskim bakterijama, (P) Enterobiotik<sup>®</sup> FORTE (Abela Pharm, Beograd, Srbija) u kapsulama. Deklarisane vrednosti sadržaja kapsule za P su  $\geq 8,5 \times 10^9$  liofilizovanih ćelija mikroorganizama ( $2,5 \times 10^9$  *Saccharomyces boulardii*,  $2 \times 10^9$  *Lactobacillus rhamnosus*,  $2 \times 10^9$  *Lactobacillus plantarum* LP 6595 i  $2 \times 10^9$  *Lactobacillus plantarum* HEAL9), dok za SB deklarisanu vrednost sadrže približno  $5 \times 10^9$  CFU *Saccharomices boulardii*.

### 3.3. In vivo ispitivanje na modelu pacova

#### 3.3.1. Eksperimentalne životinje

Istraživanje na eksperimentalnim životinjama izvođeno je na odraslim mužjacima pacova soja *Wistar* u skladu sa protokom odobrenim od strane Etičkog komiteta Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta (broj etičke dozvole: 323-07-11822/2018-05), dok je Zakonom o dobrobiti životinja Republike Srbije („Službeni glasnik RS“ br. 41/2009) i Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe utvrđen smeštaj i rukovanje životinjama. Eksperiment je sproveden u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta i na Katedri za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“. Eksperimentalne životinje, starosti šest nedelja (prosečne telesne mase ~130 g), nabavljene su sa Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Životinje su smeštene u laboratorijske kaveze u odgovarajućoj sobi za životinje, uz kontrolisane uslove sredine (sobna temperatura, relativna vlažnost ~50 %, i 12-časovni režim svetlo/tama). Pre početka eksperimenta omogućen je jednonedeljni period aklimatizacije.

Tokom celog eksperimentalnog perioda, životinjama su bile dostupne *ad libitum* standardna hrana (smeša za ishranu laboratorijskih životinja u peletiranom obliku, proizvođač Veterinarski zavod „Subotica“) i voda iz gradskog vodovoda. Koncentracije ispitivanih metal(oid)a u hrani i vodi dostupnim eksperimentalnim životinjama prikazane su u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Nivoi ispitivanih metal(oid)a u hrani i vodi

Nivo metal(oid)a u hrani ( $\mu\text{g/g}$ hrane)	Pb	Cd	Hg	As
Srednja vrednost	0,4167	0,1810	0,008741	0,1216
SD	0,06509	0,04725	0,000	0,09845
Nivo metala u vodi ( $\mu\text{g/mL}$ vode)	Pb	Cd	Hg	As
Srednja vrednost	0,1171	0,03261	NA	0,04046

SD	0,01102	0,003641	NA	0,02083
----	---------	----------	----	---------

NA- ispod limita kvantifikacije (LOQ: 0,00002 µg/mL).

### 3.3.2. Eksperimentalni protokol

Životinje su bile randomizovano raspodeljene u grupe, od po 5 životinja, od kojih je jedna kontrolna, a preostale grupe su tretirane. Kontrolna grupa je tretirana dejonizovanom vodom, dok su eksperimentalne grupe životinja tretirane smešom toksičnih supstanci i primale su rastuće doze toksičnih supstanci (pet doza) u smeši tako da su prvu smešu činile najniže odabrane doze sve četiri ispitivane supstance, drugu smešu su činile naredne odabrane niske doze ispitivanih supstanci i tako redom do petog, najvišeg doznog nivoa. Svi dozni nivoi, za svaku toksičnu supstancu u smeši, prikazani su u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Rastuće doze toksičnih supstanci (pet doza) za ispitivanje toksičnosti smeše Pb, Cd, Hg i As kod pacova nakon subakutne izloženosti

	Doza toksičnog metala (mg/kg t.m./dan)				
	Prva	Druga	Treća	Četvrta	Peta
Pb	0,003	0,01	0,1	0,3	1
Cd	0,01	0,03	0,3	0,9	3
Hg	0,0002	0,0006	0,006	0,018	0,06
As	0,002	0,006	0,06	0,18	0,6

Za određivanje doznih nivoa koji treba da odražavaju realnu izloženost opšte populacije, korišćene su vrednosti tolerišućeg nedeljnog unosa (engl. *Provisional Tolerable Weekly Intake*, PTWI) - najveća količina toksične supstance kojoj osoba može biti izložena nedeljno tokom života bez neprihvatljivog rizika po zdravlje, preporučene od zajedničkog stručnog komiteta Organizacije za hranu i poljoprivredu / Svetske zdravstvene organizacije o aditivima za hranu (engl. *Joint Food and Agricultural Organisation /World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA)*) (134). PTWI doze za Pb (0,025 mg/kg t.m.), Cd (0,007 mg/kg t.m.), Hg (0,0016 mg/kg t.m.), As (0,015 mg/kg t.m.) podeljene su sa 7 kako bi se simulirala dnevna izloženost dozi koja ne bi trebalo da ispolji štetni efekat, i dobijene su sledeće vrednosti: za Pb (0,003 mg/kg t.m.), Cd (0,001 mg/kg t.m.), Hg (0,002 mg/kg t.m.), As (0,002 mg/kg t.m.). Doza Pb (0,003 mg/kg t.m./dan), koja je niža od do sada prijavljenih NOAEL vrednosti za ključne efekte (135) i As (0,002 mg/kg t.m./dan), koja je niža od doze koja ima minimalan nivo rizika za akutnu oralnu izloženost ljudi (engl. *Minimal Risk Level*, MRL) predstavljaju doze koje su bile izabrane za najniže doze ovih supstanci koje su primenjivane u studiji. Kako bi doza Cd bila što reprezentativnija, za najnižu dozu je odabrana NOAEL vrednost za izloženost putem hrane (0,01 mg/kg t.m./dan) (*The Risk Assessment Information System*), a doza Hg je odabrana na osnovu MRL vrednosti za hroničnu izloženost, koja je značajno niža od predložene PTWI za unos hranom (0,0002 mg/kg t.m./dan). Na taj način osigurani su veoma niski nivoi toksičnih supstanci u smeši, a razlika između doznih nivoa za svaki metal/metaloid u smeši je u skladu sa *Pravilnikom o metodama ispitivanja opasnih svojstava hemikalija 117/2013-66*, gde se preporučuje da su optimalni dvostruki do četverostruki dozni intervali (izabran je trostruki interval), a kako bi se obezbedio širi interval doza smeše između drugog i trećeg doznog nivoa razlika je bila desetostruka (*Pravilnik o metodama ispitivanja opasnih svojstava hemikalija 117/2013-66*).

Za procenu protektivnog efekata probiotika na toksičnost smeše Pb, Cd, Hg i As, korišćena su dva probiotika: P – multikomponentni probiotik,  $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan i SB – kvasac,  $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan. Doza probiotika koja je primenjena na pacovima dobijena je iz doze ekvivalentne kod ljudi koristeći formulu Američke agencije za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA): uzimajući 60 kg kao prosečnu telesnu masu, doza odabranog multikomponentnog probiotika ekvivalentna onoj koja odgovara dozi kod ljudi iznosi:  $8,5 \times 10^9$  CFU / 60 kg /dan x 6,2 =  $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan; doza *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii* ekvivalentna onoj koja odgovara dozi kod ljudi iznosi:  $5 \times 10^9$  CFU/60kg/dan x 6,2 =  $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan, koeficijent 6,2 je iskorišćen da bi se izvršila ekstrapolacija sa čoveka na pacova (136).

U ovoj doktorskoj disertaciji bilo je ukupno 8 grupa eksperimentalnih životinja, kontrolna grupa i sedam tretiranih grupa, koje su primale smeše toksičnih supstanci u pet doznih nivoa i eksperimentalne grupe koje su pored smeše toksičnih supstanci sa najvećim odabranim koncentracijama za svaki toksični metal/metaloid u ovoj studiji primale i multikomponentni ili monokomponentni probiotik. Grupe pacova koje su primale smešu toksičnih supstanci označene su kao MIX, tako da grupu MIX 1 čine životinje tretiranje smešom Pb, Cd, Hg i As u najnižim dozama Pb1, Cd1, Hg1 i As1 (Tabela 1, kolona Prva). Raspored eksperimentalnih grupa bio je sledeći:

1. Kontrolna grupa – netretirane životinje
2. MIX 1 grupa (Pb1+Cd1+Hg1+As1)
3. MIX 2 grupa (Pb2+Cd2+Hg2+As2)
4. MIX 3 grupa (Pb3+Cd3+Hg3+As3)
5. MIX 4 grupa (Pb4+Cd4+Hg4+As4)
6. MIX 5 grupa (Pb5+Cd5+Hg5+As5)
7. MIX 5 + multikomponentni probiotik (Pb5+Cd5+Hg5+As5 +  $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* LP 6595 i *Lactobacillus plantarum* HEAL9)
8. MIX 5 + monokomponentni probiotik (Pb5+Cd5+Hg5+As5 +  $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan kvasac *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii*)

Ispitivani toksični metal(oid)i, kao i probiotik, rastvoreni su u dejonizovanoj vodi i aplikovani životinjama oralnom sondom u jutarnjim časovima svakodnevno tokom 28 dana.

Tokom eksperimenta svakodnevno su praćeni telesna masa životinja, kao i dnevni unos hrane i vode. Uzorci fecesa sakupljeni su dva puta, nakon 14 i 28 dana od početka tretmana i potom su odloženi do daljeg postupka rada sa njima.

### 3.3.3. Anamortem analiza

#### 3.3.3.1. Testovi ponašanja

Testovi ponašanja izvedeni su u poslednjoj nedelji eksperimenta, pri čemu su korišćeni test spontane lokomotorne aktivnosti (engl. *Spontaneous Locomotor Activity test*, SLA) i test prepoznavanja novih objekata (engl. *Novel Object Recognition test*, NORT). Metodološki postupak detaljno je opisan u prethodnoj studiji (137). Za evaluaciju rezultata NORT testa korišćeni su indeks diskriminacije (DI) i procenat vremena provedenog u istraživanju novog objekta, izračunati prema formulama predstavljanim u radu (138).

#### 3.3.3.2. Prirast telesne mase

Po završetku eksperimenta, zabeležene su telesne mase svih životinja i prirast mase je izračunat za svaku od njih. Prirast telesne mase (engl. *Body Weight Gain*, BWG) izračunat je prema sledećoj formuli:

$$\text{BWG} = \frac{(\text{mf}-\text{mi})}{\text{mi}}$$

gde mf označava konačnu telesnu masu, dok mi predstavlja početnu telesnu masu. Relativna masa organa određena je deljenjem mase pojedinačnog organa telesnom masom životinja na kraju eksperimenta, pri čemu se dobija bezdimenzioni broj.

### 3.3.4. Postmortem analiza

#### 3.3.4.1. Priprema i uzorkovanje krvi i organa

Nakon tretmana eksperimentalnih životinja u trajanju od 28 dana, sprovedeno je humano žrtvovanje životinja, a uzorci krvi su prikupljeni putem kardijalne punkcije. Za analizu biohemijskih parametara i hormona, krv je sakupljena u vakutejnere namenjenim za izdvajanje seruma. Serum je izdvojen nakon centrifugiranja tokom 30 minuta pri brzini od 3000x g i zatim zamrznut na temperaturi od -20 °C do trenutka kada su analize izvršene. Dodatno, deo krvi je izdvojen u heparinske vakutejnere kako bi se odredili hematološki parametri iz pune krvi i parametri redoks statusa iz plazme. Za analizu parametara redoks statusa, iz uzoraka heparinizirane krvi odvojena je plazma putem centrifugiranja pri 3000xg tokom 30 minuta, nakon čega je zamrznuta na -80 °C do trenutka izvođenja analiza.

Odmah nakon uzorkovanja krvi, izolovani su sledeći organi: jetra, bubrezi, mozak, srce, pluća, pankreas, slezina, testisi, i femur. Svi izolovani organi su pažljivo obrađeni i isprani hladnim fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl), i potom osušeni filter hartijom i izmereni na analitičkoj vagi.

Jedan deo organa fiksiran je u 10% neutralnom puferisanom formaldehidu radi izvođenja patohistološke analize, drugi deo je zamrznut u tečnom azotu i čuvan na -80 °C za potrebe analize parametara redoks statusa, dok je preostali deo zamrznut na -20 °C za ispitivanje sadržaja metala i bioelemenata. Aktivnost acetilholinesteraze određivana je iz svežih uzoraka mozga neposredno nakon izolacije organa.

#### 3.3.4.2. Određivanje hematoloških parametara, biohemijskih parametara i hormona

Analiza pune krvi pacova je obuhvatala sledeće hematološke parametre: ukupni broj leukocita, uz diferencijalnu leukocitnu formulu (neutrofili, eozinofili, limfociti, bazofili i monociti), broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit, srednji volumen eritrocita

(engl. *mean corpuscular volume*, MCV), srednji sadržaj hemoglobina po eritrocitu (engl. *mean corpuscular haemoglobin*, MCH), srednju koncentraciju hemoglobina u eritrocitima (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*, MCHC) i broj trombocita. Biohemijski parametri obuhvaćeni analizom krvnog seruma: triacilgliceridi, holesterol, lipoprotein visoke gustine (engl. *High density lipoprotein*, HDL), lipoprotein niske gustine (engl. *Low density lipoprotein*, LDL), kreatinin, mokraćna kiselina, ukupni proteini u serumu, albumin, direktni bilirubin, ukupni bilirubin, c-reaktivni protein (CRP), gvožđe u serumu, kalcijum ( $\text{Ca}^{2+}$ ), neorganski fosfor ( $\text{PO}_4^{3+}$ ), magnezijum ( $\text{Mg}^{2+}$ ) i hloridi ( $\text{Cl}^-$ ). Takođe, u krvi su izmerene i aktivnost enzima aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) i alkalne fosfataze (ALP), kao i nivoi hormona (testosteron, androstendion, trijodtironin (T3), tiroksin (T4), slobodni trijodtironin (fT3), slobodni tiroksin (fT4), aldosteron, renin, kortizol). Sva ispitivanja sprovedena su u akreditovanoj laboratoriji, uz primenu komercijalnih reagenasa.

#### 3.3.4.3. Određivanje metala i bioelemenata

Za postupak mineralizacije korišćeni su komercijalno dostupna azotna kiselina ( $\text{HNO}_3$ ) (69,0% - 70,0% p.a, Baker Analyzed™ A.C.S. Reagent, J.T.Baker™, Philipsburg, Nju Džerzi, Sjedinjene Američke Države) i vodonik-peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (30% p.a, Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, SAD) nivoa čistoće namenjenog za atomsku apsorpcionu spektrometriju. Standardi korišćeni za seriju standarda kojima je kalibrisan uređaj su: 1) Perkin Elmer, Instrument Calibration Standard 2, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, Tl, V, Zn i 2) PerkinElmer, Mercury (Hg) Pure Plus Standard, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Priprema uzoraka za analizu koncentracija metala i bioelemenata obavljena je postupkom vlažne mineralizacije u zatvorenom sistemu mikrotalasne digestije (Milestone, Start D SK-10 T, Milestone Srl, Sorisole, Italija). U svaki uzorak mase približno 1 g, precizno odmeren na analitičkoj vagi (Radwag AS 220.R2, Majami, Florida, Sjedinjene Američke Države), dodata je smeša oksidacionih sredstava - 7 mL koncentrisane  $\text{HNO}_3$  i 1 mL koncentrovanog  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Mikrotalasni sistem bio je programiran na sledeći ciklus digestije: inicijalno postizanje temperature od 200 °C u trajanju od 15 minuta, zatim održavanje postignute temperature još 15 minuta, i završna ventilacija sistema tokom dodatnih 15 minuta.

Po završetku digestije, uzorci su kvantitativno preneti u normalne sudove od 25 mL i razblaženi dejonizovanim vodom (Elga Purelab Prima, Bucks, Velika Britanija) do odgovarajućeg volumena. Pripremljeni uzorci su potom uskladišteni u sterilnim plastičnim bočicama sa dvostrukim zatvaranjem, kapaciteta 50 mL, do trenutka određivanja koncentracije metala.

Nakon postupka mineralizacije pune krvi, fecesa i tkiva (jetra, bubrezi, mozak, srce, pluća, pankreas, slezina, testisi, femur) u uzorcima, određene su koncentracije ispitivanih toksičnih supstanci, Pb, Cd, Hg i As, kao i bioelemenata (Fe, Cu, Zn, Mn) ICP-MS tehnikom.

ICP-MS NexION 300S PerkinElmer je maseni spektrometar s indukovano spregnutom plazmom namenjen za preciznu multielementnu analizu metala i bioelemenata u tragovima. Instrument pruža tri načina rada — standardni, kolizioni i reakcioni — što omogućava prilagođavanje različitim analitičkim potrebama. Opseg merenja obuhvata masene brojeve od 1 do 285 amu (atomske masene jedinice), sa rezolucijom od 0,3 amu, čime se osigurava visoka tačnost u identifikaciji i kvantifikaciji elemenata. Instrumentom je moguće detektovati širok opseg koncentracija elemenata, od ultra-tragova ( $\text{ng}/\text{L}$ ) do makronivoa ( $\text{mg}/\text{L}$ ). Radiofrekventni generator radi na frekvenciji od 27 MHz, sa snagom plazme koja se može podesiti od 0 do 1600 W, čime se osigurava stabilan rad i visoka osetljivost analize u različitim uslovima. Limit detekcije za sve ispitivane metale i bioelemente iznosio je 0,000002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , dok je limit kvantifikacije bio 0,00002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Koncentracije metala i bioelemenata su izražene u  $\mu\text{g}/\text{mL}$  u krvi, a u  $\mu\text{g}/\text{g}$  u tkivima.

#### 3.3.4.4. Određivanje parametara redoks statusa

Uzorci su delimično odmrznuti na ledu (0–4 °C) pre homogenizacije. Priprema tkiva za procenu oksidativnog statusa uključivala je homogenizaciju mase uzorka od 0,2–0,4 g u hladnom fosfatnom puferu (0,1 mol/L, pH 7,4, sa dodatkom 1,15% KCl), u odnosu 1:9 (v/v), korišćenjem homogenizatora T10 basic ULTRA-TURRAX (IKA, Nemačka). Homogenati su zatim centrifugirani u dva koraka: prvo na 800×g tokom 10 minuta, a potom na 9500×g tokom 20 minuta, na temperaturi od +4 °C, čime je dobijen postmitohondrijalni supernatant. Ovaj supernatant dalje je odvojen u ependorf tube i korišćen za procenu biomarkera oksidativnog stresa.

U uzorcima plazme i homogenatima tkiva određeni su parametri oksidativnog statusa: totalni antioksidativni status (TAS), totalni oksidativni status (TOS), superoksidni anjon radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), prooksidativno-antioksidativni balans (PAB), aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), malondialdehid (MDA), uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *Advanced oxidation protein products*, AOPP), ishemijom modifikovan albumin (IMA), ukupne SH grupe i glutation

(GSH). TOS, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, AOPP, SOD i TAS izmereni su na ILAB 300 Plus analizatoru (Instrumentation Laboratory, Italija), dok je spektrofotometrijsko merenje MDA, SH grupa, kao i proteina u uzorcima tkiva sprovedeno pomoću SPECTROstar Nano UV/VIS spectrometra (BMG Labtech, Ortenberg, Nemačka). Indeks oksidativnog stresa (OSI) predstavlja količnik parametara TOS i TAS i predstavlja bezdimenzionalnu vrednost. Detaljni prikaz metoda merenja pojedinačnih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi i tkivu pacova nakon izlaganja ispitivanim toksičnim metal(oid)ima, kao i probioticima, detaljno su objašnjeni u ranije objavljenim radovima naše istraživačke grupe (96,137). U cilju boljeg razumevanja i karakterizacije promena parametara oksidativnog statusa izračunata su tri skora: skor oksidativnog oštećenja (engl. *oxidative damage score*, DS; prosečna vrednost standardizovane vrednosti varijabli izračunavanjem Z skora prooksidativnih faktora: TOS, AOPP, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, MDA, PAB i IMA), skor antioksidativne zaštite (engl. *protection score*, PS; prosečna vrednost standardizovane vrednosti varijabli izračunavanjem Z skora antioksidativnih faktora: SOD, SH grupe, TAS, GSH) i OXY skor - skor oksidativne ravnoteže (odnos skora antioksidativne zaštite i skora oksidativnog oštećenja predstavljajući ukupnu procenu oksidativne ravnoteže). Metod proračuna detaljno je opisan u prethodno objavljenim publikacijama (96). Dodatno, indeks oksidativnog stresa (OSI indeks) je izračunat kao mera ravnoteže između TOS i TAS.

#### **3.3.4.5. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze**

Uzorci tkiva mozga za analizu aktivnosti acetilholinesteraze (AChE) homogenizovani su u fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl) koristeći homogenizator T10 basic ULTRA-TURRAX (IKA, Nemačka), u odnosu 1:3 (m/V). Aktivnost AChE određivana je spektrofotometrijskom metodom prema modifikovanoj verziji Elmanovog postupka (139). U homogenate tkiva mozga (20 µL) dodato je 2,5 mL DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina) rastvora (7,44 mg/mL u fosfatnom puferu pH 7,4, zatim dodatno razblaženog sa fosfatnim puferom u odnosu 1:50). Nakon toga, reakcioni sistem je inkubiran tokom 5 minuta na temperaturi od 25 °C, nakon čega je dodato 20 µL rastvora acetiltioholin jodida u destilovanoj vodi (135 mM). Promena apsorbance praćena je naredna 3 minuta na talasnoj dužini od 410 nm pomoću UV-VIS spektrofotometra CARY60, opremljenog sistemom za temperaturnu kontrolu Cary single cell Peltier (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Rezultati su izraženi u jedinicama enzimske aktivnosti po gramu tkiva (U/g).

#### **3.3.4.6. Histopatološka analiza**

Nakon fiksacije, tkiva jetre, bubrega, mozga, srca, pluća, pankreasa, slezine, testisa, femura su podvrgnuta dehidraciji u rastućim koncentracijama rastvora alkohola, čišćenju toluenom, a zatim su postavljena u parafin. Blokovi tkiva ugrađeni u parafin su isećeni na tanke delove debljine 5 mm, koji su zatim obojeni hematoksilinom i eozinom (H&E). Za analizu dobijenih histoloških pločica korišćen je svetlosni mikroskop, model Olympus BKS 43 (Tokio, Japan).

#### **3.3.4.7. Statistička obrada podataka**

Statistička analiza i grafički prikaz rezultata su sprovedeni korišćenjem softvera GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Dijego, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države). Pre analize, normalnost distribucije za svaku vrednost parametra je procenjena korišćenjem Shapiro Wilk testa. Kada je distribucija bila normalna primenjena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA), praćena Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD) gde su podaci predstavljeni kao srednja vrednost i standardna devijacija. Kada distribucija nije bila normalna primenjen je neparametarski Kruskal–Wallis test praćen Dunn post-hoc testom gde su podaci predstavljeni kao medijana i opseg minimum i maksimum. Statistički značaj je postavljen na nivo  $p < 0,05$ .

#### **3.3.4.8. Modelovanje odnosa doza-odgovor**

Za modelovanje odnosa doza-odgovor i određivanje *Benchmark* doze korišćen je PROAST softver kreiran od strane Holandskog nacionalnog instituta za javno zdravlje i životnu sredinu (*Dutch National Institute for Public Health and the Environment (RIVM)*, Bilthoven, Holandija). Modelovanje odnosa doza-odgovor za 5 rastućih doza smeše toksičnih metala (loida) rađeno je za vrednosti izmerenih biohemijskih i hematoloških parametara, hormona u serumu, parametara oksidativnog statusa, aktivnosti enzima acetilholinesteraze, kao i za histopatološke promene. Analiza je obuhvatila različite modele—eksponencijalni (EXP), Hill (HILL), inverzni eksponencijalni (INVEXP) i lognormalni (LOGN), dok je modelovanje sprovedeno sa 200 iteracija i referentnim odgovorom (BMR) od 5% (96), s obzirom da EFSA naučni komitet predlaže tu vrednost za kontinuirane podatke dobijene iz studija na životinjama. Da bi pristup bio precizniji, doza smeše je arbitrarno odabrana na osnovu primenjenih intervala doza, koristeći dozu Cdx100 kao model. Zatim je za svaki parametar sprovedeno BMD modelovanje. U obzir je uzet odnos primenjenih doza, pri čemu je najniža doza uvek bila za Hg, zatim As, Pb i na kraju Cd. Ovim pristupom moguće je odrediti arbitrarni donji interval pouzdanosti (BMDL) za BMD za isti parametar kod svih metala, pri čemu će on uvek biti najniži za Hg, zatim za As, Pb i na kraju Cd. Dalje su proporcionalni BMD intervali izračunati za svaki metal na osnovu opsega doza. Pri utvrđivanju odnosa doze i odgovora za ispitivane parametre, određeni su Benchmark intervali (BMDI), odnosno BMDL i gornji interval pouzdanosti (BMDU) za BMD. Kriterijum za potvrdu efekta je odnos BMDU/BMDL < 50, odnos BMD/BMDL < 20 i da izračunata BMD nije 10 puta niža od najniže doze primenjene u studiji. Navedeni kriterijumi su primenjeni u ovom istraživanju i grafički su prikazani rezultati za koje je potvrđen efekat.

### 3.4. *In silico* ispitivanje toksičnosti smeše olova, kadmijuma, žive i arsena

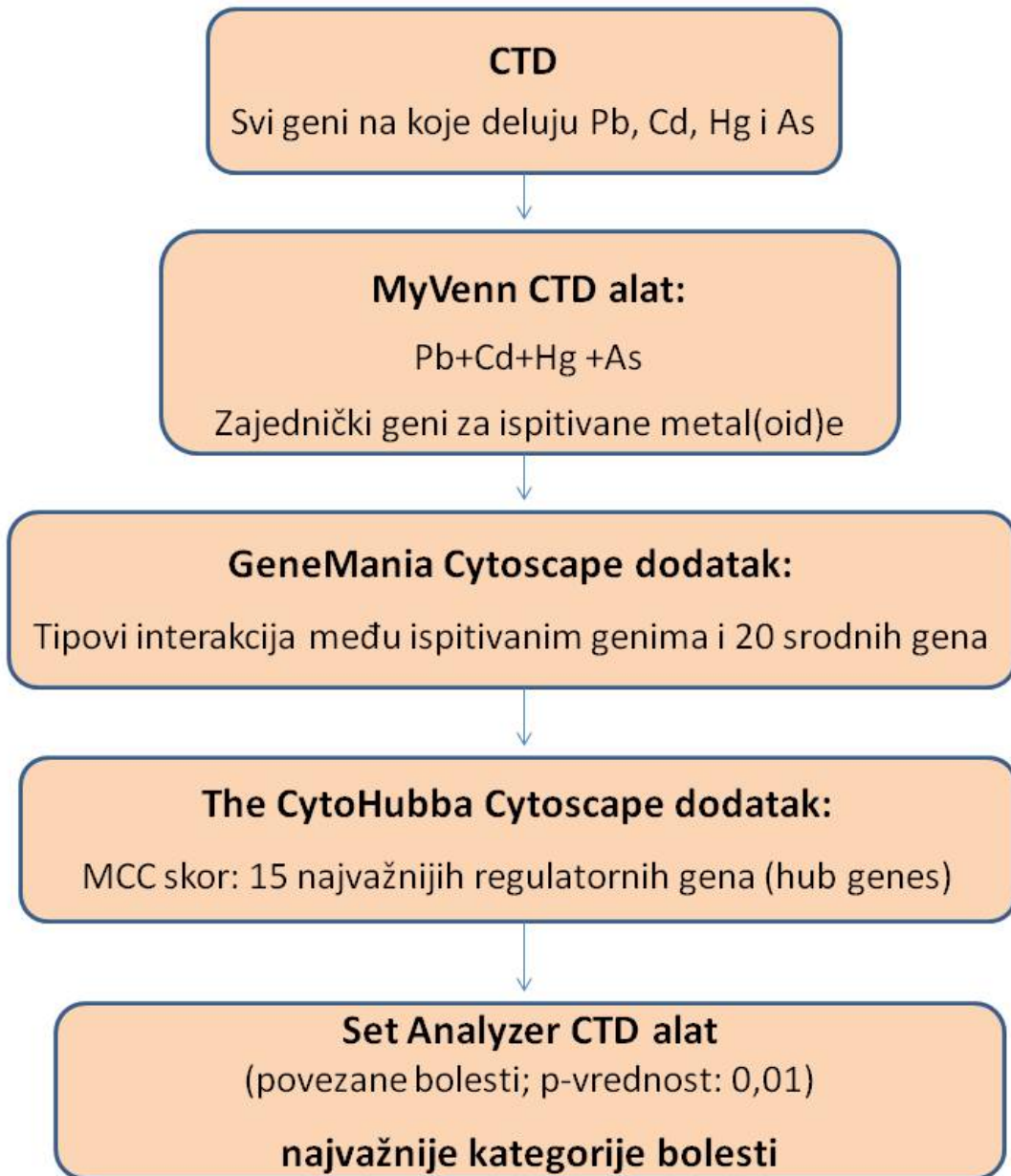
Ovaj deo istraživanja obuhvata *in silico* analizu sprovedenu korišćenjem sledećih javno dostupnih baza podataka, softvera i alata:

- Komparativna toksikogenomska baza podataka (engl. *Comparative Toxicogenomics Database*, CTD; <http://CTD.mdibl.org>) omogućava konstruisanje mreže puteva štetnih ishoda i pruža mogućnost detaljne analize mehanizama toksičnosti, identifikacije biomarkera i ispitivanja istovremenog uticaja dve ili više toksičnih supstanci na gene i proteine, što predstavlja ogroman značaj u ispitivanju toksičnosti smeša i polaznu osnovu za dalja ispitivanja (140,141).
- *Cytoscape* (<https://cytoscape.org/>) je softverski paket koji se koristi za vizuelizaciju, modelovanje i analizu molekularnih i genetskih mreža interakcije (142).
- GeneMANIA je alat dostupan kao online platforma (<http://www.genemania.org>) i kao dodatak za Cytoscape (<https://apps.cytoscape.org/apps/genemania>). Prilagođen je korisnicima za generisanje hipoteza o funkciji gena, analizu skupova gena i prioritizaciju gena za detaljnije analize. GeneMANIA daje podatke o funkcionalno sličnim genima povlačeći informacije o dostupnim genomskim i proteomskim podacima, pri čemu pruža informacije o prediktivnoj vrednosti svakog unetog skupa podataka. Takođe, ovaj alat rezultira dobijanjem informacija o interakcijama između gena, kao i o vrsti njihovih interakcija (143).
- CytoHubba (<https://apps.cytoscape.org/apps/cytohubba>) predstavlja alat za identifikaciju ključnih (engl. *hub*) gena unutar mreže putem različitih algoritama topološke analize. Ova platforma za vizualizaciju omogućava grafički prikaz mreže najznačajnijih gena ističući važnost gena odgovarajućom bojom (144).
- *ToppGene Suite* portal (<https://toppgene.cchmc.org>) je alat koji pomaže u identifikaciji gena i njihovom prioritetu na osnovu njihove funkcije i interakcija sa proteinima (145).
- *ToppFun ToppGene* alat (<https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>) se koristiti za analizu transkriptoma, ontologije gena i fenotipa na osnovu analize seta gena od interesa (145).
- MicroRNA ENrichment TURned NETwork server korišćen je za analizu obogaćivanja (engl. *enrichment analysis*) zasnovanu na interakcijama. Ova analiza dala je prioritet ciljnim porodicama

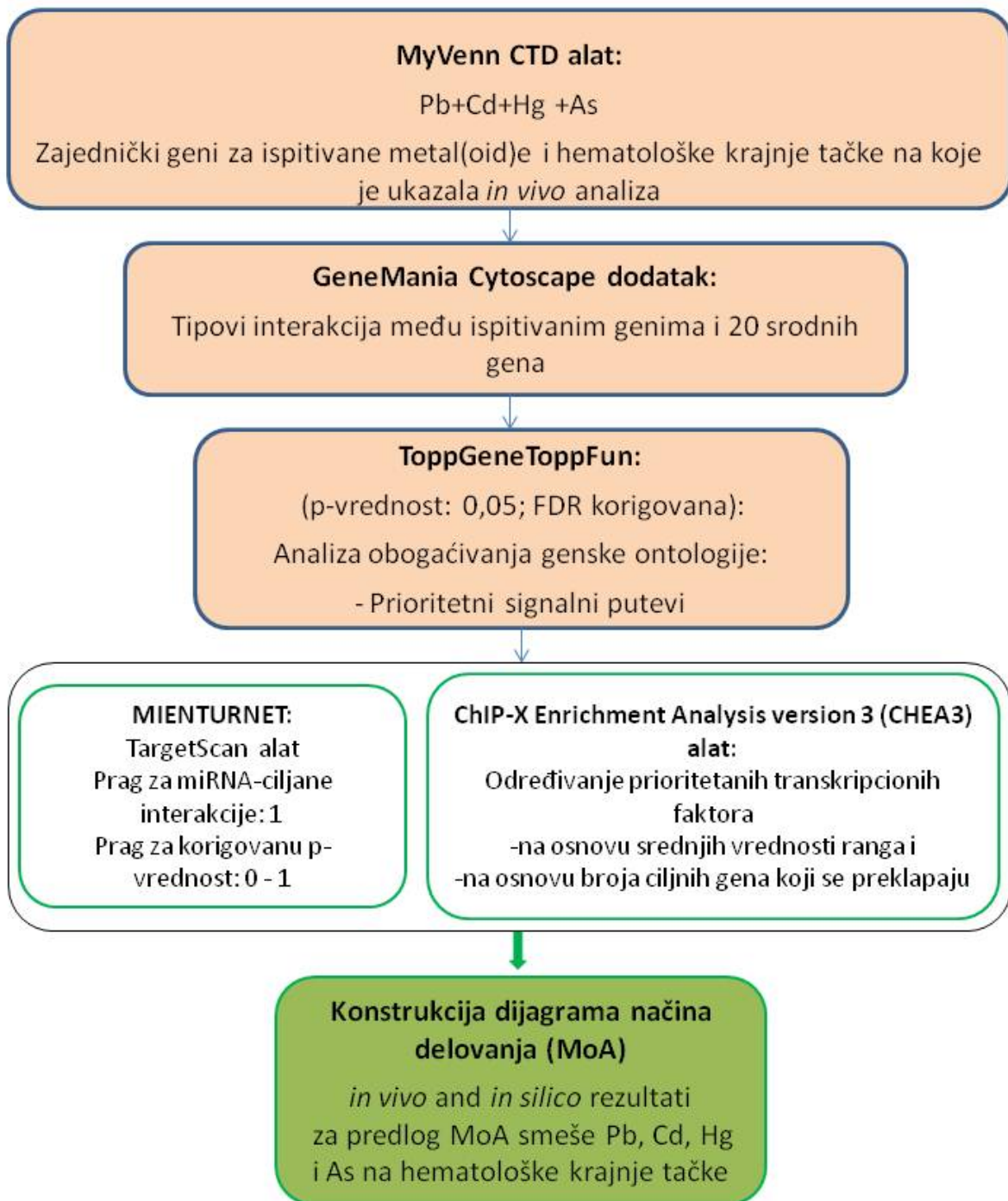
mikro ribonukleinske kiseline (miRNA) za svaki set odabranih gena povezanih sa smešom toksičnih metal(oid)a i povezanih sa ispitivanim hematološkim bolestima. U ovoj disertaciji, *TargetScan* alat je korišćen za prioritizaciju porodica miRNA postavljanjem praga od 1 za minimalni broj interakcija ciljane miRNA i 0 - 1 kao raspona praga za prilagođenu p-vrednost (FDR) (146).

- ChIP-X Enrichment Analysis Version 3 (CHEA3) (<https://maayanlab.cloud/chea3/>) je alat korišćen za određivanje prioriternih faktora transkripcije koji regulišu ciljne gene povezane sa selektovanim hematološkim krajnjim tačkama (147). Određivanje prioriternih transkripcionih faktora je urađeno na osnovu srednjih vrednosti ranga i broja ciljnih gena koji se preklapaju.

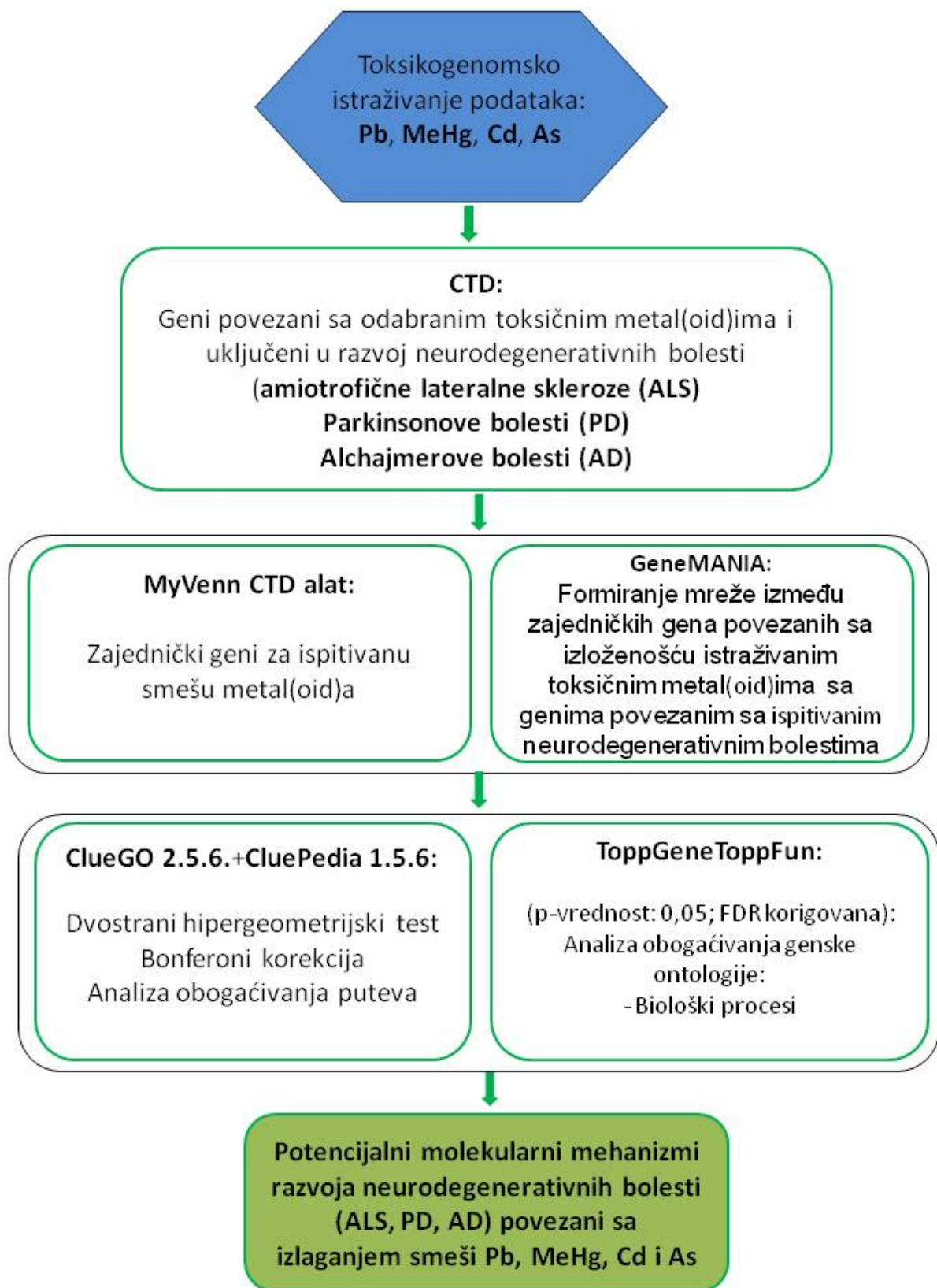
Na sledećim dijagramima prikazani su koraci *in silico* analize ispitivanja uticaja Pb, Cd, Hg i As na razvoj najvažnijih kategorija bolesti (Slika 1), kao i koraci za *in silico* ispitivanje hematotoksičnosti smeše toksičnih metal(oid)a (Slika 2), kao i razvoj neurodegenerativnih bolesti (Slika 3).



Slika 1. Koraci *in silico* analize ispitivanja uticaja olova, kadmijuma, žive i arsena na razvoj bolesti



Slika 2. Koraci za *in silico* ispitivanje hematotoksičnosti smeše toksičnih metal(oid)a



Slika 3. Koraci *in silico* ispitivanja uticaja smeše toksičnih metal(oid)a na razvoj neurodegenerativnih bolesti

### 3.4. *In vitro* ispitivanje potencijala probiotika za vezivanje toksičnih metala

Kako bi se ispitao kapacitet vezivanja najveće doze ispitivane smeše toksičnih supstanci (Pb, Cd, Hg i/ili As) pomoću multikomponentnog probiotika (*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* LP 6595 i *Lactobacillus plantarum* HEAL9) i monokomponentnog probiotskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, kao i izvršilo poređenje efikasnosti ova dva pristupa u vezivanju smeše toksičnih supstanci primenjen je modifikovani protokol iz istraživanju koje su sproveli (148). Sadržaj jedne kapsule multikomponentnog probiotika i probiotskog kvasca suspendovan je u 2 mL ispitivane smeše toksičnih metal(oid)a, ali i sa svakog pojedinačnog metal(oid)a u koncentracijama primenjenim u eksperimentu na životinjama. Vreme za inkubaciju od jednog sata omogućilo je simulaciju i moguće vreme kontakta ispitivanih probiotskih kultura i smeše toksičnih metal(oid)a u gastrointestinalnom traktu. Sve analize su urađene u triplikatu u laboratoriji Katedre za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“ Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Nakon inkubiranja tokom jednog sata i centrifugiranja na 5000x g tokom 10 min na 4 °C kako bi se ćelije probiotskih kultura uklonile/staložile, izdvojeni uzorci supernatanta su mineralizovani i određena je koncentracija Pb, Cd, Hg i As.

Za postupak mineralizacije i pripreme uzoraka korišćeni su identični reagensi i postupci kao kod mineralizacije i pripreme uzoraka krvi, tkiva i fecesa, s tim što je uzorak činilo 1 mL izdvojenog supernatanta. Kalibracija uređaja izvedena je korišćenjem istih standarda, dok je mikrotalasni sistem programiran na isti način kao prilikom određivanja metala i bioelemenata u uzorcima krvi, tkiva i fecesa. Za preciznu multielementnu analizu metala u uzorcima supernatanta korišćena je identična metoda kao za analizu metala u uzorcima tkiva i fecesa – ICP-MS NexION 300S PerkinElmer, maseni spektrometar sa indukovano spregnutom plazmom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Ispitivanje toksičnosti smeše olova, kadmijuma, žive i arsena

4.1.1. *In vivo* rezultati subakutne toksičnosti smeše olova, kadmijuma, žive i arsena na modelu pacova

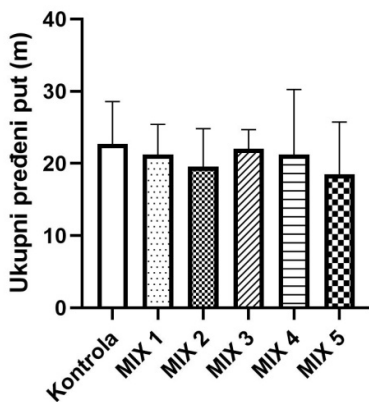
4.1.1.1. Promene u ponašanju, unosu hrane i vode

U SLA testu nisu uočene značajne razlike između grupa. Kontrolna grupa je imala najveći ukupni pređeni put, dok je u ostalim doznim nivoima ispitivane smeše metal(oid)a uočena tendencija smanjenja ukupnog pređenog puta sa najizraženijim efektom u MIX 5 (slika 4A). Slično, grupe tretirane rastućim niskim dozama ispitivane smeše metal(oid)a pokazale su tendenciju povećanja perioda nepokretnosti sa najistaknutijim efektom u MIX 5 grupi, ali bez statističke značajnosti (slika 4B).

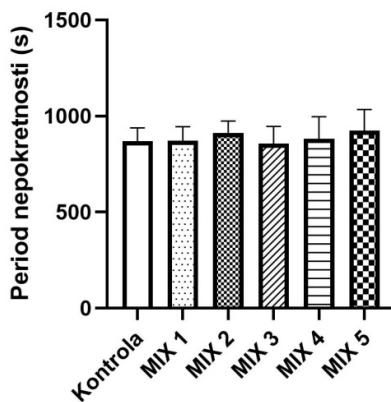
U NORT testu uočene su negativne vrednosti indeksa diskriminacije u MIX 2, MIX 3 i MIX 5 grupi i, u poređenju sa MIX 1 grupom, te vrednosti su statistički značajno niže (slika 4C). Indeks diskriminacije imao je najniže vrednosti u MIX 2 i MIX 3 grupi, dok je MIX 1 imao najveću vrednost indeksa diskriminacije, čak i u poređenju sa kontrolom (slika 4C). Ovi rezultati su u skladu vremenom provedenim u istraživanju novog objekta (slika 4D). Grupe MIX 2, MIX 3 i MIX 5 imale su vrednosti ispod 50%, što sugerise da je nov objekat manje istraživan, dok su kontrolna, MIX 1 i MIX 4 grupa imale vrednosti iznad 50%, ukazujući da je više vremena utrošeno na istraživanje novog objekta (slika 4D).

Životinje u MIX 1 grupi provele su značajno više vremena istražujući nov predmet u poređenju sa vremenom provedenim u istraživanju poznatog (slika 4E). Uočeni su slični rezultati u kontrolnoj, MIX 2 i MIX 4 grupi, bez statističke značajnosti. Sa druge strane, životinje u MIX 3 i MIX 5 grupi pokazale su afinitet da provode više vremena istražujući poznati predmet nego novi (slika 4E).

A

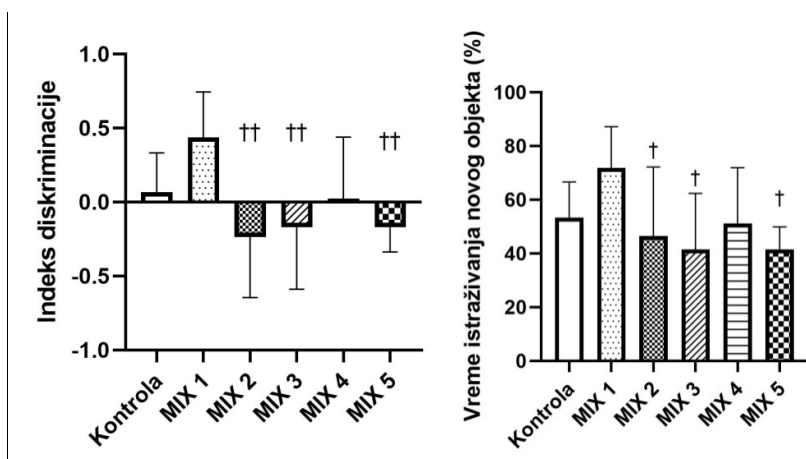


B

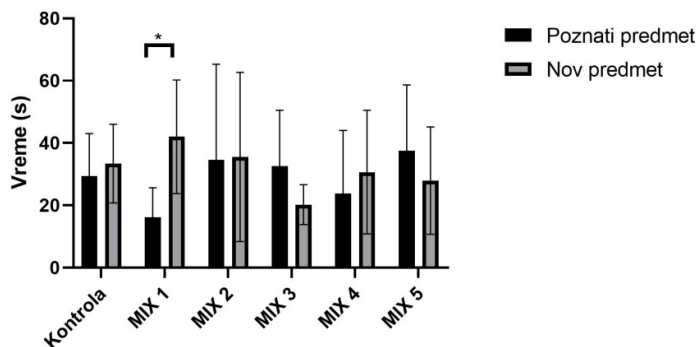


C

D



E



**Slika 4. Efekti subakutnog (28-dnevnog) oralnog izlaganja pacova rastućim dozama smeše Pb, Cd, Hg i As na ponašanje.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD), slika 1A, 1B, 1C, 1D/ t-test za uparene uzorke, slika 1E). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). Spontana lokomotorna aktivnost: ukupni pređeni put (slika 1A) i period nepokretnosti (slika 1B); posmatranje svake životinje trajalo je dvadeset minuta. Test istraživanja poznatog i novog predmeta (NORT test): indeks diskriminacije (slika 1C); trajanje posmatranja svake životinje je pet minuta. †† p < 0,005 u poređenju sa MIX 1 grupom. Vreme istraživanja novog objekta (%; NORT test) (slika 1D); trajanje posmatranja svake životinje je bilo pet minuta. † p < 0,05 u poređenju sa MIX 1 grupom. Vreme utrošeno na istraživanje poznatih i novih objekata nakon 1 sata (NORT test) (slika 1E); \* p < 0,05. Unos hrane u četiri vremenska perioda kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazan je u Tabeli 3.

Nakon prve nedelje tretmana, značajno smanjenje unosa hrane u poređenju sa kontrolnom grupom uočeno je jedino u MIX 5 grupi. Nakon druge nedelje nije bilo značajnih razlika u unosu hrane u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je nakon treće nedelje uočen značajno manji unos hrane jedino u grupi MIX 3. Nakon četvrte nedelje tretmana značajno smanjenje unosa hrane u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, ali i ostalih tretiranih grupa uočeno je u MIX 5 grupi predstavljajući najizraženiji efekat na unos hrane tokom celog trajanja studije.

**Tabela 3.** Unos hrane kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Unos hrane (g)	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5

<b>7. dan</b>	Srednja vrednost	27,68	26,77	29,93 <sup>††</sup>	29,41 <sup>†</sup>	27,32 <sup>‡</sup>	24,74 <sup>*†††###ψ</sup>
	SD	0,8727	1,113	0,1224	0,3390	1,048	1,026
<b>14. dan</b>	Medijana	29,52	29,16	30,00	27,99	29,47	29,05
	Opseg	0,8348	0,6304	0,5000	3,036	0,2414	1,357
<b>21. dan</b>	Srednja vrednost	29,00	27,82	30,00	26,05 <sup>*††</sup>	26,96 <sup>‡</sup>	28,58
	SD	1,000	0,5617	1,000	0,6074	1,180	1,231
<b>28. dan</b>	Medijana	28,05	25,96	28,08	27,18	27,14	18,01 <sup>*†††###ψ</sup>
	Opseg	3,372	1,863	1,733	2,003	2,033	1,538

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)/medijana i opseg (Neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0,05, ††p < 0,01 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0,05, ††p < 0,01, †††p < 0,001 (u poređenju sa MIX 2); ###p < 0,01, ####p < 0,001 (u poređenju sa MIX 3); ψ p < 0,05, ψψ p < 0,01 (u poređenju sa MIX 4).

Unos vode u četiri vremenska perioda kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazan je u Tabeli 4.

Nakon prve nedelje tretmana, značajno povećanje unosa vode u poređenju sa kontrolnom grupom uočeno je jedino u MIX 2 grupi. Nakon druge nedelje u MIX 2 i MIX 4 grupi uočeno je značajno povećanje unosa vode u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je nakon treće nedelje nisu uočene značajne promene u unosu vode. Nakon četvrte nedelje tretmana značajno smanjenje unosa vode u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, ali i ostalih tretiranih grupa uočeno je u MIX 5 grupi predstavljajući najizraženiji efekat na unos vode tokom celog trajanja studije.

**Tabela 4.** Unos vode kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Unos vode (mL)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>7. dan</b>	Srednja vrednost	38,00	47,67	53,33 <sup>**</sup>	48,33	46,67	39,00 <sup>‡</sup>
	SD	5,292	3,215	4,509	2,082	4,163	4,583
<b>14. dan</b>	Srednja vrednost	39,33	43,33	53,67 <sup>*†</sup>	47,00	49,67 <sup>*</sup>	44,33
	SD	3,055	5,033	1,528	2,646	2,082	4,041
<b>21. dan</b>	Srednja vrednost	47,67	50,67	50,33	50,00	50,00	42,33
	SD	2,887	1,155	2,082	0,000	5,292	2,517
<b>28. dan</b>	Srednja vrednost	48,33	45,33	51,00	55,67	51,00	28,67 <sup>*†††###ψ</sup>
	SD	8,622	4,041	1,000	5,686	3,606	6,351

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od

najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0,05 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0,05, ††p < 0,01 (u poređenju sa MIX 2); †††p < 0,001 (u poređenju sa MIX 3); ††††p < 0,01 (u poređenju sa MIX 4).

#### 4.1.1.2. Prirast telesne mase i relativna masa organa

Prirast telesne mase u četiri vremenska perioda kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazan je u Tabeli 5.

Statistički značajno smanjenje prirasta telesne mase nakon prve nedelje tretmana uočeno je samo u grupi MIX 5, iako je blago smanjenje prirasta telesne mase uočeno i u ostalim grupama. Nakon druge nedelje tretmana statistički značajno smanjenje prirasta telesne mase uočeno je u svim tretiranim grupama, osim u MIX 4 grupi. Nakon treće nedelje tretmana nije bilo statistički značajnog smanjenja prirasta telesne mase, dok je nakon četvrte nedelje tretmana prirast telesne mase bio značajno smanjen u svim tretiranim grupama sa najizraženijim efektom u MIX 5 grupi.

**Tabela 5.** Prirast telesne mase kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX – Pb+Cd+Hg+As)

Prirast mase		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>7. dan</b>	Srednja vrednost	0,3746	0,2602	0,2604	0,2582	0,2899	0,2320*
	SD	0,06266	0,02867	0,09073	0,01773	0,04331	0,07668
<b>14. dan</b>	Srednja vrednost	0,6929	0,4688**	0,4221***	0,4243***	0,5381	0,4080***
	SD	0,1046	0,05408	0,1033	0,03276	0,05032	0,1042
<b>21. dan</b>	Srednja vrednost	0,8074	0,6575	0,5813	0,5402	0,7113	0,5890
	SD	0,2827	0,06220	0,1233	0,01781	0,06624	0,1351
<b>28. dan</b>	Srednja vrednost	1,062	0,7393**	0,7001**	0,6474***	0,8230*	0,5552****Ψ
	SD	0,2062	0,1143	0,1332	0,04751	0,08756	0,08246

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 (u poređenju sa kontrolom); Ψ p < 0,05 (u poređenju sa MIX 4).

Relativne mase organa kod pacova nakon subakutne oralne izloženosti rastućim dozama smeše Pb, Cd, Hg i As prikazane su u Tabeli 6. Relativna masa mozga bila je povećana u MIX 1 i MIX 4 grupi, dok je relativna masa testisa bila povećana jedino u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Značajne promene u relativnoj masi organa u poređenju sa kontrolnom grupom uočene su u jetri u vidu značajnog smanjenja u MIX 2, MIX 3, MIX4 i MIX 5 grupi.

**Tabela 6.** Relativne mase organa kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Relativna masa organa		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Jetra</b>	Srednja	3,723	3,394	3,039*	3,065*	3,085*	2,903**

	vrednost						
	SD	0,2228	0,2796	0,3702	0,2134	0,3870	0,2511
<b>Bubrezi</b>	Srednja vrednost	0,6218	0,6005	0,5664	0,6295	0,6481	0,5907
	SD	0,03452	0,02915	0,02031	0,04714	0,05956	0,04803
<b>Mozak</b>	Srednja vrednost	0,4470	0,4994*	0,4532	0,4838	0,5043 <sup>‡</sup>	0,4940
	SD	0,009327	0,04510	0,03933	0,02834	0,01995	0,05808
<b>Srce</b>	Medijana	0,2809	0,2711	0,2595	0,2981	0,2802	0,3013
	Opseg	(0,2567-0,3535)	(0,2601-1,773)	(0,2262-0,2868)	(0,2884-0,3416)	(0,2555-0,3255)	(0,2896-0,3182)
<b>Pluća</b>	Medijana	0,4356	0,4906	0,4459	0,4807	0,4810	0,4613
	Opseg	(0,4226-0,4867)	(0,4668-0,5103)	(0,3778-0,4722)	(0,443-0,5213)	(0,4601-0,5612)	(0,3822-0,7063)
<b>Pankreas</b>	Srednja vrednost	0,3641	0,3083	0,2822	0,2276	0,3095	0,2998
	SD	0,09712	0,1505	0,05662	0,04555	0,07308	0,09058
<b>Slezina</b>	Srednja vrednost	0,1766	0,1822	0,1598	0,1740	0,1822	0,1500
	SD	0,01134	0,02252	0,02976	0,01917	0,02283	0,01198
<b>Testisi</b>	Srednja vrednost	0,6682	0,7207	0,6733	0,7121	0,7096	0,8262 <sup>‡</sup>
	SD	0,08768	0,04565	0,04140	0,1253	0,04371	0,05430
<b>Femur</b>	Srednja vrednost	0,2444	0,2540	0,2248	0,2420	0,2463	0,2735 <sup>‡</sup>
	SD	0,01301	0,02350	0,02708	0,02549	0,01353	0,02839

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (Neparametarski Kruskal-Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (u poređenju sa kontrolom); <sup>‡</sup>p < 0,05 (u poređenju sa MIX 2).

#### 4.1.1.3. Nivoi metal(oid)a u krvi

Nivoi ispitivanih metala u krvi kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 7. U poređenju sa kontrolnom grupom, nivoi Pb, Cd i Hg bili su značajno povećani jedino u MIX 5 grupi, dok je nivo As bio značajno povećan u MIX 4 i MIX 5 grupi.

**Tabela 7.** Nivoi ispitivanih metala u krvi pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi metal(oid)a (µg/mL)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Pb</b>	Medijana	0,04215	0,02110	0,03770	0,06130 <sup>†</sup>	0,05920 <sup>†</sup>	0,08300 <sup>†††</sup>

	Opseg	(0,0261-0,0492)	(0,01805-0,03645)	(0,02495-0,0813)	(0,0501-0,0838)	(0,0488-0,139)	(0,06605-0,1146)
<b>Cd</b>	Medijana	0,008500	0,01820	0,01480	0,03500	0,04725	0,08480 <sup>***†</sup>
	Opseg	(0,0072-0,0098)	(0,00975-0,0249)	(0,00945-0,04085)	(0,02115-0,05315)	(0,03995-0,0583)	(0,0608-0,1248)
<b>Hg</b>	Medijana	0,01135	0,01280	0,02370	0,01220	0,01310	0,03570 <sup>†</sup>
	Opseg	(0,00765-0,014)	(0,0057-0,0226)	(0,0084-0,0246)	(0,007475-0,0323)	(0,01205-0,01648)	(0,0191-0,03835)
<b>As</b>	Medijana	0,002050	1,315	1,547	1,696	2,342*	3,985 <sup>***</sup>
	Opseg	(0,00145-0,0043)	(1,072-1,493)	(1,104-1,869)	(1,472-1,973)	(2,098-2,582)	(2,435-5,429)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (Neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (u poređenju sa kontrolom); <sup>†</sup>p < 0,05, <sup>†††</sup>p < 0,001 (u poređenju sa MIX 1).

#### 4.1.1.4. Hematološki parametri

Hematološki parametri izmereni kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 8. Dobijene su statistički povećane vrednosti u broju leukocita i apsolutnog broja bazofila u MIX 5, apsolutnog broja neutrofila i trombocita u MIX 4 i MIX 5, dok je MCHC povećan u svim tretiranim grupama sa najizraženijim efektom u MIX 2 i MIX 3 grupi. Dobijene su statistički značajno smanjene vrednosti broja monocita u MIX 2, MIX 3 i MIX 4, apsolutnog broja monocita u MIX 2 i eozinofila u MIX 2. Smanjene vrednosti Hb, HCT i apsolutnog broja eritrocita izmerene su u MIX 1, MIX 2, MIX 3 i MIX 5, MCH u MIX 2, MIX 4, MIX 5, Fe u MIX 1, MIX 2, MIX 4, MIX 5, dok su vrednosti MCV značajno smanjene u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom.

**Tabela 8.** Hematološki parametri kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar	Prikaz rezultata	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Leukociti [10<sup>9</sup>/l]</b>	Srednja vrednost	3,400	3,240	2,560	4,200	4,900	5,520*
	SD	1,643	0,9940	0,7668	1,581	1,149	2,184
	% u odnosu na kontrolu		-4,706	-24,706	23,529	44,118	62,353
<b>Limfociti [%]</b>	Medijana	82,00	81,50	76,10	81,00	79,35	80,60
	Opseg	79,65 - 86,25	77,65 - 86,05	66,25 - 87,30	77,15 - 82,70	77,93 - 84,30	77,50 - 84,95
	% u odnosu na kontrolu		-0,60976	-7,19512	-1,21951	-3,23171	-1,70732
<b>Monociti [%]</b>	Srednja vrednost	2,420	1,760	1,280*	1,460*	0,8500**	2,080
	SD	0,6573	0,4393	0,4817	0,6189	0,4359	1,071
	% u odnosu na kontrolu		-27,273	-47,107	-39,669	-64,876	-14,050
<b>Neutrofili [%]</b>	Medijana	9,400	10,50	17,10	11,10	13,35	12,00
	Opseg	7,500 - 11,35	7,700 - 12,85	7,500 - 23,20	9,900 - 14,60	10,53 - 13,93	8,150 - 12,50
	% u odnosu na kontrolu		11,70213	81,91489	18,08511	42,02128	27,65957

	kontrolu						
<b>Eozinofili [%]</b>	Medijana	0,2000	0,2000	0,4000*	0,2000	0,1000	0,1000
	Opseg	0,1000 - 0,4000	0,1500 - 0,2000	0,3000 - 1,000	0,1500 - 0,3000	0,1000 - 0,1750	0,1000 - 0,2000
	% u odnosu na kontrolu		0	100	0	-50	-50
<b>Bazofili [%]</b>	Srednja vredost	5,160	5,960	5,780	6,160	5,900	6,020
	SD	1,057	2,018	2,284	1,016	1,813	1,773
	% u odnosu na kontrolu		15,504	12,016	19,380	14,341	16,667
<b>Limfociti aps. [10<sup>9</sup>/l]</b>	Srednja vredost	2,838	2,666	1,996	3,394	3,973	4,488
	SD	1,398	0,8828	0,7830	1,405	1,104	1,806
	% u odnosu na kontrolu		-6,061	-29,669	19,591	39,993	58,140
<b>Monociti aps. [10<sup>9</sup>/l]</b>	Medijana	0,08000	0,06000	0,04000*	0,06000	0,03500	0,1300
	Opseg	0,05000 - 0,1200	0,04000 - 0,06500	0,02000 - 0,04500	0,03000 - 0,09500	0,02000 - 0,05750	0,07000 - 0,1400
	% u odnosu na kontrolu		-25	-50	-25	-56,25	62,5
<b>Neutrofili aps. [10<sup>9</sup>/l]</b>	Medijana	0,2700	0,3200	0,2600	0,5000	0,6250**	0,4000*
	Opseg	0,2000 - 0,4250	0,2650 - 0,3650	0,2300 - 0,5800	0,3750 - 0,5850	0,5350 - 0,6400	0,3450 - 0,9250
	% u odnosu na kontrolu		18,51852	-3,7037	85,18519	131,4815	48,14815
<b>Eozinofili aps. [10<sup>9</sup>/l]</b>	Medijana	0,01000	0,01000	0,01000	0,01000	0,005000	0,01000
	Opseg	0,000 - 0,01000	0,000 - 0,01000	0,00500 - 0,02500	0,01000 - 0,01000	0,000 - 0,01000	0,005000 - 0,01000
	% u odnosu na kontrolu		0	0	0	-50	0
<b>Bazofili aps. [10<sup>9</sup>/l]</b>	Srednja vredost	0,1698	0,1966	0,1448	0,2520	0,2790	0,3242*
	SD	0,08878	0,09401	0,06985	0,07142	0,07399	0,1401
	% u odnosu na kontrolu		15,783	-14,723	48,410	64,311	90,931
<b>Eritrociti aps. (RBC) [10<sup>12</sup>/l]</b>	Medijana	11,00	6,540***	7,060**	7,340**	8,300	7,860*
	Opseg	10,16 - 11,41	6,120 - 7,290	6,790 - 7,440	6,640 - 7,540	7,810 - 8,445	5,760 - 8,070
	% u odnosu na kontrolu		-40,5455	-35,8182	-33,2727	-24,5455	-28,5455
<b>Hemoglobin (Hb) [g/l]</b>	Medijana	226,0	138,0**	140,0*	146,0*	148,0	136,0***
	Opseg	217,0 - 232,0	124,0 - 144,0	137,0 - 144,0	133,0 - 150,0	137,0 - 150,0	98,00 - 140,0
	% u odnosu na kontrolu		-38,9381	-38,0531	-35,3982	-34,5133	-39,823
<b>Hematokrit (HCT) [l/l]</b>	Medijana	0,6720	0,3840**	0,4000**	0,4080*	0,4240	0,3940***
	Opseg	0,6380 - 0,6850	0,3550 - 0,4150	0,3860 - 0,4110	0,3670 - 0,4240	0,3955 - 0,4345	0,2770 - 0,4040
	% u odnosu na kontrolu		-42,8571	-40,4762	-39,2857	-36,9048	-41,369
<b>MCV [fl]</b>	Srednja	61,44	57,68**	55,76****	55,72****	51,05****	49,34****

	vredost						
	SD	3,065	1,117	0,6768	1,314	1,139	1,568
	% u odnosu na kontrolu		-6,120	-9,245	-9,310	-16,911	-19,694
<b>MCH [pg]</b>	Srednja vredost	20,80	20,22	19,76*	19,96	17,70****	17,26****
	SD	1,093	0,6907	0,4278	0,5505	0,4243	0,5857
	% u odnosu na kontrolu		-2,788	-5,000	-4,038	-14,904	-17,019
<b>MCHC [g/dl]</b>	Srednja vredost	338,6	350,8***	354,8****	358,2****	346,8*	349,8**
	SD	3,435	5,310	4,970	4,868	2,630	7,050
	% u odnosu na kontrolu		3,603	4,784	5,789	2,422	3,308
<b>Trombociti [10<sup>9</sup>/l]</b>	Srednja vredost	475,6	532,4	514,8	560,0	665,0**	772,8****
	SD	115,7	57,61	25,16	100,7	75,29	121,4
	% u odnosu na kontrolu		11,943	8,242	17,746	39,823	62,489
<b>Fe [μmol/l]</b>	Srednja vredost	57,92	36,66*	36,25*	49,83	35,37*	38,46*
	SD	16,00	13,39	6,747	1,357	13,35	18,60
	% u odnosu na kontrolu		-36,706	-37,414	-13,968	-38,933	-33,598

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (Neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). RBC: eritrociti, HGB: hemoglobin, HCT: hematokrit, MCV: srednji korpuskularni volumen, MCH: srednji korpuskularni hemoglobin, MCHC: srednja korpuskularna koncentracija hemoglobina. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 (u poređenju sa kontrolom).

Posmatrajući hematološke parametre i modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i hematoloških parametara dobijena je dozna zavisnost sa najužim BMDI za MCH, zatim MCV. Takođe, BMD analiza je pokazala da je uspostavljen odnos doza-odgovor i za leukocite, eozinofile, apsolutni broj limfocita, apsolutni broj neutrofila i apsolutni broj bazofila, MCHC i trombocite sa širim intervalima. Uzimajući u obzir kriterijume za potvrdu efekta, najniža BMDL vrednost utvrđena je za MCV (BMDL: 3,150E-04 mg Pb/kg t.m./dan, 1,050E-03 mg Cd/kg t.m./dan, 2,100E-05 mg Hg/kg t.m./dan i 2,100E-04 mg As/kg t.m./dan). Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 9, dok je grafički prikaz potvrđenih efekata u Prilogu 1 (Slika 1). Za ostale ispitivane efekte na hematološke parametre u krvi nije dobijena dozna zavisnost.

**Tabela 9.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene hematološke parametre kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
<b>Leukociti [10<sup>9</sup>/l]</b>	4,350E-08 - 7,740E-02	1,450E-07 - 2,580E-01	2,900E-09 - 5,160E-03	2,900E-08 - 5,160E-02
<b>Eozinofili [%]</b>	1,944E-08 - 3,810E-01	6,480E-08 - 1,270E+00	1,296E-09 - 2,540E-02	1,296E-08 - 2,540E-01
<b>Limfociti aps. [10<sup>9</sup>/l]</b>	6,000E-08 - 3,570E-01	2,000E-07 - 1,190E+00	4,000E-09 - 2,380E-02	4,000E-08 - 2,380E-01
<b>Neutrofili</b>	5,820E-09 - 3,510E-02	1,940E-08 - 1,170E-01	3,880E-10 - 2,340E-03	3,880E-09 - 2,340E-02

<b>aps.</b> [10 <sup>9</sup> /l]				
<b>Bazofili</b> <b>aps.</b> [10 <sup>9</sup> /l]	2,424E-08 - 5,160E-02	8,080E-08 - 1,720E-01	1,616E-09 - 3,440E-03	1,616E-08 - 3,440E-02
<b>MCV [fl]</b>	<b>3,150E-04 - 1,077E-02</b>	<b>1,050E-03 - 3,590E-02</b>	<b>2,100E-05 - 7,180E-04</b>	<b>2,100E-04 - 7,180E-03</b>
<b>MCH [pg]</b>	<b>6,030E-03 - 1,287E-01</b>	<b>2,010E-02 - 4,290E-01</b>	<b>4,020E-04 - 8,580E-03</b>	<b>4,020E-03 - 8,580E-02</b>
<b>MCHC</b> [g/dl]	6,900E-02 -2,745E+02	2,300E-01 -9,150E+02	4,600E-03 -1,830E+01	4,600E-02 -1,830E+02
<b>Trombociti</b> [10 <sup>9</sup> /l]	1,917E-05 - 6,990E-02	6,390E-05 - 2,330E-01	1,278E-06 - 4,660E-03	1,278E-05 - 4,660E-02

MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza. Podebljano označene vrednosti su intervali doza-odgovor koji ispunjavaju kriterijume za prihvatanje (BMDU/BMDL < 50, BMD/BMDL < 20, da izračunata BMD nije 10 puta niža od najniže doze primenjene u studiji). MCV: srednji korpuskularni volumen, MCH: srednji korpuskularni hemoglobin, MCHC: srednja korpuskularna koncentracija hemoglobina.

#### 4.1.1.5. Biohemijski parametri

Biohemijski parametri izmereni kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 10.

U grupi MIX 3 uočena je statistički značajno niža vrednost u nivou CRP u poređenju sa grupom MIX 1, iako ni u jednoj tretiranoj grupi nije uočeno značajno odstupanje od vrednosti kontrolne grupe.

Nivo glukoze u krvi eksperimentalnih životinja takođe nije bio statistički značajno izmenjen u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, ali je u grupi MIX 1 i MIX 5 uočeno povećanje nivoa ovog parametra.

Nivo ukupnog holesterola nije bio statistički značajno izmenjen u tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, ali je u MIX 4 grupi uočeno značajno smanjenje ovog parametra u poređenju sa MIX 2 grupom. Uočeno je smanjenje HDL nivoa zavisno od doze, ali je statistički značajna razlika uočena samo u MIX 5 grupi. LDL nivoi nisu bili značajno različiti u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, ali je u MIX 5 grupi uočeno značajno povećanje LDL nivoa u poređenju sa MIX 1 grupom. Uočeno je smanjenje nivoa triglicerida u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, sa statističkom značajnošću u MIX 1, MIX 3, MIX 4, MIX 5 grupi.

Uočen je smanjen nivo uree u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, sa statističkom značajnošću u MIX 2 grupi. Zabeleženo je i statistički značajno smanjenje nivoa kreatinina u MIX 4 grupi u poređenju sa MIX 1 i MIX 2 grupom. Nivo mokraćne kiseline je u svim tretiranim grupama bio povećan, ali bez statističke značajnosti.

U nivou ukupnih proteina nije bilo statistički značajnih promena, ni u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, ni pri poređenju tretiranih grupa. Uočen je smanjen nivo albumina u MIX 5 grupi u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe i MIX 3 grupe.

Od biohemijskih parametara funkcije jetre u serumu, uočena su značajna odstupanja od vrednosti kontrolne grupe u nivoima direktnog bilirubina i ALP, dok ukupni bilirubin, ALT i AST nisu bili značajno različiti u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe. U poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, direktni bilirubin bio je značajno povećan u svim grupama, dok je ALP bio povećan u svim tretiranim grupama sa najizraženijim efektom u grupi MIX 5. Uočen je isti obrazac promena u nivoima AST i ALT, čije su vrednosti bile blago povećane u MIX 1 i MIX 2 grupi, dok su smanjene vrednosti uočene u višim doznim nivoima (MIX 3, MIX 4 i MIX 5 grupi).

Vrednosti kreatin kinaze nisu bile značajno promenjene u poređenju sa kontrolnim vrednostima, iako je uočeno povećanje u MIX 1 i MIX 2 grupi.

Uočeno je značajno povećanje homocisteina u MIX 2 grupi u odnosu na kontrolne vrednosti.

Smanjene vrednosti serumskog gvožđa uočene su u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, sa statističkom značajnošću u MIX 1, MIX 2, MIX 4, MIX 5 grupi, dok su vrednosti  $\text{Na}^+$  značajno smanjene u MIX 1 u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe. Nisu uočene statistički značajne razlike u nivoima  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe.

**Tabela 10.** Biohemijski parametri kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar	Prikaz rezultata	Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
CRP (mg/L)	Medijana	0,07000	0,1000	0,09000	0,05000†	0,09000	0,08000
	Opseg	0,025-0,195	0,06-0,115	0,0575-0,1075	0,00975-0,085	0,09-0,09	0,07-0,11
	% u odnosu na kontrolu		42,857	28,571	-28,571	28,571	14,286
Glukoza (mmol/L)	Medijana	9,000	15,80	8,850	7,000	7,600	12,30
	Opseg	7,8-20,95	7,3-20,4	5,875-9,725	5,3-14,33	2,9-11,7	9,2-20,65
	% u odnosu na kontrolu		75,556	-1,667	-22,222	-15,556	36,667
Holesterol (mmol/L)	Srednja vrednost	1,452	1,490	1,568	1,360	1,270‡	1,394
	SD	0,09121	0,1063	0,1680	0,1649	0,1308	0,2372
	% u odnosu na kontrolu		2,617	7,989	-6,336	-12,534	-3,994
HDL (mmol/L)	Srednja vrednost	1,102	1,016	0,9875	0,9250	0,8867	0,8700*
	SD	0,1008	0,1038	0,1517	0,1038	0,06506	0,2442
	% u odnosu na kontrolu		-7,804	-10,390	-16,062	-19,537	-21,053
LDL (mmol/L)	Medijana	0,2100	0,1300	0,1300	0,1250	0,1400	0,4100†
	Opseg	0,14-0,245	0,035-0,23	0,1125-0,2975	0,095-0,305	0,13-0,23	0,2-0,435
	% u odnosu na kontrolu		-38,095	-38,095	-40,476	-33,333	95,238
Trigliceridi (mmol/L)	Srednja vrednost	1,078	0,7520*	0,9675	0,5775****‡	0,4767****‡	0,4900****†‡
	SD	0,1386	0,2331	0,2883	0,1028	0,1115	0,1823

	% u odnosu na kontrolu		-30,241	-10,250	-46,429	-55,779	-54,545
<b>Urea (mmol/L)</b>	Medijana	10,00	7,400	6,200**	6,850	7,300	7,600
	Opseg	9,25-10,1	6,75-8,15	5,9-7,025	6,125-8,025	7-7,3	6,8-9,55
	% u odnosu na kontrolu		-26,000	-38,000	-31,500	-27,000	-24,000
<b>Kreatinin (μmol/L)</b>	Srednja vrednost	39,20	43,60	42,50	41,00	34,00 <sup>††</sup>	40,80
	SD	3,701	6,229	2,887	5,831	1,732	5,404
	% u odnosu na kontrolu		11,224	8,418	4,592	-13,265	4,082
<b>Mokraćna kiselina (μmol/L)</b>	Srednja vrednost	202,4	354,8	258,0	280,3	221,7	266,8
	SD	96,53	158,7	82,37	128,6	76,01	133,7
	% u odnosu na kontrolu		75,296	27,470	38,488	9,536	31,818
<b>Ukupni proteini (g/L)</b>	Srednja vrednost	64,20	64,00	64,25	64,50	65,00	62,40
	SD	3,271	2,236	3,594	3,109	4,359	1,817
	% u odnosu na kontrolu		-0,312	0,078	0,467	1,246	-2,804
<b>Albumin (g/L)</b>	Medijana	44,00	43,00	43,50	44,50	43,00	39,00 <sup>***#</sup>
	Opseg	43-45,5	40-44,5	41,5-44,75	42,5-45	33-46	39-40,5
	% u odnosu na kontrolu		-2,273	-1,136	1,136	-2,273	-11,364
<b>Ukupni bilirubin (μmol/L)</b>	Medijana	1,000	1,200	1,400	1,150	1,300	1,200
	Opseg	0,95-1,3	0,95-1,55	1,25-2,375	0,95-1,425	1,2-1,5	0,95-1,65
	% u odnosu na kontrolu		20,000	40,000	15,000	30,000	20,000
<b>Direktni bilirubin (μmol/L)</b>	Srednja vrednost	0,2600	0,5600*	0,4000*	0,5250*	0,5333*	0,5400*
	SD	0,2074	0,1673	0,2582	0,1258	0,1155	0,1817
	% u odnosu na kontrolu		115,385	53,846	101,923	105,115	107,692
<b>AST (U/L)</b>	Medijana	235,0	244,0	246,0	147,0	140,0	147,0
	Opseg	146-424,5	153,5-272,5	189,8-324,8	116,5-288,5	133-199	136,5-171

	% u odnosu na kontrolu		3,830	4,681	-37,447	-40,426	-37,447
<b>ALT (U/L)</b>	Medijana	60,00	61,00	71,00	53,00	58,00	51,00 <sup>‡</sup>
	Opseg	53,5-115,5	51-74	65,25-76,75	47,5-78,75	51-64	45-69
	% u odnosu na kontrolu		1,667	18,333	-11,667	-3,333	-15,000
<b>ALP (U/L)</b>	Srednja vrednost	236,8	164,6 <sup>***</sup>	185,3 <sup>*</sup>	175,8 <sup>**</sup>	146,0 <sup>***</sup>	131,2 <sup>****‡#</sup>
	SD	13,29	32,78	50,68	10,94	9,849	32,88
	% u odnosu na kontrolu		-30,490	-21,748	-25,760	-38,345	-44,595
<b>Kreatin kinaza (U/L)</b>	Medijana	1161	5457	5937	1823	810,0	1706
	Opseg	888,5-7008	2593-7894	2279-9854	355,8-7001	405-4599	621-2558
	% u odnosu na kontrolu		370,026	411,370	57,020	-30,233	46,942
<b>Homocistein (µmol/L)</b>	Srednja vrednost	9,236	10,20	13,23 <sup>*</sup>	11,03	8,863 <sup>‡</sup>	8,982 <sup>‡</sup>
	SD	3,250	3,123	0,5180	2,593	2,608	1,733
	% u odnosu na kontrolu		10,437	43,244	19,424	-4,039	-2,750
<b>Serumsko gvožđe (µmol/L)</b>	Srednja vrednost	57,92	36,66 <sup>*</sup>	36,25 <sup>*</sup>	49,83	35,37 <sup>*</sup>	38,46 <sup>*</sup>
	SD	16,00	13,39	6,747	1,357	13,35	18,60
	% u odnosu na kontrolu		-36,706	-37,414	-13,968	-38,933	-33,598
<b>Na<sup>+</sup> (mmol/L)</b>	Srednja vrednost	152,2	144,8 <sup>*</sup>	148,8	154,3 <sup>††</sup>	153,7 <sup>†</sup>	147,4 <sup>#</sup>
	SD	2,168	2,168	5,679	7,411	5,774	3,362
	% u odnosu na kontrolu		-4,862	-2,234	1,380	0,986	-3,154
<b>K<sup>+</sup> (mmol/L)</b>	Srednja vrednost	6,420	7,460	7,725	7,100	6,667	7,080
	SD	1,018	1,043	1,204	0,9626	1,250	1,195
	% u odnosu na kontrolu		16,199	20,327	10,592	3,847	10,280
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Srednja vrednost	103,6	99,80	102,3	104,8 <sup>†</sup>	103,7	103,0

<b>(mmol/L)</b>	SD	1,342	1,924	4,573	4,113	3,512	2,000
	% u odnosu na kontrolu		-3,668	-1,255	1,158	0,097	-0,579
<b>Ca<sup>2+</sup></b> <b>(mmol/L)</b>	Medijana	3,220	3,290	3,465	2,775	3,770	3,450
	Opseg	3,13-3,335	3,13-3,78	2,418-3,755	2,233-3,73	2,29-3,84	3,115-3,735
	% u odnosu na kontrolu		2,174	7,609	-13,820	17,081	7,143
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b> <b>(mmol/L)</b>	Srednja vrednost	3,652	3,744	4,020	4,118	4,080	3,220
	SD	0,4289	0,4387	0,3556	0,4245	0,4036	0,4720
	% u odnosu na kontrolu		2,519	10,077	12,760	11,720	-11,829
<b>Mg<sup>2+</sup></b> <b>(mmol/L)</b>	Srednja vrednost	1,576	1,816	1,793	1,865	1,657	1,606
	SD	0,3118	0,3682	0,1863	0,1682	0,07234	0,3860
	% u odnosu na kontrolu		15,228	13,769	18,338	5,140	1,904

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (Neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6 CRP: C-reaktivni protein; AST: aspartat aminotransferaza, ALT: alanin aminotransferaza, ALP: alkalna fosfataza, HDL: lipoprotein visoke gustine, LDL: lipoprotein niske gustine.\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 (u poređenju sa kontrolnom grupom); †p < 0.05 (u poređenju sa MIX 1 grupom); ‡p < 0.05 (u poređenju sa MIX 2 grupom); #p < 0.05 (u poređenju sa MIX 3 grupom); Ψ p < 0.05(u poređenju sa MIX 4 grupom).

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i biohemijskih parametara u krvi, potvrđena je dozna zavisnost za albumin, ALP, neorganski fosfor, HDL i trigliceride. Kriterijume za potvrdu efekta ispunjava rezultat modelovanja odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i neorganskog fosfata. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 11, dok je grafički prikaz potvrđenog efekata u Prilogu 1 (Slika 2). Za ostale ispitivane efekte na biohemijske parametre nije potvrđena dozna zavisnost.

**Tabela 11.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene biohemijske parametre kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
HDL	2,13E-07 - 3,81E-01	7,11E-07 - 1,27E+00	1,42E-08 - 2,54E-02	1,42E-07 - 2,54E-01
Trigliceridi	6,15E-09 - 1,19E-02	2,05E-08 - 3,96E-02	4,10E-10 - 7,92E-04	4,10E-09 - 7,92E-03
Albumin	9,78E-03 - 9,39E-01	3,26E-02 - 3,13E+00	6,52E-04 - 6,26E-02	6,52E-03 - 6,26E-01
ALP	5,34E-09 - 3,75E-03	1,78E-08 - 1,25E-02	3,56E-10 - 2,50E-04	3,56E-09 - 2,50E-03

Fosfor neorganski	4,11E-02 - 7,11E-01	1,37E-01 - 2,37E+00	2,74E-03 - 4,74E-02	2,74E-02 - 4,74E-01
-------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------

MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza. Podebljano označene vrednosti su intervali doza-odgovor koji ispunjavaju kriterijume za prihvatanje (BMDU/BMDL < 50, BMD/BMDL < 20, da izračunata BMD nije 10 puta niža od najniže doze primenjene u studiji) .

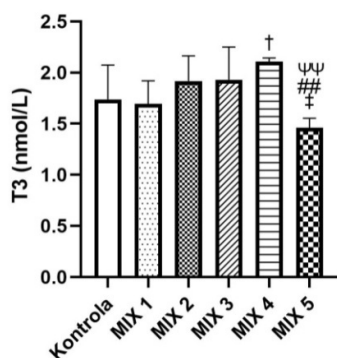
#### 4.1.1.6. Nivoi hormona

Hormoni izmereni u krvi eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su na Slici 5.

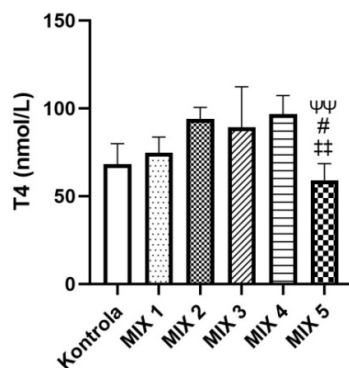
Nivoi T3 i T4 hormona bili su povećani u MIX 2, MIX 3 i MIX 4 grupi bez statističke značajnosti. Međutim, u poređenju sa grupama sa povećanim vrednostima T3 i T4, MIX 5 grupa je imala značajno niže vrednosti. Sličan trend uočen je i u slučaju fT3 i fT4, sa značajnim povećanjem u MIX 2 i MIX 4 grupi u slučaju fT4.

Uočeno je da je nivo androstendiona značajno povećan u MIX 1 grupi, dok je nivo kortizola značajno smanjen u MIX 4 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Dobijeno je i da je nivo aldosterona značajno smanjen u MIX 3 i MIX 4 grupi, dok je MIX 5 grupa imala blago povećane vrednosti u poređenju sa kontrolnom grupom. Nivoi testosterona i renina nisu bili značajno promenjeni u poređenju sa kontrolom.

**A**

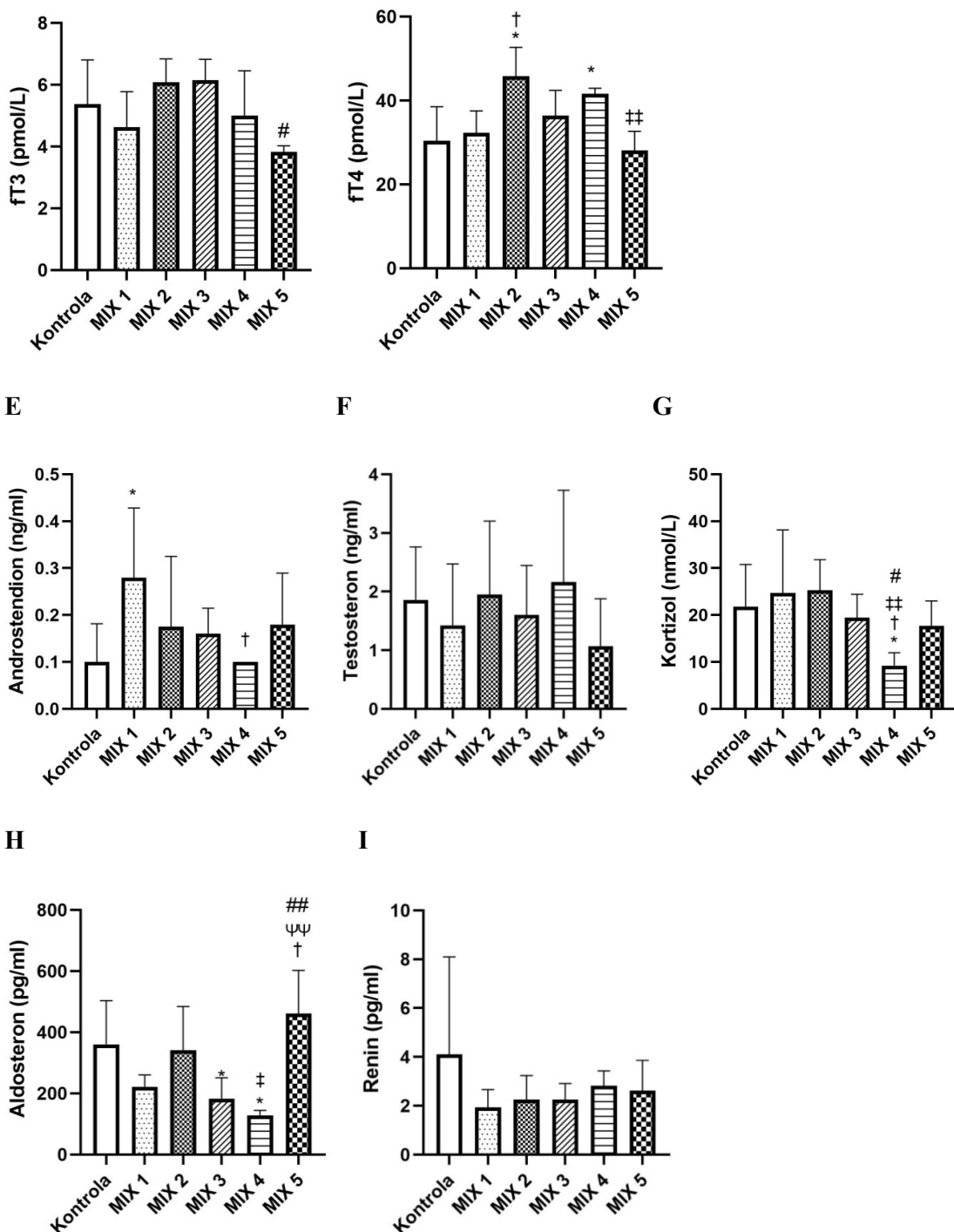


**B**



**C**

**D**



**Slika 5. Hormoni u krvi pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše Pb, Cd, Hg i As.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). T3: trijodtironin, T4: tiroksin, FT3: slobodni trijodtironin, FT4: slobodni tiroksin. \*p < 0.05 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0.05 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0.05, ##p < 0.01 (u poređenju sa MIX 2); #p < 0.05, ###p < 0.01 (u poređenju sa MIX 3); ΨΨp < 0.01 (u poređenju sa MIX 4).

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i nivoa hormona u krvi, potvrđena je dozna zavisnost za aldosteron, fT3, kortizol i T3. Kriterijume za potvrdu efekta ispunjava rezultat

modelovanja odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i T3. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 12, dok je grafički prikaz potvrđenog efekata u Prilogu 1 (Slika 3). Za ostale ispitivane efekte na nivo hormona u krvi nije potvrđena dozna zavisnost.

**Tabela 12.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene nivoe hormona kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
T3	2,29E-02 - 6,84E-01	7,64E-02 - 2,28E+00	1,53E-03 - 4,56E-02	1,53E-02 - 4,56E-01
ft3	8,40E-03 - 5,88E-01	2,80E-02 - 1,96E+00	5,60E-04 - 3,92E-02	5,60E-03 - 3,92E-01
Kortizol	2,21E-07 - 1,16E-01	7,36E-07 - 3,86E-01	1,47E-08 - 7,72E-03	1,47E-07 - 7,72E-02
Aldosteron	5,04E-06 - 4,59E-01	1,68E-05 - 1,53E+00	3,36E-07 - 3,06E-02	3,36E-06 - 3,06E-01

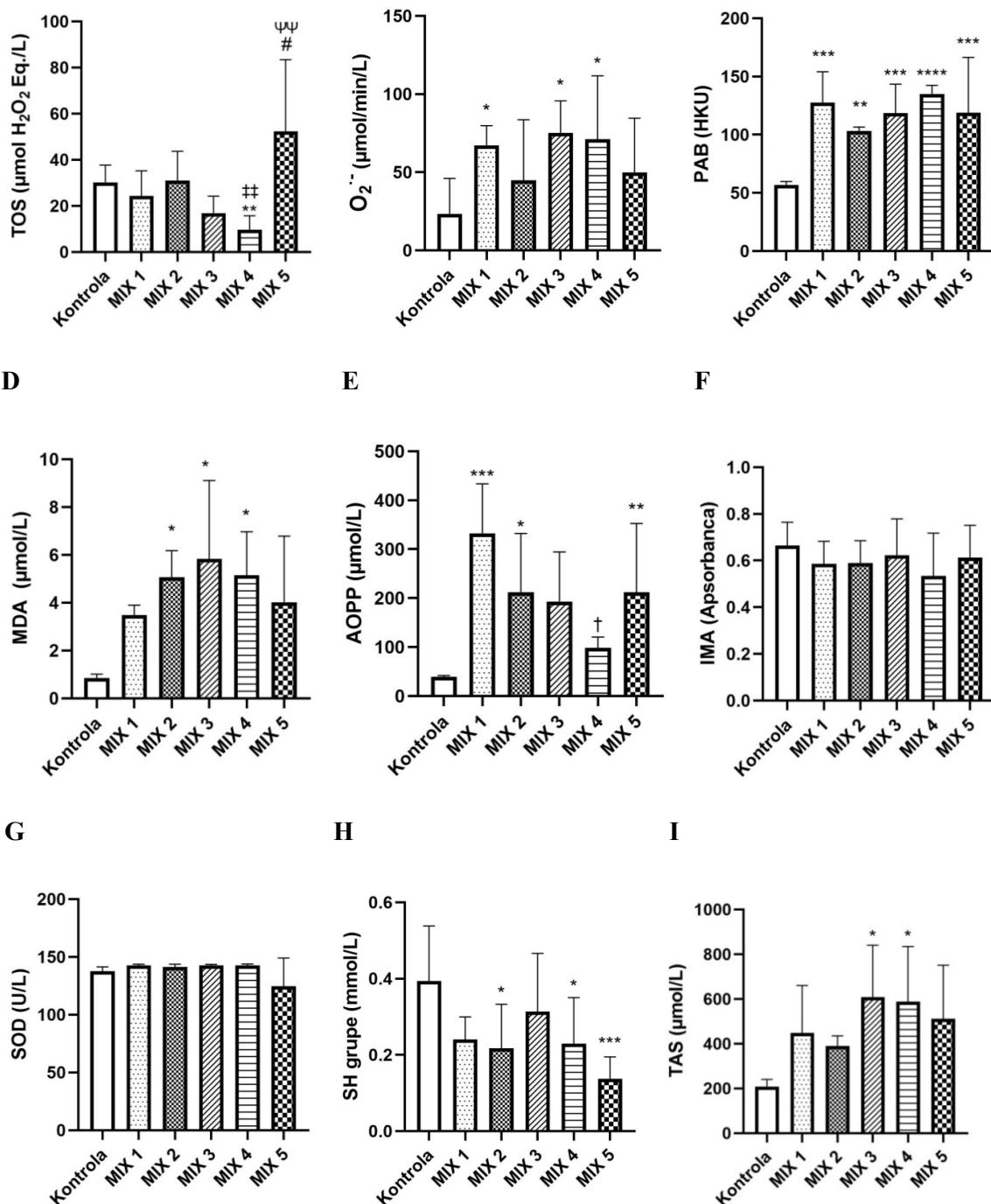
MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza. Podebljano označene vrednosti su intervali doza-odgovor koji ispunjavaju kriterijume za prihvatanje (BMDU/BMDL < 50, BMD/BMDL < 20, da izračunata BMD nije 10 puta niža od najniže doze primenjene u studiji). T3: trijodtironin, ft3: slobodni trijodtironin.

#### 4.1.1.7. Parametri redoks statusa u plazmi

Parametri redoks statusa izmereni u plazmi kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su na Slici 6.

Značajno povećanje u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe uočeno je kod sledećih parametara: O<sub>2</sub><sup>-</sup> – u MIX 1, MIX 3 i MIX 4 grupi, PAB – u svim tretiranim grupama, MDA - u MIX 2, MIX 3 i MIX 4 grupi, AOPP - u MIX 1, MIX 2 i MIX 5 grupi, TAS – MIX 3 i MIX 4 grupi. Značajno smanjenje u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe uočeno je kod parametara TOS - u MIX 4 grupi i SH grupa - u MIX 2, MIX 4 i MIX 5 grupi.

Takođe, uočen je značajno različit indeks oksidativnog stresa u MIX 4 grupi u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe (Prilog 1 Tabela 1). Dodatno, uočeno je da skor oksidativnog oštećenja bio značajno izmenjen u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, međutim značajne izmene u vrednostima skora oksidativne ravnoteže uočene su u MIX 1, MIX 2 i MIX 5 grupi (Prilog 1 Tabela 2).



**Slika 6. Parametri redoks statusa u plazmi pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)) medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). TOS: totalni oksidativni status,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijom modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, TAS: totalni antioksidativni status. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  (u poređenju sa kontrolom); † $p < 0,05$  (u poređenju sa MIX 1); ‡ $p < 0,01$  (u poređenju sa MIX 2); # $p < 0,05$  (u poređenju sa MIX 3); <sup>UV</sup> $p < 0,01$  (u poređenju sa MIX 4).

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i parametara redoks statusa u plazmi potvrđena je dozna zavisnost za nivoe MDA, SH i SOD. Kriterijume za potvrdu efekta ispunjava rezultat modelovanja odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i nivoa SOD. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 13, dok je grafički prikaz potvrđenog efekta u Prilogu 1 Slika 4. Za ostale ispitivane efekte na nivo parametara oksidativnog stresa u krvi nije potvrđena dozna zavisnost. Najuzi BMDI za efekte vezane za krv, predstavlja BMDI za SOD u krvi.

**Tabela 13.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene parametre redoks statusa u plazmi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX).

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
MDA	3,00E-09 - 2,23E-04	1,00E-08 - 7,43E-04	<b>2,00E-10</b> - 1,49E-05	2,00E-09 - 1,49E-04
SOD	<b>1,81E-01 - 7,89E-01</b>	<b>6,03E-01 - 2,63E+00</b>	<b>1,21E-02 - 5,26E-02</b>	<b>1,21E-01 - 5,26E-01</b>
SH	7,95E-09 - 2,23E-01	2,65E-08 - 7,43E-01	5,30E-10 - 1,49E-02	5,30E-09 - 1,49E-01

MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza. Podebljano označene vrednosti su intervali doza-odgovor koji ispunjavaju kriterijume za prihvatanje (BMDU/BMDL < 50, BMD/BMDL < 20, da izračunata BMD nije 10 puta niža od najniže doze primenjene u studiji).

#### 4.1.1.8. Nivoi bioelemenata u krvi

Nivoi ispitivanih bioelemenata u krvi kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 14. Nivoi bioelemenata nisu se značajno razlikovali u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, iako je uočeno smanjenje u nivoima Zn i Fe u MIX 5 grupi.

**Tabela 14.** Nivoi ispitivanih bioelemenata u krvi pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi bioelemenata (µg/mL)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	1,249	1,215	1,269	1,395	1,782	1,330
	SD	0,2259	0,06694	0,2729	0,4048	0,3200	0,2608
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	7,381	6,065	6,707	7,697	7,359	5,187
	SD	1,728	0,5059	1,400	2,516	0,9419	1,331
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	736,7	684,4	756,9	764,8	833,9	539,1 <sup>ψ</sup>
	SD	295,7	65,50	162,3	148,1	115,7	197,4
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	0,2888	0,2297	0,2782	0,2727	0,2809	0,2155
	SD	0,08198	0,01796	0,05690	0,07365	0,01217	0,04800

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).  $\psi$  p < 0.05 (u poređenju sa MIX 4).

#### 4.1.1.9. Nivoi metal(oid)a i bioelemenata u fecesu

Nivoi ispitivanih metal(oid)a u fecesu eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metal(oid)a (Pb+Cd+Hg+As) nakon 14 i 28 dana prikazani su u Tabeli 15. Nakon 14 dana, uočeno je značajno povećanje nivoa Cd u fecesu u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Nakon 28 dana, uočeno je značajno povećanje nivoa Pb u fecesu u MIX 4 i MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je nivo Cd bio značajno povećan u MIX 5 grupi.

**Tabela 15.** Nivoi ispitivanih metal(oid)a u fecesu pacova nakon 14. i 28. dana oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi metal(oid)a ( $\mu\text{g/g}$ )		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Feces (14. dan)</b>							
<b>Pb</b>	<b>Medijana</b>	1,861	1,681	2,321	2,779	2,124	16,48
	<b>Opseg</b>	(1,151-2,261)	(1,082-11,24)	(2,067-9,424)	(0,919-12,56)	(1,173-4,143)	(7,035-21,17)
<b>Cd</b>	<b>Medijana</b>	0,5371	0,3345	0,7257	1,682	2,488 <sup>†</sup>	65,91 <sup>***††</sup>
	<b>Opseg</b>	(0,1465-0,6479)	(0,18-0,4172)	(0,5271-0,8772)	(1,42-2,52)	(1,875-4,887)	(27,44-74,09)
<b>Hg</b>	<b>Medijana</b>	NA	0,08824	0,04910	0,04168	0,02882	0,07035
	<b>Opseg</b>	NA	(0,02489-0,1137)	(0,02194-0,07695)	(0,01224-0,1677)	(0,02047-0,03716)	(0,06741-0,139)
<b>As</b>		NA	0,1544	0,6204	0,05001	0,08453	0,2704
		NA	(0,08287-0,4513)	(0,4388-0,802)	(0,013-0,08702)	(0,02758-0,08778)	(0,1763-0,3401)
<b>Feces (28. dan)</b>							
<b>Pb</b>	<b>Medijana</b>	0,7776	1,255	2,350	14,75	11,94	61,92 <sup>***†</sup>
	<b>Opseg</b>	(0,5771-1,023)	(0,7396-1,739)	(1,522-3,267)	(2,297-19,22)	(8,758-44,13)	(45,13-131,9)
<b>Cd</b>	<b>Medijana</b>	0,4964	0,8023	4,726	48,70	28,22	232,6 <sup>***††</sup>
	<b>Opseg</b>	(0,2765-1,573)	(0,3597-2,213)	(1,634-7,058)	(7,057-69,09)	(24,35-137,4)	(174,5-480,4)
<b>Hg</b>	<b>Medijana</b>	0,04639	0,01291	0,08685	0,06853	0,02361	0,4650
	<b>Opseg</b>	(0,005657-0,08082)	(0,01092-0,05064)	(0,05949-0,3407)	(0,03902-0,187)	(0,01253-0,1308)	(0,2965-1,038)
<b>As</b>	<b>Srednja vrednost</b>	0,4424	0,1522	0,3157	0,2186	0,2556	0,3619

	<b>SD</b>	0,2354	0,09455	0,1447	0,2296	0,1644	0,2604
--	-----------	--------	---------	--------	--------	--------	--------

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (u poređenju sa kontrolom); <sup>†</sup> $p < 0.05$ , <sup>††</sup> $p < 0.01$ , <sup>†††</sup> $p < 0.001$  (u poređenju sa MIX 1); <sup>‡</sup> $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 2). NA- ispod limita kvantifikacije (LOQ: 0,00002  $\mu\text{g/mL}$ ).

Nivoi ispitivanih bioelemenata u fecesu eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala nakon 14 i 28 dana prikazani su u Tabeli 16. Nakon 14 dana, uočeno je značajno smanjenje nivoa Fe u fecesu u MIX 1 i MIX 4 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je u MIX 5 grupi uočeno blago povećanje. Nakon 28 dana, uočeno je blago povećanje nivoa svih bioelemenata u poređenju sa kontrolnom grupom, bez statističke značajnosti.

**Tabela 16.** Nivoi ispitivanih bioelemenata u fecesu pacova nakon dva vremenska perioda (14. i 28. dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi bioelemenata ( $\mu\text{g/g}$ )		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Feces (14. dan)</b>							
Cu	Medijana	48,43	25,87	28,49	30,12	20,98	56,47 <sup>ΨΨ</sup>
	Opseg	(34,12-53,02)	(22,39-31,1)	(21,3-31,34)	(27,71-32,18)	(16,49-33,72)	(47,85-62,85)
Zn	Medijana	409,1	212,2	222,9	255,1	189,3	423,6 <sup>†ΨΨ</sup>
	Opseg	(274,6-433,5)	(192,7-244,8)	(175,8-254,8)	(226-264,6)	(139-289,3)	(392,1-492,5)
Fe	Srednja vrednost	508,1	307,5*	328,2	342,7	298,7*	639,3 <sup>†††††###ΨΨΨ</sup>
	SD	99,90	38,81	79,75	42,54	155,7	100,9
Mn	Medijana	381,6	197,7	213,4	228,2	166,3	399,5 <sup>†ΨΨ</sup>
	Opseg	(247,6-395,6)	(181,2-221,8)	(169,5-228)	(203-247,2)	(125,1-275)	(365,7-470,7)
<b>Feces (28. dan)</b>							
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	46,60	54,26	63,45	58,59	60,20	55,44
	SD	13,26	15,39	4,172	15,47	11,45	9,076
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	337,9	387,7	503,7	427,5	455,2	436,2
	SD	98,44	126,0	82,77	110,4	75,96	82,48
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	437,0	507,8	571,7	557,4	587,8	594,9
	SD	119,5	161,1	62,48	140,3	98,81	125,5

<b>Mn</b>	Medijana	309,0	359,5	398,1	381,8	352,2	368,8
	Opseg	(222,1-347)	(227,4-415,2)	(371,3-414,7)	(276-405,7)	(315,4-412,3)	(299,1-396,3)

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0.05 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0.05, ††p < 0.001 (u poređenju sa MIX 1); †††p < 0.001 (u poređenju sa MIX 2); ††††p < 0.001 (u poređenju sa MIX 3); †††††p < 0.01, ††††††p (u poređenju sa MIX 4).

#### 4.1.1.10. Nivoi metal(oid)a u tkivima

##### Jetra

Nivoi ispitivanih metala u tkivu jetre kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 17. Iako je primećen veći nivo Pb u MIX 5 grupi, nije bilo značajne razlike u poređenju sa kontrolnom grupom ni u jednoj tretiranoj grupi. Nivo Cd bio je značajno povećan u višim doznim nivoima – u MIX 3, MIX 4 i MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. U poređenju sa kontrolnom grupom, nivo Hg bio je značajno smanjen u MIX 3 i MIX 4 grupi, dok je nivo As bio značajno povećan u MIX 5 grupi.

**Tabela 17.** Nivoi ispitivanih metala u jetri pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi metal(oid)a(μg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Pb</b>	Medijana	0,1621	0,1329	0,1317	0,1671	0,1739	0,2203 <sup>†</sup>
	Opseg	(0,1291-0,1951)	(0,08022-0,2617)	(0,1179-0,2278)	(0,1083-0,3664)	(0,1527-0,2786)	(0,174-0,3243)
<b>Cd</b>	Medijana	0,05487	0,04405	0,1434	1,204 <sup>†</sup>	3,088 <sup>†††</sup>	9,235 <sup>††††††††</sup>
	Opseg	(0,04335-0,06529)	(0,04104-0,06937)	(0,101-0,1732)	(0,9679-1,293)	(2,552-3,439)	(8,37-13,23)
<b>Hg</b>	Medijana	0,01728	0,01481	0,01493	0,003048	0,0003890*	0,07832 <sup>††††</sup>
	Opseg	(0,01645-0,02209)	(0,001867-0,01683)	(0,008149-0,02129)	(0,001439-0,00341)	(0,000326-0,01478)	(0,03188-0,09673)
<b>As</b>	Srednja vrednost	0,05092	0,09426	0,1008	0,09128	0,1014	0,1498 <sup>††††#</sup>
	SD	0,008347	0,05338	0,01420	0,01617	0,07133	0,01879

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (Neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0.05, ††p < 0.01, †††p < 0.0001 (u poređenju sa MIX 1); ††p < 0.01 (u poređenju sa MIX 2); #p < 0.05, ††p < 0.01 (u poređenju sa MIX 3).

##### Bubrezi

Nivoi ispitivanih metala u tkivu bubrega kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 18. U poređenju sa kontrolom, nivoi Pb i Cd i Hg bili su značajno povećani u grupama tretiranim višim doznim nivoima - u MIX 3, MIX 4 i MIX

5 grupi, dok je nivo Hg bio značajno povećan u MIX 4 i MIX 5 grupi. U slučaju As, značajno povećanje u tkivu bubrega u poređenju sa kontrolom uočeno je jedino u grupi tretiranoj najvišim doznom nivoom.

**Tabela 18.** Nivoi ispitivanih metala u bubregu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi metal(oid)a (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Pb</b>	Medijana	0,01698	0,03925	0,04701	0,1399 <sup>†</sup>	0,2906 <sup>††</sup>	0,7348 <sup>††††</sup>
	Opseg	(0,01622-0,02217)	(0,02372-0,09923)	(0,03194-0,08099)	(0,08734-0,1747)	(0,2697-0,3275)	(0,5751-1,028)
<b>Cd</b>	Medijana	0,01013	0,01648	0,07011	0,5643 <sup>†</sup>	1,931 <sup>†††</sup>	5,372 <sup>†††††</sup>
	Opseg	(0,008116-0,0407)	(0,01559-0,02055)	(0,05893-0,1202)	(0,5509-0,6898)	(1,44-2,019)	(5,108-6,919)
<b>Hg</b>	Medijana	0,03609	0,01009	0,0005810	0,1243 <sup>‡</sup>	0,3961 <sup>†††</sup>	2,042 <sup>††††††#</sup>
	Opseg	(0,02227-0,0673)	(0,002311-0,01787)	(0,000546-0,01076)	(0,08694-0,1382)	(0,2818-0,426)	(1,414-2,958)
<b>As</b>	Medijana	0,08969	0,08438	0,08474	0,08833	0,08065	0,2080 <sup>††††#ψψ</sup>
	Opseg	(0,06027-0,1156)	(0,07449-0,08931)	(0,07428-0,09214)	(0,07554-0,09413)	(0,07636-0,1211)	(0,154-0,2513)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001 (u poređenju sa kontrolom). †p < 0,05, ††p < 0,01, †††p < 0,001 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0,05, ‡†p < 0,01, ‡††p < 0,0001 (u poređenju sa MIX 2); # p < 0,05 (u poređenju sa MIX 3); ψψ p < 0,01 < 0,0001 (u poređenju sa MIX 4).

## Mozak

Nivoi ispitivanih metala u tkivu mozga kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 19. Uočeno je blago povećanje nivoa Pb u MIX 5 grupi u odnosu na kontrolu, bez statističke značajnosti. Takođe, uočeno je dozno-zavisno povećanje Cd u tretiranim grupama sa statističkom značajnošću u dva najviša dozna nivoa, MIX 4 i MIX 5. Nivoi Hg u tkivu mozga bili su značajno su povećani u MIX 1 i MIX 3 grupi, dok su nivoi As bili povećani u svim tretiranim grupama sa statističkom značajnošću u MIX 3 i MIX 5 grupi.

**Tabela 19.** Nivoi ispitivanih metala u mozgu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi metal(oid)a (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Pb</b>	Medijana	0,04043	0,05453	0,03476	0,05004	0,04798	0,07186 <sup>‡</sup>
	Opseg	(0,03633-0,069)	(0,02946-0,06544)	(0,03063-0,05034)	(0,04323-0,1044)	(0,04069-0,07171)	(0,05-0,1359)
<b>Cd</b>	Medijana	0,001804	0,001936	0,001946	0,005359	0,009224 <sup>†††</sup>	0,01662 <sup>†††††#</sup>
	Opseg	(0,001507-0,00309)	(0,001231-0,002316)	(0,001743-0,003832)	(0,003822-0,007108)	(0,007914-0,01097)	(0,01583-0,02425)

<b>Hg</b>	Medijana	0,01159	0,1523 <sup>*</sup>	0,03343	0,2550 <sup>**</sup>	0,01064 <sup>†††##</sup>	0,02260 <sup>#</sup>
	Opseg	(0,008048-0,01276)	(0,07212-0,2495)	(0,02313-0,2019)	(0,09033-0,3705)	(0,007729-0,01477)	(0,009483-0,04326)
<b>As</b>	Medijana	0,01250	0,01264	0,01536	0,02217 <sup>††</sup>	0,02090 <sup>†</sup>	0,04326 <sup>†††††</sup>
	Opseg	(0,01109-0,01692)	(0,008558-0,0146)	(0,008547-0,01919)	(0,01817-0,02457)	(0,01945-0,02199)	(0,03622-0,0484)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0,05, ††p < 0,01, †††p < 0,001 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0,05, ‡‡p < 0,01 (u poređenju sa MIX 2); #p < 0,05, ##p < 0,01 (u poređenju sa MIX 3).

## Srce

Nivoi ispitivanih metala u tkivu srca kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 20. Nisu uočene značajne razlike u nivoima Pb i As u poređenju sa vrednostima kontrole dok je nivo Cd bio značajno povećan u najvišoj doznoj grupi, MIX 5. Nivo Hg u tkivu srca bio je ispod limita kvantifikacije (LOQ: 0,00002 µg/mL) u svim grupama.

**Tabela 20.** Nivoi ispitivanih metala u srcu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi metal(oid)a (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Pb</b>	Medijana	0,3117	0,2867	0,4403	0,4229	0,3922	0,3430
	Opseg	(0,301-0,4734)	(0,2307-0,5214)	(0,4101-0,7866)	(0,3596-0,738)	(0,2538-0,4199)	(0,2581-0,7049)
<b>Cd</b>	Srednja vrednost	0,05087	0,02556	0,03224	0,06988	0,1109 <sup>††</sup>	0,1401 <sup>†††††</sup>
	SD	0,01787	0,02617	0,02075	0,08516	0,04060	0,04927
<b>As</b>	Srednja vrednost	0,09326	0,03899	0,2672 <sup>†</sup>	0,2886 <sup>†</sup>	0,05598 <sup>†##</sup>	0,2437 <sup>†ψ</sup>
	SD	0,1032	0,04803	0,1172	0,1913	0,03549	0,09621

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*\*p < 0,01 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0,05, ††p < 0,01 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0,05, ‡‡p < 0,01 (u poređenju sa MIX 2); ##p < 0,01 (u poređenju sa MIX 3); ψp < 0,05 (u poređenju sa MIX 4). Podebljane su vrednosti koje se značajno razlikuju od kontrolne grupe. Limit kvantifikacije (LOQ: 0,00002 µg/mL).

## Pluća

Nivoi ispitivanih metala u tkivu pluća kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 21. Nivo Pb bio je značajno smanjen u MIX 2 grupi u odnosu na kontrolnu grupu, dok su nivoi Cd i As bili značajno povećani u MIX 5 grupi u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe.

**Tabela 21.** Nivoi ispitivanih metala u plućima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi metal(oid)a (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Pb</b>	Medijana	0,1713	0,1692	0,1019 <sup>††</sup>	0,1185	0,1258	0,1813 <sup>††</sup>
	Opseg	(0,1525-0,1901)	(0,1367-0,2443)	(0,09829-0,1143)	(0,1034-0,221)	(0,1104-0,1534)	(0,16-0,287)
<b>Cd</b>	Medijana	0,06064	0,05361	0,01247	0,09900 <sup>‡</sup>	0,1197 <sup>††††</sup>	0,4364 <sup>††††</sup>
	Opseg	(0,03824-0,06795)	(0,02825-0,0558)	(0,004337-0,0357)	(0,0472-0,1256)	(0,1066-0,2033)	(0,3133-0,8617)
<b>Hg</b>	Medijana	0,04878	0,03999	0,1175	0,05942	0,005370 <sup>††††#</sup>	0,02920 <sup>††</sup>
	Opseg	(0,0365-0,05771)	(0,03502-0,118)	(0,09726-0,1676)	(0,03751-0,09478)	(0,002427-0,01616)	(0,006453-0,05041)
<b>As</b>	Medijana	0,1244	0,2583	0,1409	0,1886	0,1044	0,3379 <sup>††ψψ</sup>
	Opseg	(0,1024-0,2594)	(0,1533-0,4382)	(0,1081-0,1734)	(0,1644-0,2219)	(0,07194-0,2664)	(0,3107-0,5913)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0.05 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0.05, ††p < 0.01 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0.05, ††p < 0.01, †††p < 0.001 (u poređenju sa MIX 2); #p < 0.05 (u poređenju sa MIX 3); ψψp < 0.01 (u poređenju sa MIX 4).

## Pankreas

Nivoi ispitivanih metala u tkivu pankreasa kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 22. Nivo Pb nije se značajno razlikovao u tretiranim grupama u odnosu na kontrolnu grupu, dok je nivo Hg bio je ispod limita kvantifikacije u svim grupama. Nivo Cd bio je značajno povećan u MIX 5 grupi, a nivo As u MIX 3 grupi u poređenju sa vrednostima kontrole.

**Tabela 22.** Nivoi ispitivanih metala u pankreasu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi metal(oid)a (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Pb</b>	Srednja vrednost	0,4388	0,5443	0,5278	0,4981	0,5372	0,5296
	SD	0,1166	0,2336	0,1774	0,1155	0,2799	0,1931
<b>Cd</b>	Medijana	0,1414	0,02856	0,08659	0,2398 <sup>†</sup>	0,4716 <sup>††</sup>	0,9778 <sup>††††</sup>
	Opseg	(0,03078-0,2029)	(0,02623-0,03695)	(0,08474-0,1773)	(0,1341-0,3329)	(0,2284-0,7953)	(0,3123-2,497)
<b>As</b>	Medijana	0,01066	0,08193	0,1361	0,2631 <sup>†</sup>	0,01479 <sup>#</sup>	0,06210
	Opseg	(0,003703-0,1049)	(0,0409-0,2505)	(0,005198-0,242)	(0,2531-0,2731)	(0,01384-0,01574)	(0,03839-0,08581)

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg

(neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0.05 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0.05, ††p < 0.01, †††p < 0.001 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0.05 (u poređenju sa MIX 2); #p < 0.05 (u poređenju sa MIX 3). Limit kvantifikacije (LOQ: 0,00002 µg/mL).

## Slezina

Nivoi ispitivanih metala u tkivu slezine kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana bili su ispod nivoa detekcije, osim za As u MIX 4 (0,07636±0,02882 µg/g) i MIX 5 grupi (0,5759±0,2989 µg/g). Nivoi Pb, Cd, Hg i As bili su ispod limita kvantifikacije u svim grupama, osim nivoa As u dva najviša dozna nivoa, MIX 4 i MIX 5.

## Testisi

Nivoi ispitivanih metala u tkivu testisa kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 23. Nivo Cd bio je detektovan jedino u MIX 4 i MIX 5 grupi. Nivoi Pb, Hg i As bili su ispod limita kvantifikacije.

**Tabela 23.** Nivoi ispitivanih metala u testisima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi metal(oid)a (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
Cd	Srednja vrednost	NA	NA	NA	NA	0,04920	0,2221
	SD	NA	NA	NA	NA	0,02499	0,08609

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*\*p < 0.01 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0.05 (u poređenju sa MIX 1). NA- ispod limita kvantifikacije (LOQ: 0,00002 µg/mL).

## Femur

Nivoi ispitivanih metala u tkivu femura kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 24. Uočen je trend rasta nivoa Pb sa porastom doze smeše tretiranih metala, ali značajno povećani nivoi Pb u poređenju sa kontrolnom grupom uočeni su u MIX 4 i MIX 5 grupi. Nivoi Cd i As bili su značajno povećani u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Nivo Hg bio je ispod limita kvantifikacije u kontrolnoj grupi, dok je najviši nivo Hg izmeren u MIX 1 grupi.

**Tabela 24.** Nivoi ispitivanih metala u femuru pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi metal(oid)a (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
Pb	Medijana	0,1779	0,1838	0,2294	0,3330	0,5531 <sup>†††</sup>	1,420 <sup>††††††††#</sup>
	Opseg	(0,1736-0,2118)	(0,1576-0,3665)	(0,21-0,4237)	(0,2733-0,4486)	(0,4647-0,5629)	(1,289-2,219)
Cd	Medijana	0,08629	0,05787	0,02363	0,07713	0,1591 <sup>†††</sup>	0,2703 <sup>†††††††#</sup>

	Opseg	(0,04507-0,1014)	(0,04395-0,1248)	(0,01227-0,03276)	(0,04728-0,1082)	(0,1368-0,1856)	(0,2533-0,4226)
<b>Hg</b>	Medijana	NA	0,7621****	0,1694**	0,07074††	0,08133†	0,2140**
	Opseg	NA	(0,4272-2,353)	(0,125-0,263)	(0,03689-0,08064)	(0,04926-0,3018)	(0,07485-0,5794)
<b>As</b>	Medijana	0,03176	0,06129	0,1017	0,05767	0,06293	0,1222
	Opseg	(0,02845-0,09707)	(0,02017-0,2534)	(0,0606-0,1429)	(0,01395-0,1157)	(0,03146-0,08754)	(0,08868-0,1658)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*\* p < 0,0001 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0,05, ††p < 0,01, †††p < 0,001 (u poređenju sa MIX 1); ††p < 0,01, †††p < 0,001, ††††p < 0,0001 (u poređenju sa MIX 2); #p < 0,05, ##p < 0,01 (u poređenju sa MIX 3). NA- ispod limita kvantifikacije (LOQ: 0,00002 µg/mL).

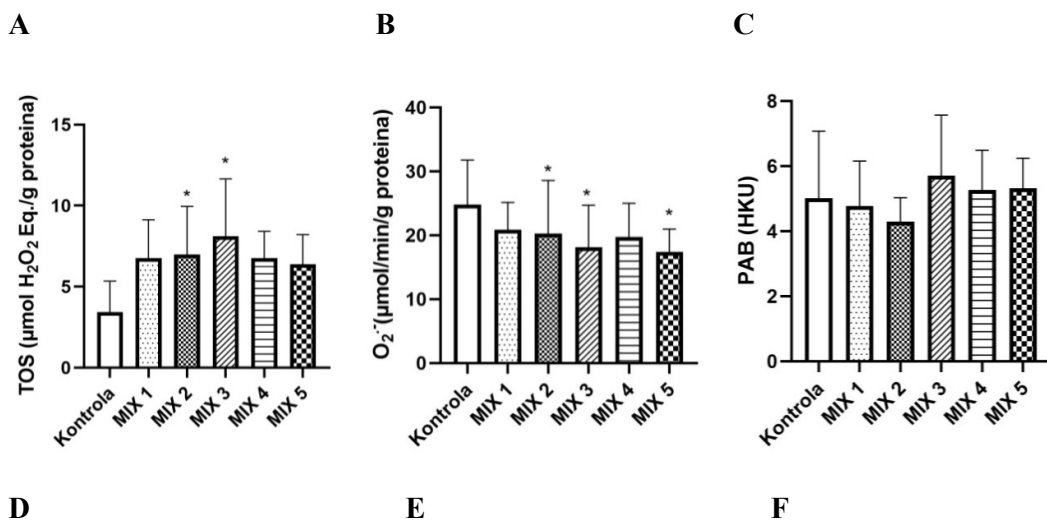
#### 4.1.1.11. Parametri redoks stausa u tkivima

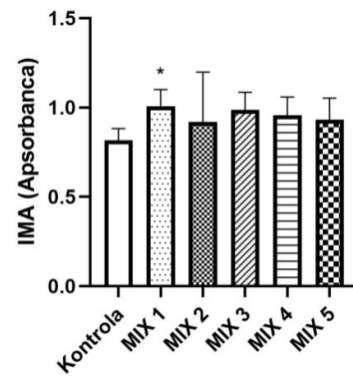
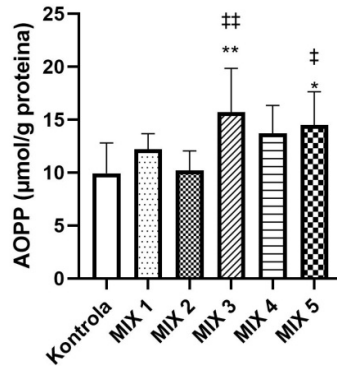
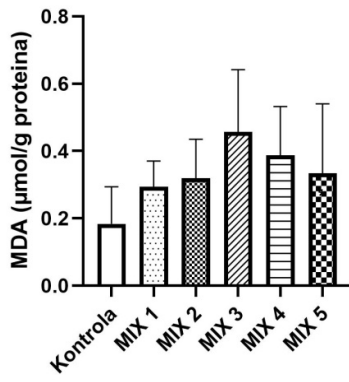
##### Jetra

Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva jetre kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su na Slici 7.

Značajno povećanje u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe uočeno je kod sledećih parametara TOS - u MIX 2 i MIX 3, AOPP - u MIX 3 i MIX 5, IMA - u MIX 1, SH grupe – MIX 1 i MIX 2. Značajno smanjenje u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe uočeno je za  $O_2^{\cdot-}$  - u MIX 2, MIX 3 i MIX 5 grupi, SOD - u MIX 2, MIX3 i MIX 4 grupi, GSH – MIX 2 i MIX 4 grupi i TAS – MIX 1 i MIX4 grupi.

Takođe, uočen je značajno različit indeks oksidativnog stresa u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe (Prilog 1 Tabela 3). Dodatno, uočeno je da skor antioksidativne zaštite bio značajno izmenjen u MIX 4 grupi u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, međutim značajne izmene u vrednostima OXY skora uočene su u MIX 3 i MIX 4 grupi (Prilog 1 Tabela 4).

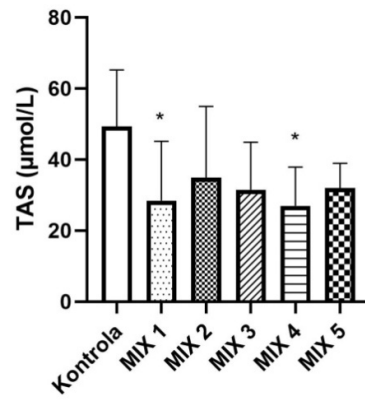
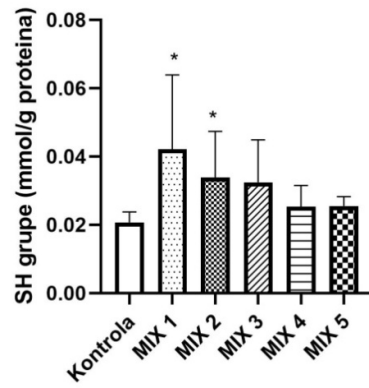
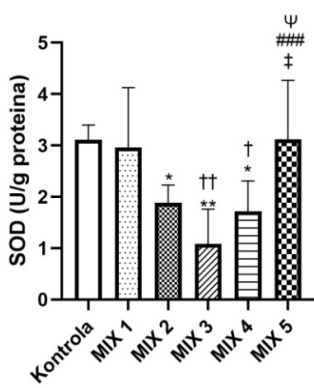




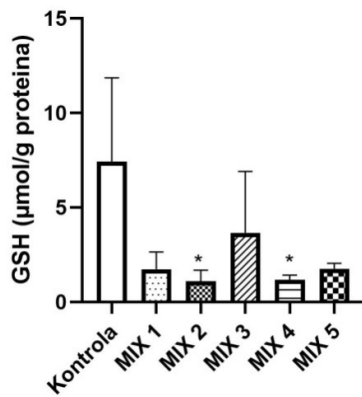
G

H

I



J



**Slika 7. Parametri redoks statusa u jetri kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). TOS: totalni oksidativni status,  $O_2^{\cdot-}$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijom modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, TAS: totalni antioksidativni status, GSH: glutation.. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0.05, ††p < 0.01 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0.05, ‡‡p < 0.01 (u poređenju sa MIX 2); ###p < 0.001 (u poređenju sa MIX 3); †††p < 0.05 (u poređenju sa MIX 4).

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i parametara redoks statusa u jetri potvrđena je dozna zavisnost za nivoe AOPP, MDA, TOS, ali za ove parametre nisu ispunjeni kriterijumi za potvrdu efekta. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 25. **Tabela 25.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene parametre redoks statusa u jetri kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
TOS	3,00E-09 - 6,75E-04	1,00E-08 - 2,25E-03	2,00E-10 - 4,50E-05	2,00E-09 - 4,50E-04
MDA	3,03E-09 - 7,65E-04	1,01E-08 - 2,55E-03	2,02E-10 - 5,10E-05	2,02E-09 - 5,10E-04
AOPP	1,26E-08 - 8,64E-02	4,19E-08 - 2,88E-01	8,38E-10 - 5,76E-03	8,38E-09 - 5,76E-02

MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza.

## Bubreg

Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva bubrega kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su na Slici 8.

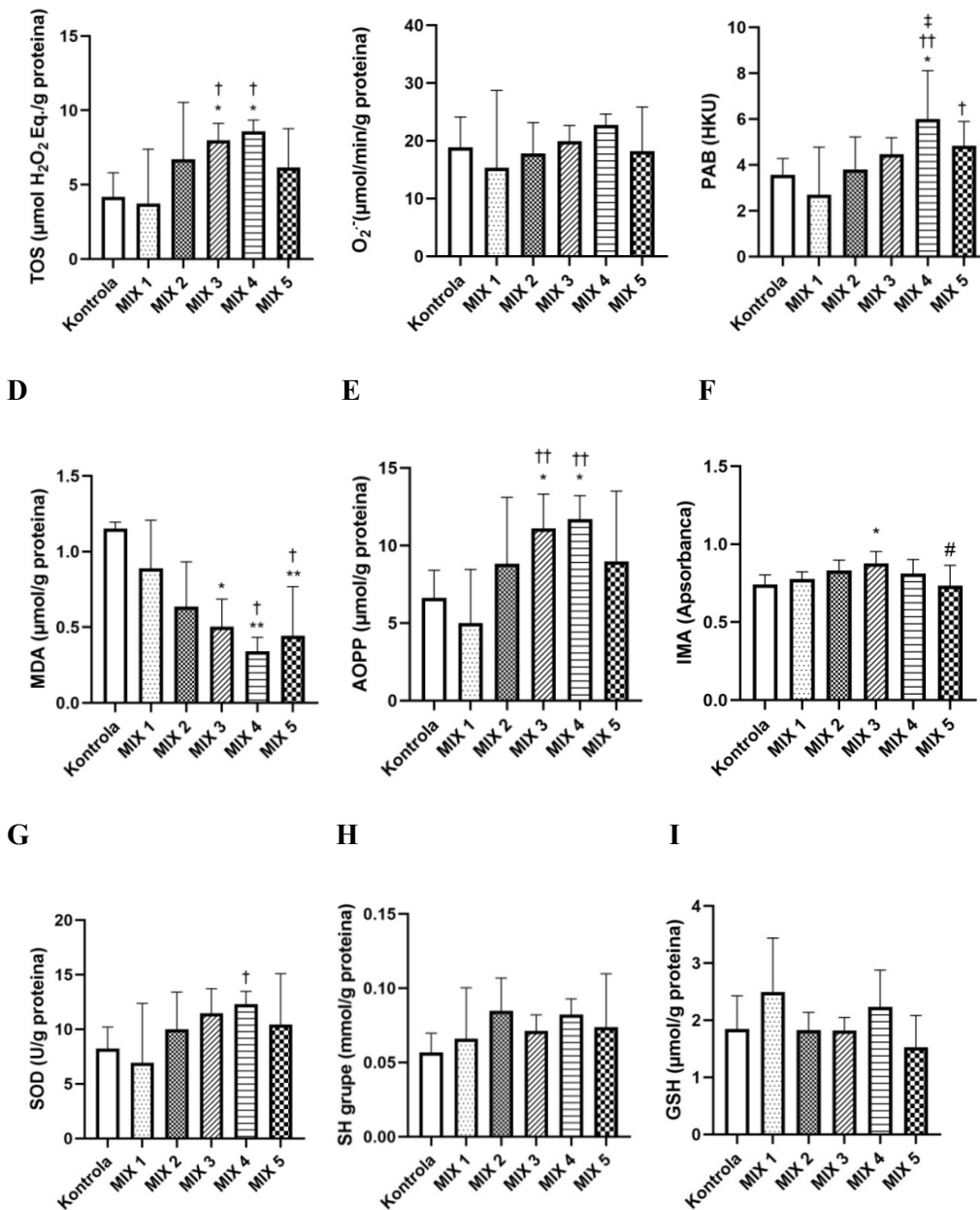
Značajno povećanje u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe uočeno je u slučaju TOS – u MIX 3 i MIX 4 grupi, PAB – u MIX 4 grupi, AOPP - u MIX 3 i MIX 4 grupi, IMA - u MIX 3 grupi. Interesantno, značajno smanjenje u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe uočeno je u slučaju MDA - u MIX 3, MIX 4 i MIX 5 grupi.

Skor oksidativne ravnoteže nije bio bio značajno izmenjen ni pri poređenju sa vrednostima kontrolne grupe ni pri poređenju tretiranih grupa (Prilog 1 Tabela 5).

**A**

**B**

**C**



**Slika 8. Parametri redoks statusa u bubregu kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). TOS: totalni oksidativni status,  $\text{O}_2^-$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijski modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, TAS: totalni antioksidativni status, GSH: glutation.. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (u poređenju sa kontrolom); † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  (u poređenju sa MIX 1); ‡ $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 2); # $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 3).

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i parametara redoks statusa u bubregu dobijena dozna zavisnost za nivoe AOPP, MDA, PAB, TOS, ali za ove parametre nisu ispunjeni kriterijumi za potvrdu efekta. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 26.

**Tabela 26.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene parametre redoks statusa u bubregu kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
TOS	1,31E-08 - 7,32E-03	4,35E-08 - 2,44E-02	8,70E-10 - 4,88E-04	8,70E-09 - 4,88E-03
PAB	4,77E-08 - 1,97E-02	1,59E-07 - 6,57E-02	3,18E-09 - 1,31E-03	3,18E-08 - 1,31E-02
MDA	4,17E-09 - 2,66E-03	1,39E-08 - 8,85E-03	2,78E-10 - 1,77E-04	2,78E-09 - 1,77E-03
AOPP	4,89E-09 - 4,05E-03	1,63E-08 - 1,35E-02	3,26E-10 - 2,70E-04	3,26E-09 - 2,70E-03

MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza.

### Mozak

Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva mozga kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su na Slici 9.

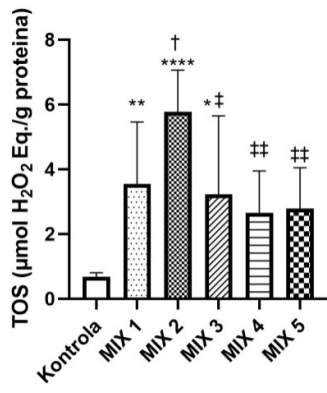
Značajno povećanje u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe uočeno je u nivou TOS - u MIX 1, MIX 2 i MIX 3 grupi. Uočeno je da su nivoi SOD,  $O_2^{\cdot -}$ , IMA i SH grupa značajno povećani u svim ispitivanim grupama u poređenje sa kontrolom. Sličan odgovor je zabeležen i u nivou PAB sa izuzetkom MIX 4 grupe čija je vrednost bila veća od kontrolne bez statističke značajnosti. Sa druge strane, u slučaju TAS, MIKS 4 je bio jedini nivo doze koji je pokazao značajno smanjen nivo u poređenju sa kontrolnom vrednošću nivoom kontrole. Evidentno smanjenje MDA zabeleženo je u višim nivoima sa značajnošću samo u MIX 3 grupi. Uočeno je i da je sa povećanjem primenjene doze smeše ispitivanih metala dobijeno i povećanje GSH u tretiranim grupama bez statističke značajnosti u poređenju sa kontrolom. Međutim, nivo GSH je bio značajno viši u grupi MIX 5 u poređenju sa grupom MIX 1. Nivo AOPP je bio povišen u svim tretiranim grupama, sa značajnošću u MIX 2, MIX 3 i MIX 5 u poređenju sa kontrolnom grupom. Mera ravnoteže između TOS i TAS u mozgu pacova izračunata je kao indeks oksidativnog stresa i pokazala je rastući trend nakon izlaganja MIX u poređenju sa kontrolom. Statistički značajne povećane vrednosti su uočene su u MIX 2 i MIX 4 grupi sa najviše izraženim promenama u MIX 4 grupi (Prilog 1 Tabela 6).

Uočeno je da su sve tretirane grupe imale značajno veće vrednosti skor oksidativnog oštećenja u poređenju sa kontrolnom grupom, dok su grupe tretirane višim doznim nivoima primenjene smeše metala (MIX 3, MIX 4 i MIX 5) pokazale značajno veće vrednosti skora antioksidativne zaštite u poređenju sa kontrolnom grupom. Niži nivoi antioksidantne zaštite i prekomerna proizvodnja prooksidanata rezultirali su značajno višim vrednostima skora oksidativne ravnoteže u MIX 1 i MIX 2. Iako nije bilo statističke značajnosti u poređenju sa kontrolnom grupom u višim nivoima doze primenjene mešavine metala (MIX 3, MIX 4 i MIX 5), primećen je trend rasta (Prilog 1 Tabela 7).

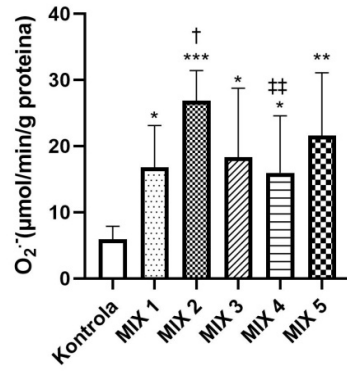
A

B

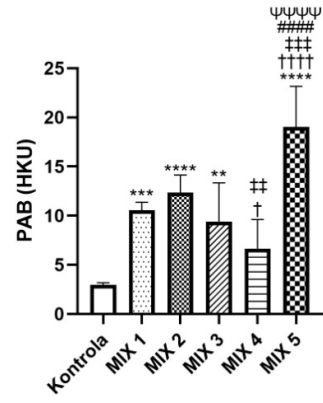
C



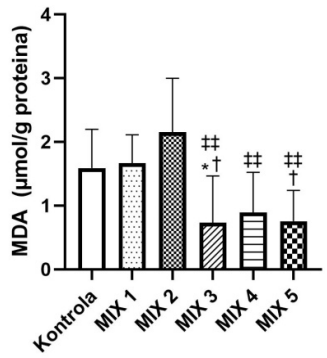
D



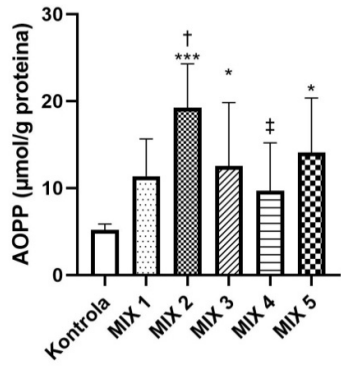
E



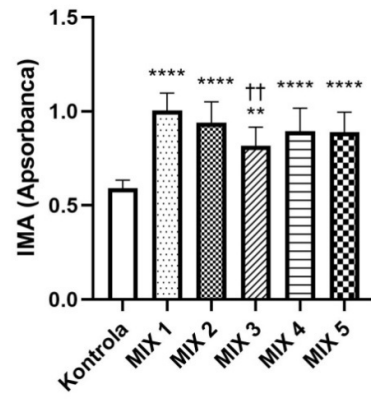
F



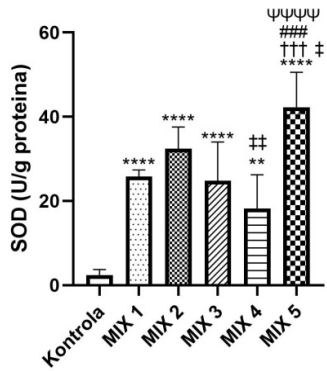
G



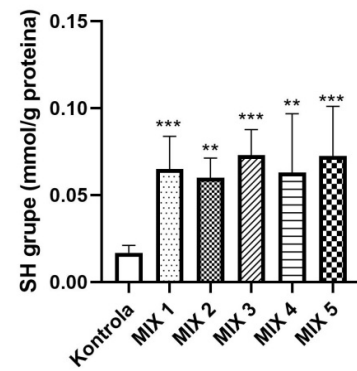
H

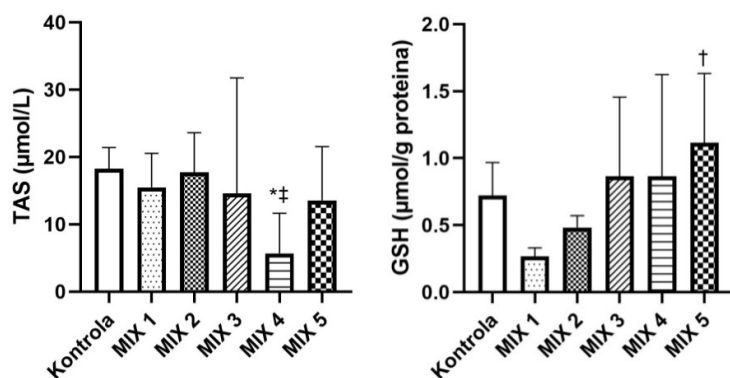


I



J





**Slika 9. Parametri redoks statusa izmerenim u homogenatima tkiva mozga kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). TOS: totalni oksidativni status, O<sub>2</sub><sup>-</sup>: superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijski modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, TAS: totalni antioksidativni status, GSH: glutation. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0.05, ††p < 0.01, †††p < 0.001, ††††p < 0.0001 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0.05, ‡‡p < 0.01, ‡‡‡p < 0.001 (u poređenju sa MIX 2); ###p < 0.001, ####p < 0.0001 (u poređenju sa MIX 3); †††††p < 0.0001 (u poređenju sa MIX 4).

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i parametara redoks statusa u mozgu dobijena je dozna zavisnost za nivoe AOPP, GSH, MDA, PAB i SOD, ali za ove parametre nisu ispunjeni kriterijumi za potvrdu efekta. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 27.

**Tabela 27.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene parametre redoks statusa u mozgu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
PAB	3,00E-09 - 1,84E-04	1,00E-08 - 6,13E-04	2,00E-10 - 1,23E-05	2,00E-09 - 1,23E-04
MDA	1,06E-07 - 1,33E-02	3,52E-07 - 4,44E-02	7,04E-09 - 8,88E-04	7,04E-08 - 8,88E-03
AOPP	3,03E-09 - 6,78E-04	1,01E-08 - 2,26E-03	2,02E-10 - 4,52E-05	2,02E-09 - 4,52E-04
SOD	3,09E-09 - 4,23E-05	1,03E-08 - 1,41E-04	2,06E-10 - 2,82E-06	2,06E-09 - 2,82E-05
GSH	3,45E-08 - 3,42E-01	1,15E-07 - 1,14E+00	2,30E-09 - 2,28E-02	2,30E-08 - 2,28E-01

MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza.

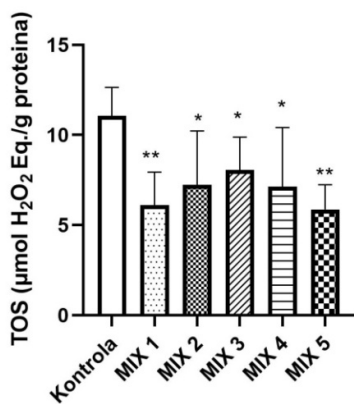
## Pluća

Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva pluća kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su na Slici 10.

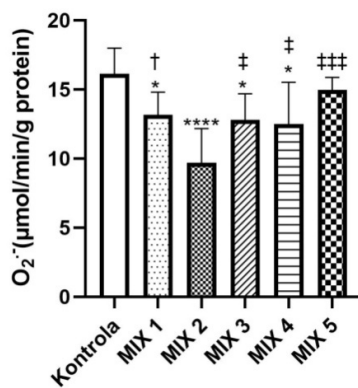
Značajno povećanje u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe uočeno je u slučaju IMA – MIX 1, MIX 2, MIX 4 i MIX 5 grupi i SH grupa – MIX 1, MIX 2, MIX 3, MIX 4 grupi. Interesantno, značajno smanjenje u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe uočeno je u svim tretiranim grupama u slučaju TOS, PAB i AOPP, dok je u slučaju  $O_2^-$  uočeno smanjenje u svim grupama osim MIX5 ili grupi koja je dobijala najveće ispitivane koncentracije olova, kadmijuma, arsena I žive MIX 1, MIX 2, MIX 3 i MIX 4 grupi, SOD u MIX 2, MIX 3 i MIX 4 grupi i GSH u MIX 1 i MIX 2 grupi.

Dodatno, uočene su značajne razlike u vrednostima OXY skora u MIX 2 i MIX 3 grupi u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe (Prilog 1 Tabela 8).

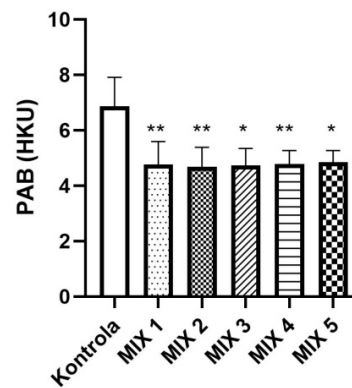
**A**



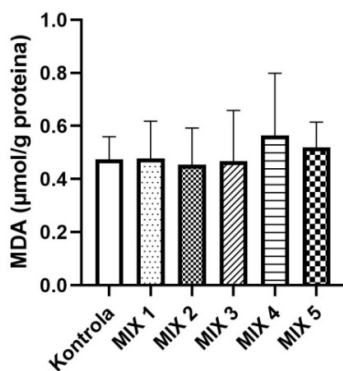
**B**



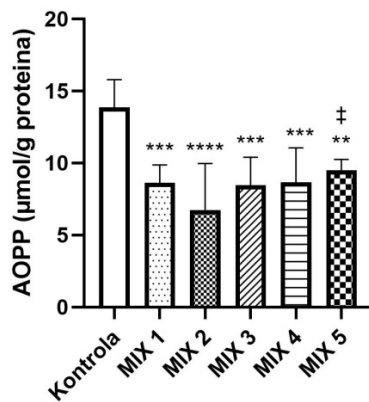
**C**



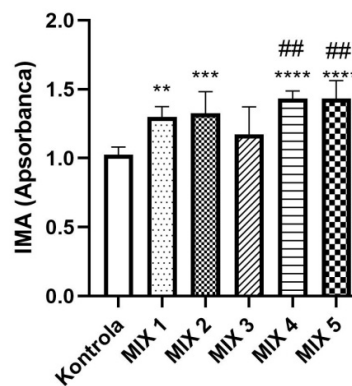
**D**



**E**



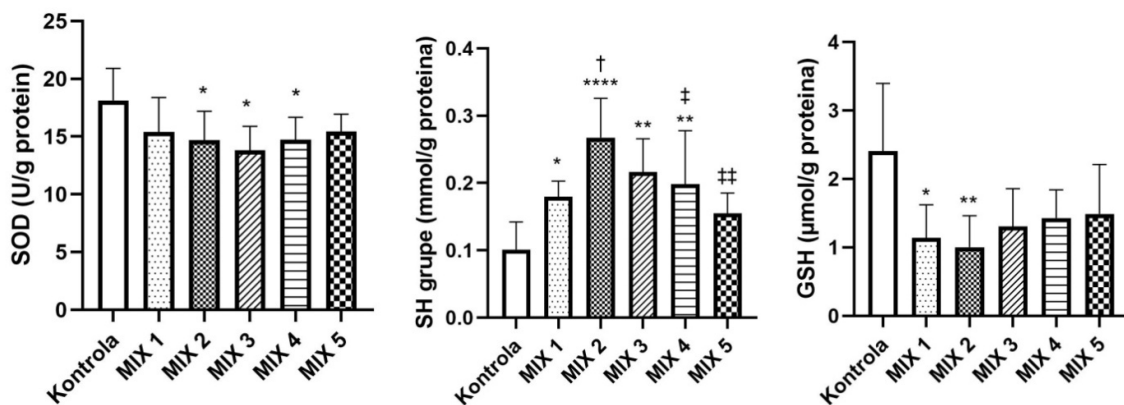
**F**



**G**

**H**

**I**



**Slika 10. Parametri redoks statusa izmerenim u homogenatima tkiva pluća kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). TOS: totalni oksidativni status,  $O_2^{\cdot-}$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijskom modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, GSH: glutation.\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0.05 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0.05, ††p < 0.01, †††p < 0.001 (u poređenju sa MIX 2); †††p < 0.01 (u poređenju sa MIX 3).

Modelovanjem eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i parametara redoks statusa u plućima dobijena je dozna zavisnost za nivo IMA, ali za ove parametre nisu ispunjeni kriterijumi za potvrdu efekta. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 28.

**Tabela 28.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene parametre redoks statusa u plućima kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
IMA	9,48E-09 - 2,23E-03	3,16E-08 - 7,42E-03	6,32E-10 - 1,48E-04	6,32E-09 - 1,48E-03

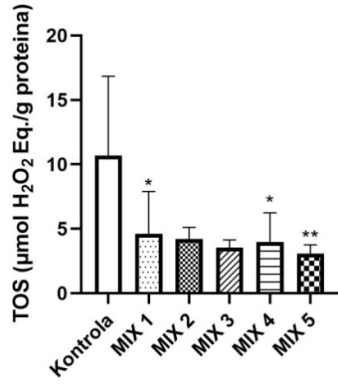
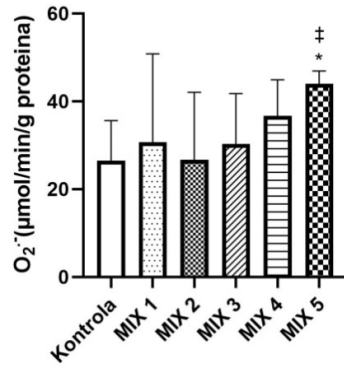
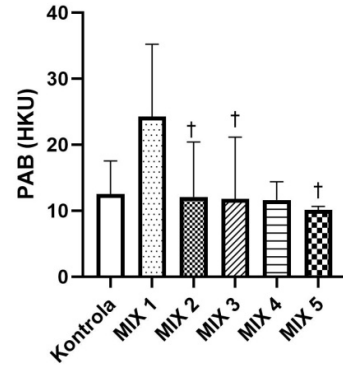
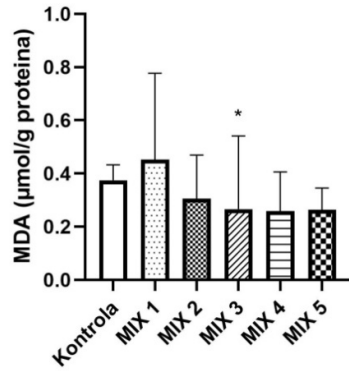
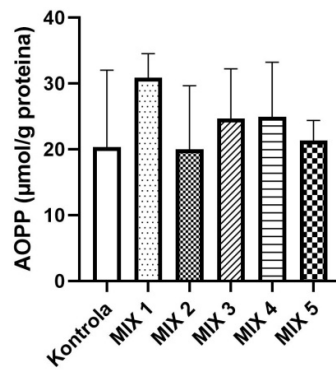
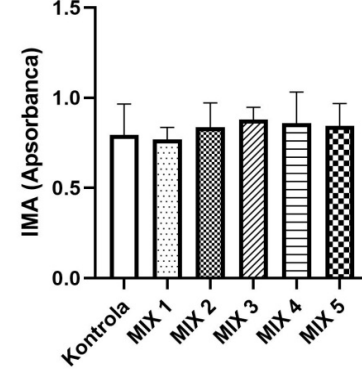
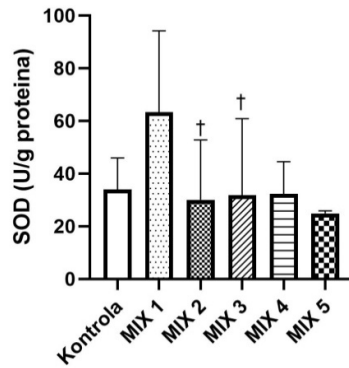
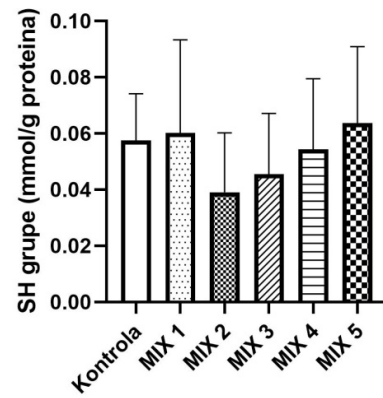
MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza.

## Pankreas

Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva pankreasa kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su na Slici 11.

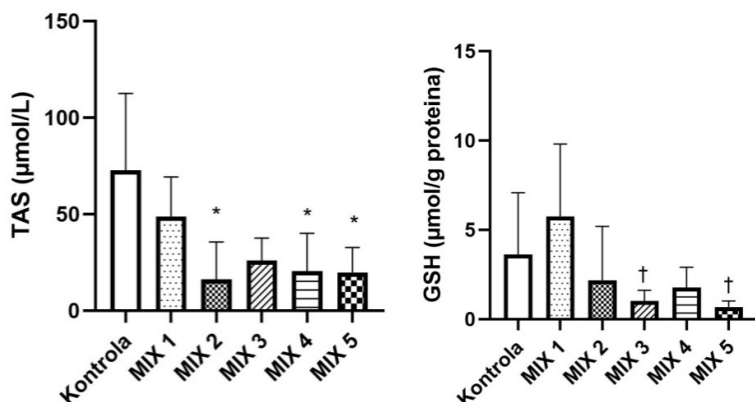
Značajno povećanje u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe uočeno je u slučaju  $O_2^{\cdot-}$  u MIX 5 grupi. Značajno smanjenje u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe uočeno je u slučaju TOS - MIX 1, MIX 4 i MIX 5 grupi, MDA - u MIX 3 grupi i TAS - u MIX 2, MIX 4 i MIX 5 grupi.

Nisu uočene značajne razlike u vrednostima indeksa oksidativnog stresa i skora oksidativne ravnoteže ni pri poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, ni pri poređenju tretiranih grupa (Prilog 1 Tabela 9 i Tabela 10).

**A****B****C****D****E****F****G****H**

I

J



**Slika 11. Parametri redoks statusa izmerenim u homogenatima tkiva pankreasa kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). TOS: totalni oksidativni status,  $O_2^{\cdot-}$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijski modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, TAS: totalni antioksidativni status, GSH: glutation.\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (u poređenju sa kontrolom); † $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 1); ‡ $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 2).

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i parametara redoks statusa u pankreasu dobijena je dozna zavisnost za nivoe  $O_2^{\cdot-}$ , TAS i TOS, ali za ove parametre nisu ispunjeni kriterijumi za potvrdu efekta. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 29. **Tabela 29.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene parametre oksidativnog statusa u pankreasu kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

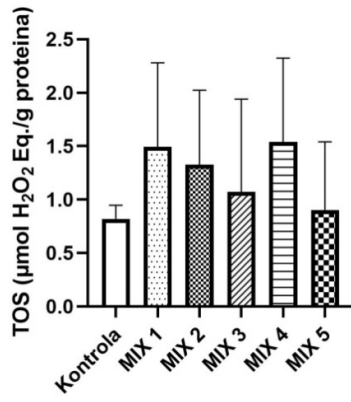
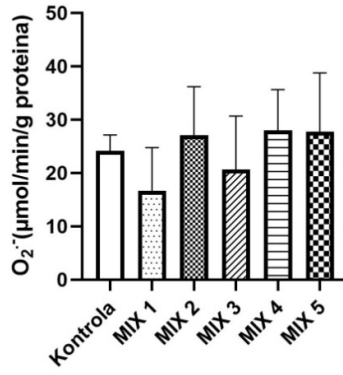
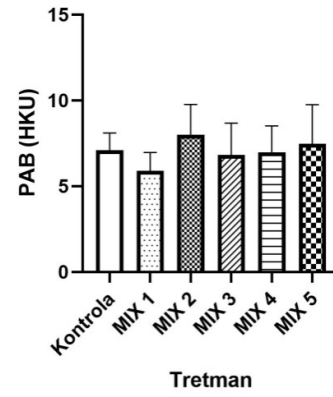
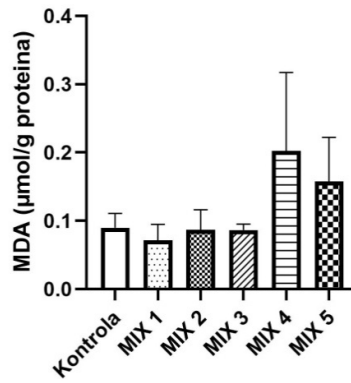
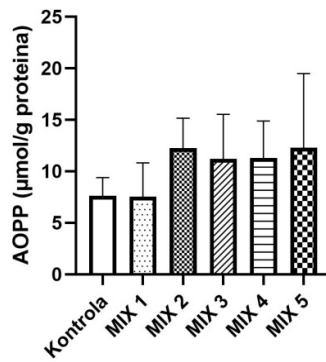
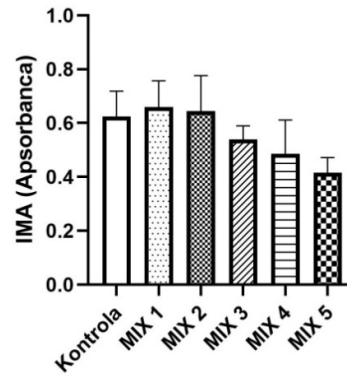
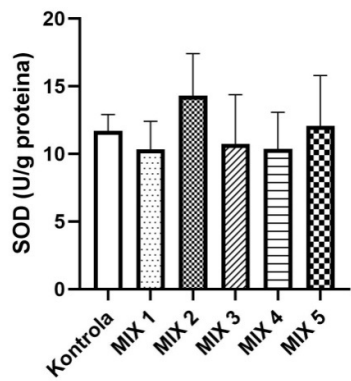
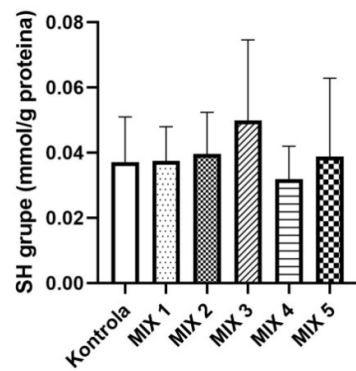
Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
TOS	3,06E-09 - 2,95E-03	1,02E-08 - 9,83E-03	2,04E-10 - 1,97E-04	2,04E-09 - 1,97E-03
$O_2^{\cdot-}$	6,69E-08 - 4,59E-01	2,23E-07 - 1,53E+00	4,46E-09 - 3,06E-02	4,46E-08 - 3,06E-01
TAS	3,81E-09 - 2,56E-03	1,27E-08 - 8,53E-03	2,54E-10 - 1,71E-04	2,54E-09 - 1,71E-03

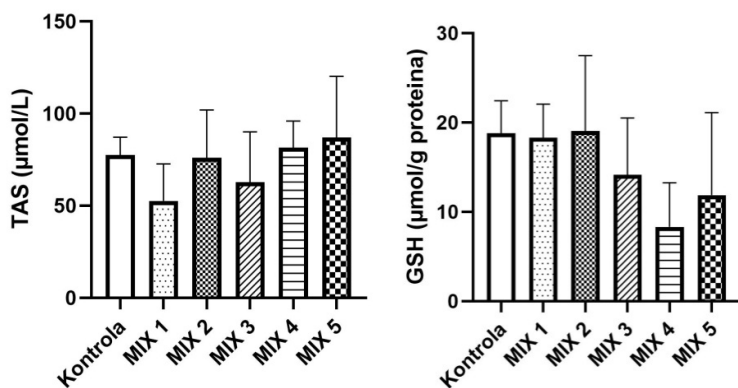
MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza.

### Testisi

Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva testisa kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su na Slici 12.

Nisu uočene značajne promene ni u jednom ispitanom parametru redoks statusa, niti u vrednostima indeksa oksidativnog stresa i skora oksidativne ravnoteže skora (Prilog 1 Tabela 11 i Tabela 12).

**A****B****C****D****E****F****G****H****I****J**



**Slika 12. Parametri redoks statusa izmerenim u homogenatima tkiva testisa kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX).**

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). TOS: totalni oksidativni status,  $O_2^{\cdot-}$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijom modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, TAS: totalni antioksidativni status, GSH: glutation.

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i parametara redoks statusa u testisima dobijena dozna zavisnost za nivo GSH, MDA i IMA, ali za ove parametre nisu ispunjeni kriterijumi za potvrdu efekta. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 30.

**Tabela 30. Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene parametre redoks statusa u testisima kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)**

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
MDA	4,02E-05 - 9,81E-02	1,34E-04 - 3,27E-01	2,68E-06 - 6,54E-03	2,68E-05 - 6,54E-02
IMA	6,51E-05 - 1,40E-01	2,17E-04 - 4,65E-01	4,34E-06 - 9,30E-03	4,34E-05 - 9,30E-02
GSH	5,58E-08 - 6,15E-02	1,86E-07 - 2,05E-01	3,72E-09 - 4,10E-03	3,72E-08 - 4,10E-02

MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza.

#### 4.1.1.12. Nivoi bioelemenata u tkivima

##### Jetra

Nivoi ispitivanih bioelemenata u tkivu jetre kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 31. Nivoi Cu i Mn nisu bili značajno različiti u poređenju sa kontrolom. Uočeno je da su nivoi Zn značajno povećani u MIX 5 grupi, dok su nivoi Fe značajno smanjeni u MIX 4 i MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolom.

**Tabela 31.** Nivoi ispitivanih bioeleminata u jetri pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi bioeleminata (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Cu</b>	Medijana	5,404	4,051	4,355	4,280	4,750	4,849
	Opseg	(3,678-7,601)	(3,229-5,651)	(3,368-4,826)	(3,734-4,839)	(4,329-5,087)	(4,009-5,559)
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	21,37	23,70	24,33	24,51	25,66 <sup>*</sup>	31,32 <sup>****#####ψψ</sup>
	SD	1,760	5,049	2,972	1,095	2,526	2,268
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	103,1	124,2	124,2	106,3	56,60 <sup>****#####</sup>	47,89 <sup>****#####</sup>
	SD	14,15	35,36	14,78	24,46	18,21	5,764
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	3,440	3,293	3,727	3,681	3,636	3,373
	SD	0,1991	0,5657	0,5174	0,6017	0,3832	0,3003

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (Neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001 (u poređenju sa kontrolom); †††p < 0,001, †††† p < 0,0001 (u poređenju sa MIX 1); ‡‡‡p < 0,001, ‡‡‡‡p < 0,0001 (u poređenju sa MIX 2); #p < 0,01, ####p < 0,001 (u poređenju sa MIX 3); ψψp < 0,01 (u poređenju sa MIX 4).

## Bubrezi

Nivoi ispitivanih bioeleminata u tkivu bubrega kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 32. Nivoi Cu bili su smanjeni u svim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom, ali značajno smanjenje bilo je evidentno u grupama tretiranim nižim doznim nivoima, MIX 1 i MIX 2 grupi. Nivoi Zn i Mn nisu se značajno razlikovali u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, dok je nivo Fe bio značajno smanjen u grupama tretiranim višim doznim nivoima, MIX 3, MIX 4 i MIX 5 grupi.

**Tabela 32.** Nivoi ispitivanih bioeleminata u bubregu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi bioeleminata (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	6,688	5,224 <sup>*</sup>	4,941 <sup>*</sup>	5,762	5,925	6,066
	SD	1,052	0,7668	1,030	1,040	1,442	0,7881
<b>Zn</b>	Medijana	14,97	13,81	14,32	13,49	15,13	15,30
	Opseg	(14,71-15,44)	(12,7-15,72)	(11,98-15,09)	(13,34-15,17)	(13,72-15,58)	(13,59-16,75)
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	71,28	81,64	70,33	59,20 <sup>†††</sup>	52,67 <sup>****††††</sup>	48,74 <sup>****††††</sup>

	SD	12,73	8,975	11,17	4,016	7,590	6,831
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	1,059	0,9962	1,019	1,001	1,038	1,031
	SD	0,04186	0,1038	0,1933	0,09978	0,1366	0,1335

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (u poređenju sa kontrolom); †††p < 0,001, ††††p < 0,0001 (u poređenju sa MIX 1); ††p < 0,01, †††p < 0,001 (u poređenju sa MIX 2).

## Mozak

Nivoi ispitivanih bioelemenata u tkivu mozga kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 33. Uočeno je da su nivoi Cu i Mn smanjeni u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe. Nivo Fe je takođe bio smanjen u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, osim u MIX 3 grupi gde su vrednosti Fe bile povećane. Nivoi Zn nisu bili značajni različiti u tretiranim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom.

**Tabela 33.** Nivoi ispitivanih bioelemenata u mozgu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi bioelemenata (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	2,920	2,362**	2,384**	2,616	2,519*	2,287***
	SD	0,2003	0,2066	0,2207	0,1578	0,2143	0,4433
<b>Zn</b>	Medijana	11,52	11,11	11,59	11,04	10,90	11,14
	Opseg	(11,13-11,57)	(10,54-11,79)	(10,58-12,18)	(10,64-11,78)	(10,33-12,18)	(9,183-12,09)
<b>Fe</b>	Medijana	22,50	18,21*	19,44	33,55†	16,78***##	17,75*#
	Opseg	(20,23-26,99)	(16,87-20,14)	(16,8-21,34)	(19,22-56,07)	(16,07-18,46)	(15,2-20,01)
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	0,6311	0,5301**	0,5645	0,6033†	0,5531*	0,4991***##
	SD	0,02332	0,03377	0,06635	0,06401	0,02037	0,08032

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0,05 (u poređenju sa MIX 1); #p < 0,05, ##p < 0,01 (u poređenju sa MIX 3).

## Srce

Nivoi ispitivanih bioelemenata u tkivu srca kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 34. Nisu uočene značajne razlike u nivoima Cu i Zn u poređenju sa vrednostima kontrole, dok su nivoi Fe i Mn bili smanjeni u svim

tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrole, sa statističkom značajnošću uočenom u MIX 4 grupi u slučaju Fe, i MIX 4 i MIX 5 u slučaju Mn.

**Tabela 34.** Nivoi ispitivanih bioeleminata u srcu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi bioeleminata (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Cu</b>	Medijana	6,073	5,394	5,584	5,854	5,942	5,719
	Opseg	(5,457-6,408)	(4,952-6,185)	(3,798-5,675)	(3,716-6,208)	(5,091-6,853)	(4,457-7,709)
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	26,75	26,05	23,28	27,52	25,10	24,23
	SD	2,508	4,017	5,808	3,328	4,329	4,789
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	70,29	63,54	56,54	62,02	52,83*	55,92
	SD	6,994	14,37	17,29	6,360	7,640	12,57
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	0,4107	0,3568	0,3224	0,3293	0,2743*	0,2712*
	SD	0,05833	0,04675	0,06497	0,02102	0,09577	0,1815

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal-Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0.05 (u poređenju sa kontrolom).

## Pluća

Nivoi ispitivanih bioeleminata u tkivu pluća kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 35. Uočeno je smanjenje nivoa Cu u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrole. Nivo Zn bio je značajno smanjen u MIX 2 grupi, dok je nivo gvožđa bio smanjen u svim tretiranim grupama sa najizraženijim efektom u MIX 5 grupi. Nivo Mn bio je značajno smanjen u MIX 2, MIX3 i MIX 4 grupi.

**Tabela 35.** Nivoi ispitivanih bioeleminata u plućima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi bioeleminata (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Cu</b>	Medijana	1,760	1,545	0,7997 <sup>††</sup>	0,7723 <sup>†††</sup>	0,8985 <sup>†</sup>	0,9501
	Opseg	(1,467-2,092)	(1,473-1,671)	(0,7306-1,008)	(0,658-0,9508)	(0,7127-0,9105)	(0,7593-1,225)
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	24,24	23,84	19,32 <sup>†††</sup>	21,98	22,77 <sup>†</sup>	22,20
	SD	1,621	3,791	2,407	1,961	3,695	1,557
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	115,3	90,64	118,3	108,7	95,57	72,08 <sup>†</sup>

	SD	28,03	23,24	44,84	26,46	34,09	28,52
<b>Mn</b>	Medijana	0,2660	0,2841	0,1851 <sup>††</sup>	0,1695 <sup>††</sup>	0,1989 <sup>†</sup>	0,2340
	Opseg	(0,238-0,4381)	(0,2443-0,312)	(0,1421-0,2051)	(0,1432-0,2052)	(0,1384-0,2407)	(0,1479-0,2623)

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (u poređenju sa kontrolom); <sup>†</sup> $p < 0,05$ , <sup>††</sup> $p < 0,01$  (u poređenju sa MIX 1); <sup>‡</sup> $p < 0,05$  (u poređenju sa MIX 2).

## Pankreas

Nivoi ispitivanih bioelemenata u tkivu pankreasa kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 36. Nivoi Cu, Zn i Mn nisu se značajno razlikovali u tretiranim grupama u odnosu na kontrolnu grupu, dok je nivo Fe bio značajno smanjen u poređenju sa vrednostima kontrole u dva najviša dozna nivoa, u MIX 4 i MIX 5 grupi.

**Tabela 36.** Nivoi ispitivanih bioelemenata u pankreasu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi bioelemenata( $\mu\text{g/g}$ )		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Cu</b>	Medijana	1,020	0,3707	0,4078	0,3553	0,5101	0,5713
	Opseg	(0,4368-2,108)	(0,2133-0,7672)	(0,4051-0,8892)	(0,2061-0,6036)	(0,3791-0,647)	(0,5152-0,6275)
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	24,99	29,68	31,02	27,15	21,93	18,07
	SD	4,392	10,79	11,85	10,29	8,575	12,49
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	19,47	18,77	19,40	13,30	10,54 <sup>*††</sup>	7,736 <sup>**†††</sup>
	SD	2,694	4,488	8,893	6,268	5,286	4,266
<b>Mn</b>	Medijana	1,318	1,392	1,493	1,585	0,9578	0,4031
	Opseg	(1,034-1,693)	(0,7078-1,804)	(0,5943-1,876)	(0,9477-1,981)	(0,6038-1,73)	(0,04339-1,739)

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (u poređenju sa kontrolom); <sup>†</sup> $p < 0,05$ , <sup>††</sup> $p < 0,01$  (u poređenju sa MIX 1); <sup>‡</sup> $p < 0,05$ , <sup>†††</sup> $p < 0,01$  (u poređenju sa MIX 2).

## Slezina

Nivoi ispitivanih bioelemenata u tkivu slezine kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 37. Nisu uočene značajne razlike u nivoima Cu, Zn i Fe u poređenju sa vrednostima kontrole dok je nivo Mn bio ispod nivoa kvantifikacije u svim grupama.

**Tabela 37.** Nivoi ispitivanih bioelemenata u slezini pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi bioelemenata (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	0,5606	0,5485	0,5372	0,6695	0,4542	0,3960
	SD	0,1403	0,1805	0,2458	0,1855	0,2517	0,1791
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	18,90	19,14	19,40	18,95	18,21	19,37
	SD	2,719	2,479	2,524	1,275	1,178	4,600
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	190,9	151,6	167,4	155,9	145,9	142,8
	SD	43,37	9,809	15,21	60,38	19,67	42,17

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).

## Testisi

Nivoi ispitivanih bioelemenata u tkivu testisa kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 38. U poređenju sa kontrolnom grupom, nivoi Cu i Zn nisu bili značajno izmenjeni u tretiranim grupama, dok je nivo Fe bio značajno smanjen u MIX 4 i MIX 5 grupi. Nivo Mn detektovan je jedino u kontrolnoj grupi (0,1204 ± 0,05660 µg/g), dok su sve tretirane grupe imale nivoe Mn koji su bili ispod limita kvantifikacije.

**Tabela 38.** Nivoi ispitivanih bioelemenata u testisima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi bioelemenata (µg/g)		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Cu</b>	Medijana	1,898	1,911	1,854	1,888	1,866	2,110
	Opseg	(1,478-2,549)	(1,76-1,928)	(1,776-2,299)	(1,796-1,965)	(1,764-1,993)	(1,819-3,457)
<b>Zn</b>	Medijana	36,26	33,33	34,60	31,53	33,88	35,40
	Opseg	(27,03-41,97)	(32,32-34,79)	(31,92-37,9)	(30,39-35,46)	(31,11-35,4)	(31,44-40,45)
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	21,26	16,35	17,83	14,53	7,001 <sup>**†‡</sup>	7,592 <sup>**†</sup>
	SD	8,793	4,253	4,988	8,108	4,907	1,770

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). <sup>\*\*</sup>p < 0.01 (u poređenju sa kontrolom); <sup>†</sup>p < 0.05 (u poređenju sa MIX 1); <sup>‡</sup>p < 0.05, <sup>††</sup>p < 0.01 (u poređenju sa MIX 2). Limita kvantifikacij (LOQ: 0,00002 µg/mL).

## Femur

Nivoi ispitivanih bioelemenata u tkivu femura kod eksperimentalnih životinja izloženih rastućim dozama smeše metala tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 39. Nivoi Cu bili su povećani u MIX 1

grupi, dok su nivoi Fe bili smanjeni u MIX 4 i MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Iako su bili blago smanjeni, nivoi Zn i Mn nisu se značajno razlikovali u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe.

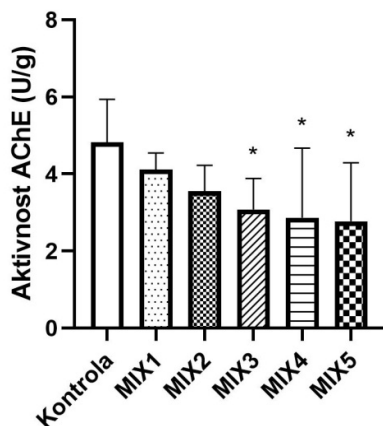
**Tabela 39.** Nivoi ispitivanih bioeleminata u femuru pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Nivoi bioeleminata( $\mu\text{g/g}$ )		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	0,7124	0,8950**	0,8161	0,8343	0,6608 <sup>††#</sup>	0,7466 <sup>†</sup>
	SD	0,05256	0,1432	0,09452	0,02954	0,1565	0,06722
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	101,1	114,6	119,1	116,6	89,30 <sup>††#</sup>	87,46 <sup>††#</sup>
	SD	5,484	33,07	11,89	8,494	19,27	2,282
<b>Fe</b>	Medijana	28,62	34,66	37,52	28,36	20,34 <sup>††††#</sup>	20,95 <sup>††††#</sup>
	Opseg	(25,32-51,69)	(26,8-37,47)	(30,22-40,57)	(25,4-31,19)	(13,22-22,26)	(18,75-21,92)
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	0,4113	0,4504	0,4203	0,4081	0,3156 <sup>†</sup>	0,3030 <sup>†</sup>
	SD	0,04162	0,1623	0,08313	0,04762	0,1071	0,03210

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*\*p < 0.01 (u poređenju sa kontrolom); <sup>†</sup>p < 0.05, <sup>††</sup>p < 0.01 (u poređenju sa MIX 1); <sup>‡</sup>p < 0.05, <sup>‡‡</sup>p < 0.01, <sup>‡‡‡</sup>p < 0.001 (u poređenju sa MIX 2); #p < 0.05 (u poređenju sa MIX 3).

#### 4.1.1.13. Aktivnost acetilholin esteraze

Uočeno je da su veće doze primenjene smeše metal(oid)a značajno smanjile aktivnost enzima AChE u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 13).



**Slika 13.** Aktivnost enzima acetilholinesteraze u mozgu kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike

(engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). AChE: acetilholinesteraza.\*p < 0.05 (u poređenju sa kontrolom).

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i aktivnosti enzima acetilholinesteraze u mozgu pacova, dobijena je dozna zavisnost, ali za ovaj parametar nisu ispunjeni kriterijumi za potvrdu efekta. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 40. **Tabela 40.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerenu aktivnost enzima acetilholinesteraze (AChE) u mozgu kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
Aktivnost AChE	5,76E-09 - 7,83E-02	1,92E-08 - 2,61E-01	3,84E-10 - 5,22E-03	3,84E-09 - 5,22E-02

MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza.

#### 4.1.1.14. Promena strukture očuvanosti tkiva

##### Jetra

Mikroskopskom analizom tkiva jetre uočena je laka hiperemija, laka kariomegalija pojedinih hepatocita i eozinofilna granularnost citoplazme pojedinih hepatocita u kontrolnoj grupi, bez značajnijih morfoloških promena.

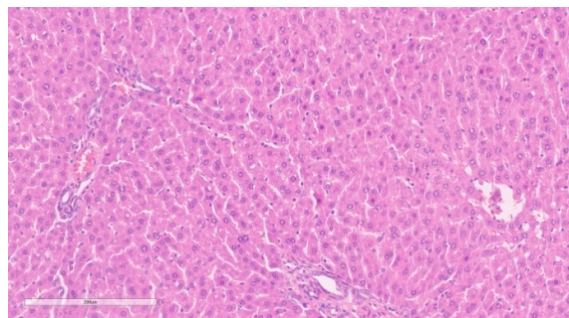
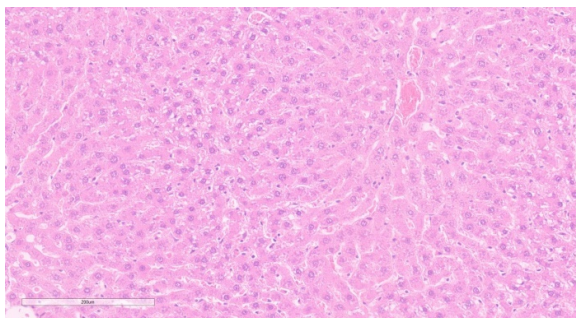
U poređenju sa kontrolnom grupom u MIX 1 grupi uočeni su i pojedini binuklearni hepatociti, degeneracija pojedinih hepatocita, kao i lakostepena sitnokapljičasta masna promena hepatocita, dok je u MIX 2 grupi uočena i degeneracija pojedinih hepatocita.

Kod MIX 3 grupe uočeni su i pojedini binuklearni hepatociti, degeneracija pojedinih hepatocita, sitnokapljičasta masna promena hepatocita umerenog stepena, kao i sitni fokusi mononuklearnih inflamatornih ćelija. U MIX 4 grupi uočeni su i pojedini binuklearni hepatociti, degeneracija pojedinih hepatocita, dok je kariomegalija uočena u većem broju hepatocita. Najizraženije promene primećene su u MIX 5 grupi, gde su, pored binuklearnih hepatocita i nekroze pojedinačnih ćelija, zabeležene umerene sitnokapljičaste masne promene i sitni fokusi mononuklearnih inflamatornih ćelija.

Preseci tkiva jetre prikazani su na Slici 14.

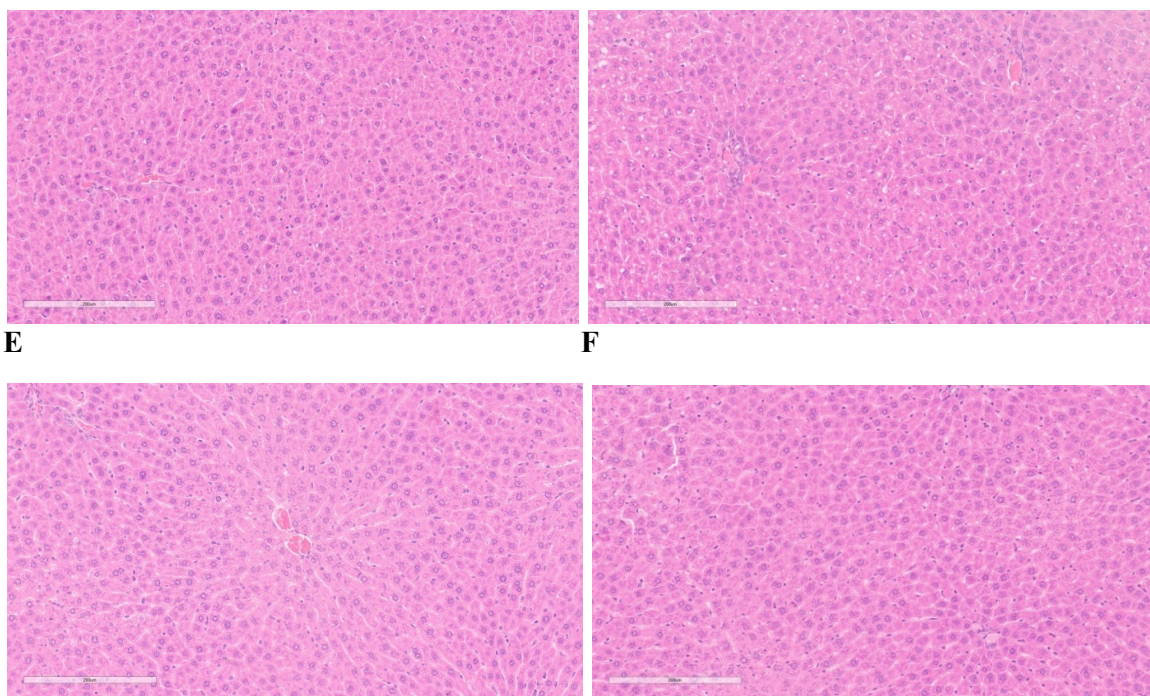
A

B



C

D



**Slika 14. Histološki prikaz jetre u (A) kontrolnoj, (B) MIX 1, (C) MIX 2, (D) MIX 3, (E) MIX 4, (F) MIX 5 grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).**

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i histopatoloških promena u jetri, dobijena je dozna zavisnost za degeneraciju hepatocita i nekrozu, fokalnu infiltraciju mononuklearnim ćelijama. Kriterijume za potvrdu efekta ispunjava rezultat modelovanja odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i fokalne infiltracije jetre mononuklearnim ćelijama. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 41, dok je grafički prikaz potvrđenog efekta u Prilogu 1 (Slika 5).

**Tabela 41. Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene histopatološke promene u jetri kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)**

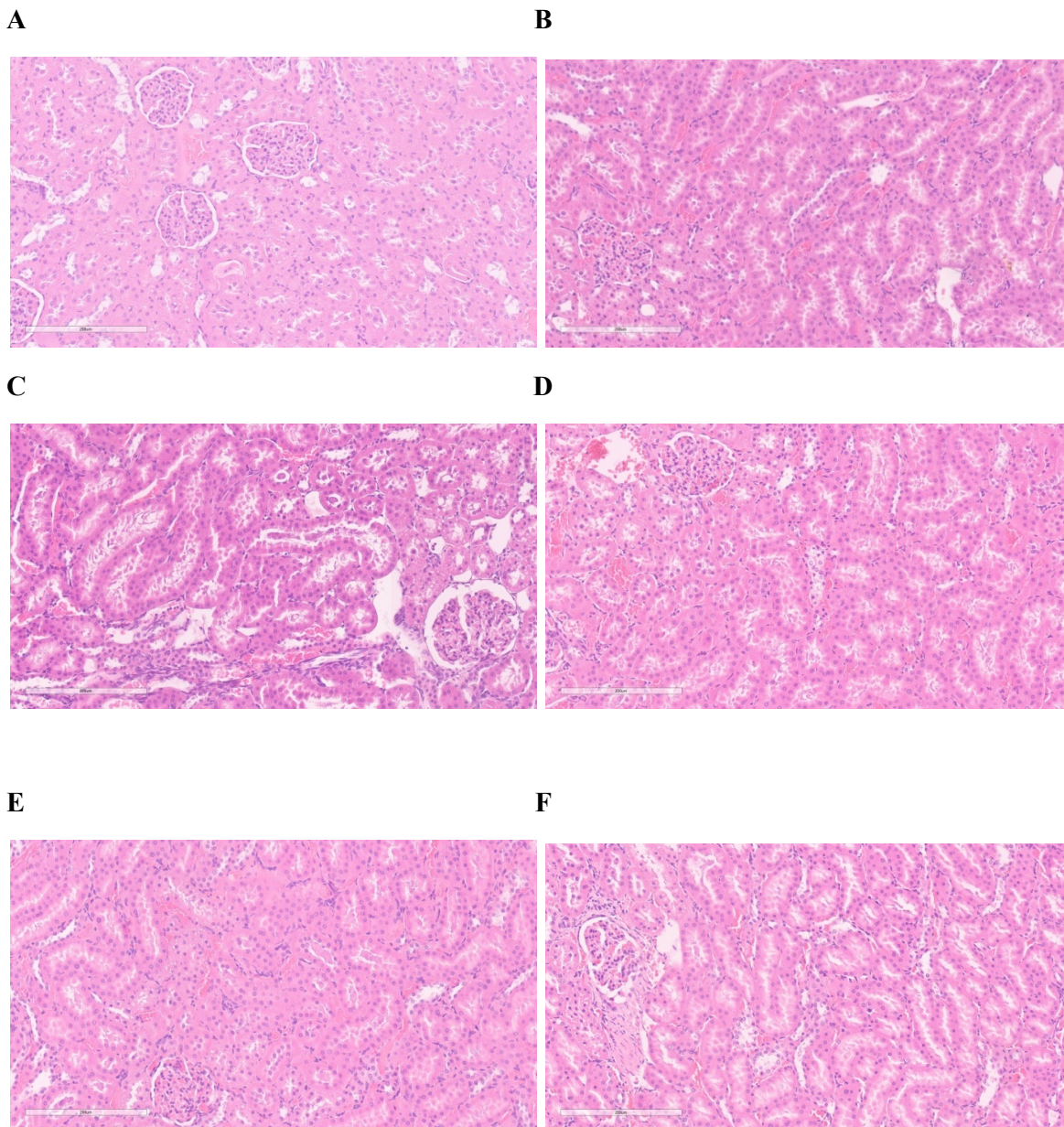
Parametar (BMDL BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
Degeneracija hepatocita nekroza	1,58E-05 - 2,12E-01	5,25E-05 - 7,06E-01	1,05E-06 - 1,41E-02	1,05E-05 - 1,41E-01
<b>Fokalna infiltracija mononuklearnim ćelijama</b>	<b>6,03E-02 - 6,00E-01</b>	<b>2,01E-01 - 2,00E+00</b>	<b>4,02E-03 - 4,00E-02</b>	<b>4,02E-02 - 4,00E-01</b>

MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza. Podebljano označene vrednosti su intervali doza-odgovor koji ispunjavaju kriterijume za prihvatanje (BMDU/BMDL < 50, BMD/BMDL < 20, da izračunata BMD nije 10 puta niža od najniže doze primenjene u studiji).

## Bubrezi

Mikroskopskom analizom tkiva bubrega uočena je laka hiperemija i utvrđeno je da kontrolna grupa nije imala značajnih morfoloških promena. U MIX 1 i MIX 2 grupi uočena je izraženija hiperemija, degeneracija većeg broja tubulocita, lakostepena dilatacija pojedinih kanalića i diskretni fokusi infiltrata od mononuklearnih inflamatornih ćelija. U grupama tretiranim višim doznim nivoima (MIX 3, MIX 4 i MIX 5 grupa) osim navedenih promena koje su se javile i u MIX 1 i MIX 2 grupi, uočena je izraženija dilatacija većeg broja kanalića uz pojavu hijalinih cilindara u lumenima, kao i fokusi infiltrata od mononuklearnih inflamatornih ćelija.

Preseci tkiva bubrega prikazani su na Slici 15.



**Slika 15. Histološki prikaz bubrega u (A) kontrolnoj, (B) MIX 1, (C) MIX 2, (D) MIX 3, (E) MIX 4, (F) MIX 5 grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; od**

najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i histopatoloških promena u bubregu, dobijena je dozna zavisnost za formiranje hijalina, kariomegaliju i tubularnu degeneraciju i nekrozu, ali za ove parametre nisu ispunjeni kriterijumi za potvrdu efekta. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 42.

**Tabela 42.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene histopatološke promene u bubregu kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
Formiranje hijalina	3,00E-09 - 5,13E-03	1,00E-08 - 1,71E-02	2,00E-10 - 3,42E-04	2,00E-09 - 3,42E-03
Kariomegalija	1,16E-08 - 4,83E-01	3,87E-08 - 1,61E+00	7,74E-10 - 3,22E-02	7,74E-09 - 3,22E-01
Tubularna degeneracija i nekroza	3,00E-09 - 1,64E-04	1,00E-08 - 5,45E-04	2,00E-10 - 1,09E-05	2,00E-09 - 1,09E-04

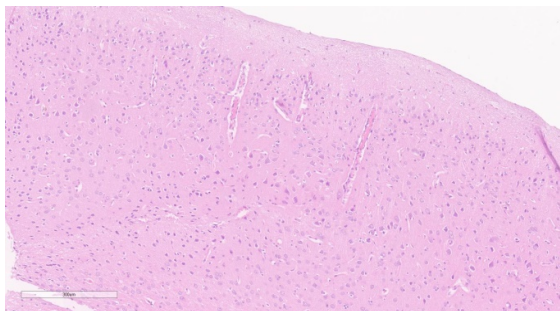
MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza.

## Mozak

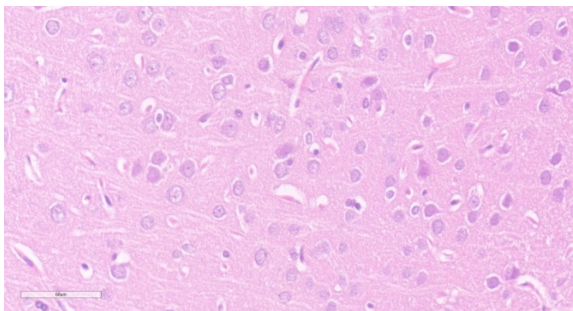
Histopatološkom analizom utvrđeno je da su, u poređenju sa kontrolnom grupom, u kojoj je uočena blaga hiperemija, edem i degeneracija pojedinih neurona, promene u vidu satelitoze, degeneracije neurona i fokalne glioze bile najizraženije u MIX 2 grupi. Edem i hiperemija su bili najizraženiji u MIX 5 grupi, dok su vazokongestija i krvarenje bili najizraženiji u MIX 3 grupi.

Preseci tkiva mozga prikazani su na Slici 16.

A

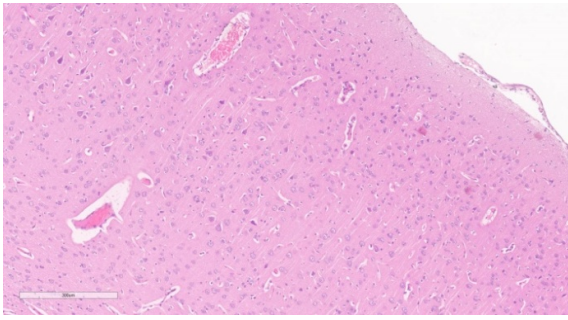


B

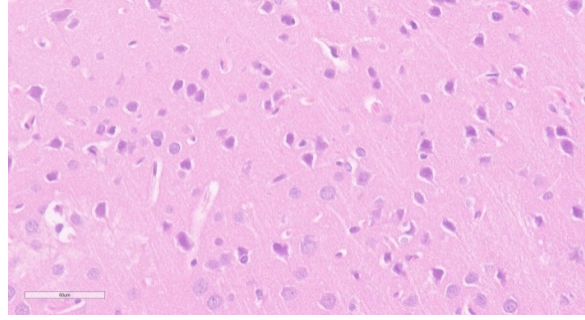


C

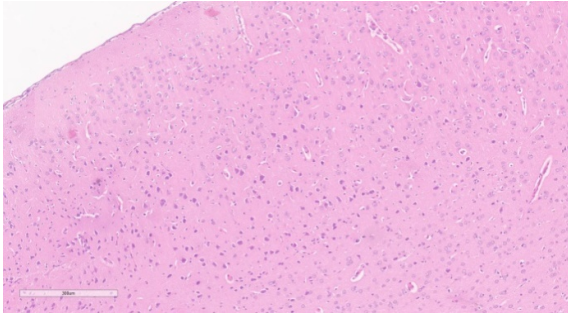
D



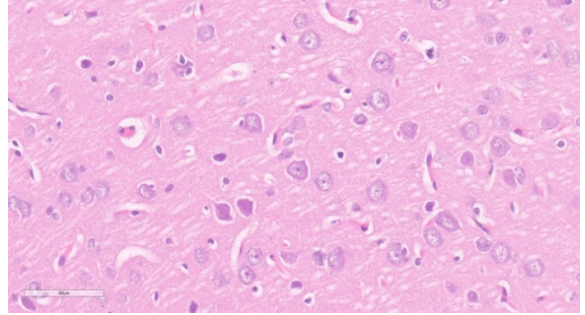
**E**



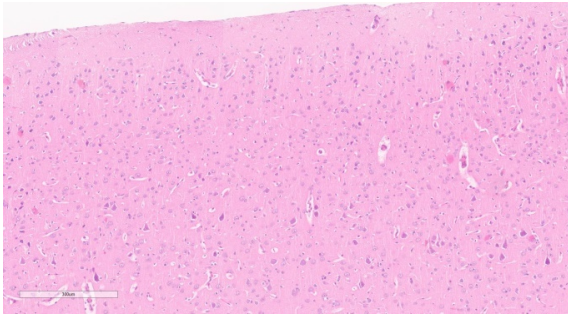
**F**



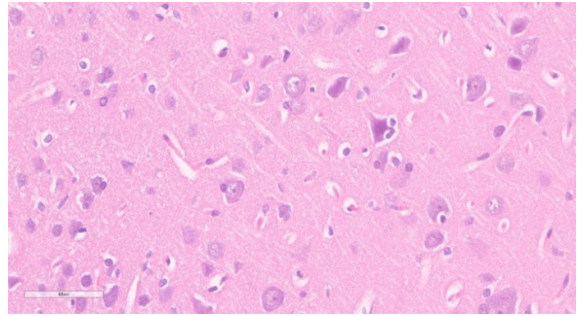
**G**



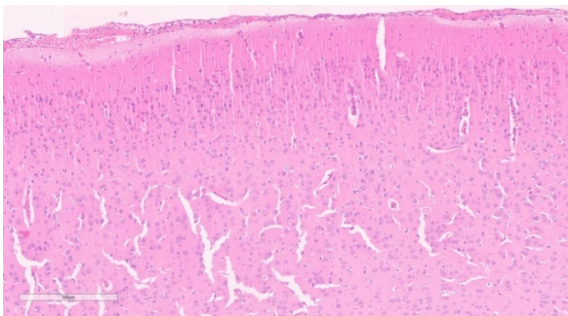
**H**



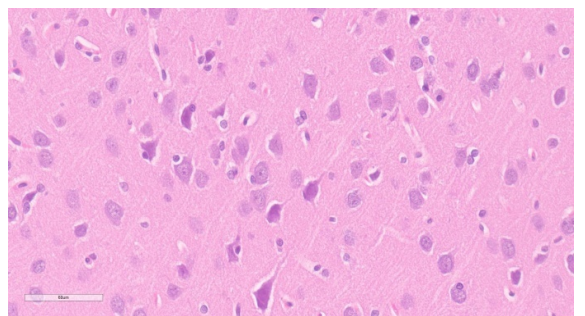
**I**



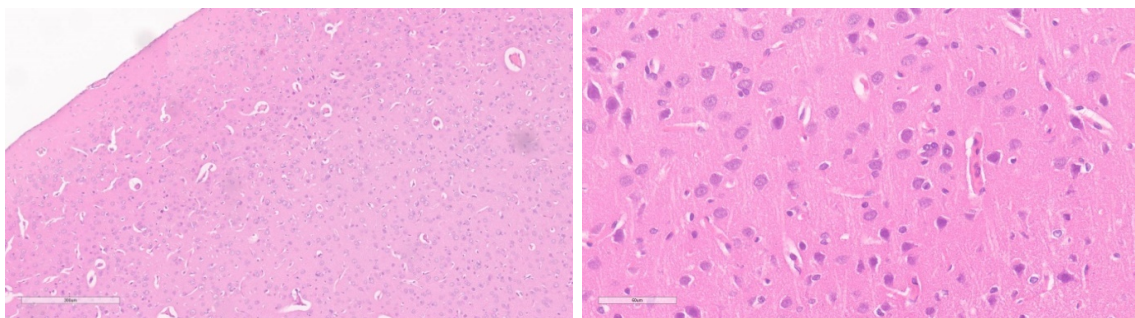
**J**



**K**



**L**



**Slika 16. Histološki prikaz mozga u (A, B) kontrolnoj, (C, D) MIX 1, (E, F) MIX 2, (G, H) MIX 3, (I, J) MIX 4, (K, L) MIX 5 grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).**

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i histopatoloških promena u mozgu, dobijena je dozna zavisnost za napunjenost krvnih sudova, ali za ovaj parametar nisu ispunjeni kriterijumi za potvrdu efekta. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 43.

**Tabela 43.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene histopatološke promene u mozgu kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
Napunjenost krvnih sudova	5,40E-03 - 4,74E-01	1,80E-02 - 1,58E+00	3,60E-04 - 3,16E-02	3,60E-03 - 3,16E-01

MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza.

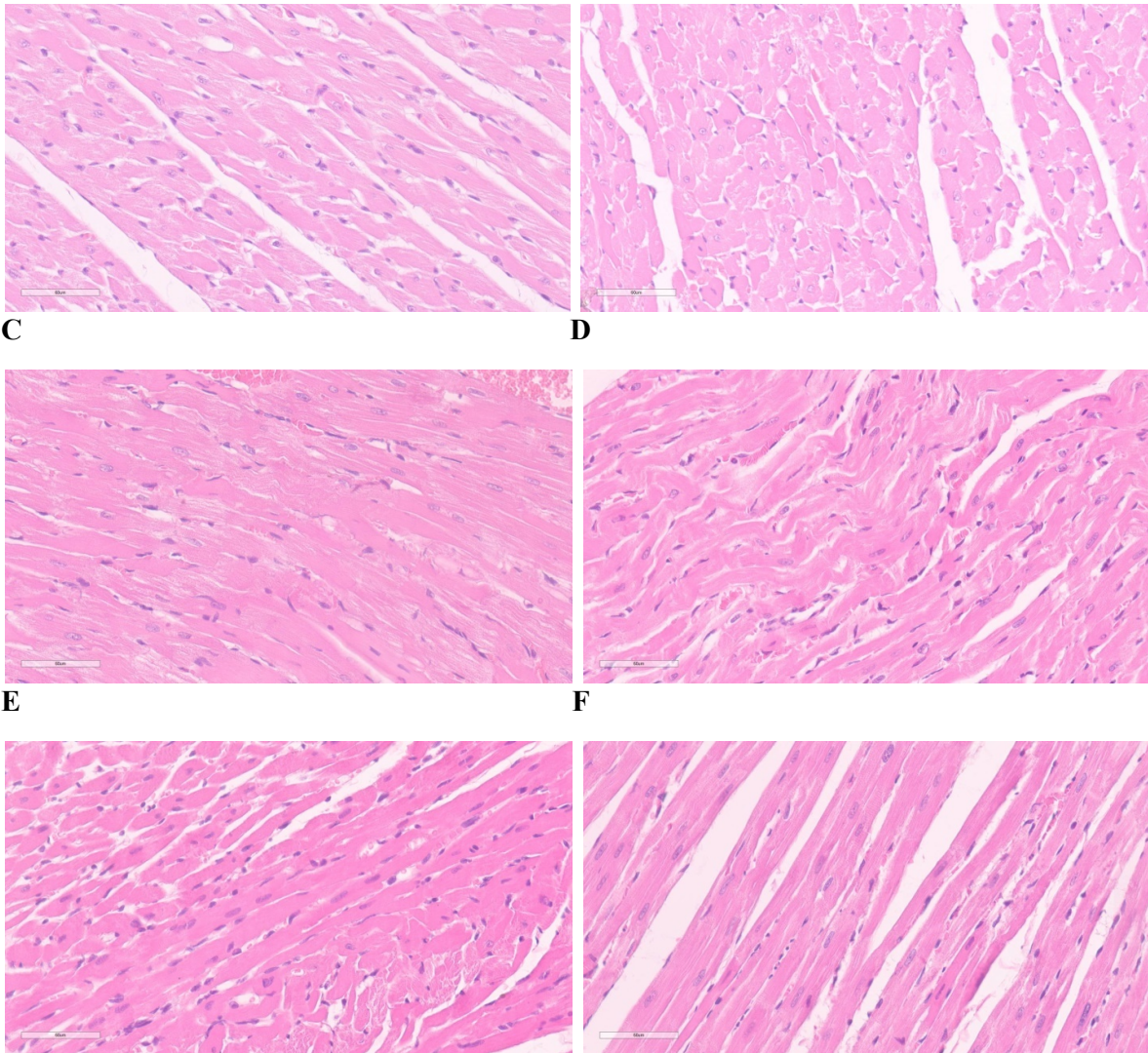
### Srce

Mikroskopskom analizom tkiva srca utvrđeno je da je kontrolna grupa bez značajnih promena. Takođe, u tkivu srca u MIX 1 grupi uočena je hiperemija i lakostepeni edem intersticijuma, kao i da pojedini kardiomiociti sadrže hipereozinofilnu citoplazmu, dok je u MIX 2 grupi evidentna i degeneracija pojedinačnih kardiomiocita. U grupi MIX 3 postoje izraženije promene na kardiomiocitima u odnosu na MIX 2, gde su uočeni i pojedini kardiomiociti talasastog izgleda, dok se u pojedinim kapilarima se uočavaju i hijalini mikrotrombi. U MIX 4 i MIX 5 grupi postoje izraženije promene na kardiomiocitima u odnosu na MIX 3, gde je uočena nekroza pojedinačnih kardiomiocita, hipereozinofilija pojedinih kardiomiocita, hiperemija i leukostaza.

Preseci tkiva srca prikazani su na Slici 17.

**A**

**B**



**Slika 17. Histološki prikaz srca u (A) kontrolnoj, (B) MIX 1, (C) MIX 2, (D) MIX 3, (E) MIX 4, (F) MIX 5 grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).**

## Pluća

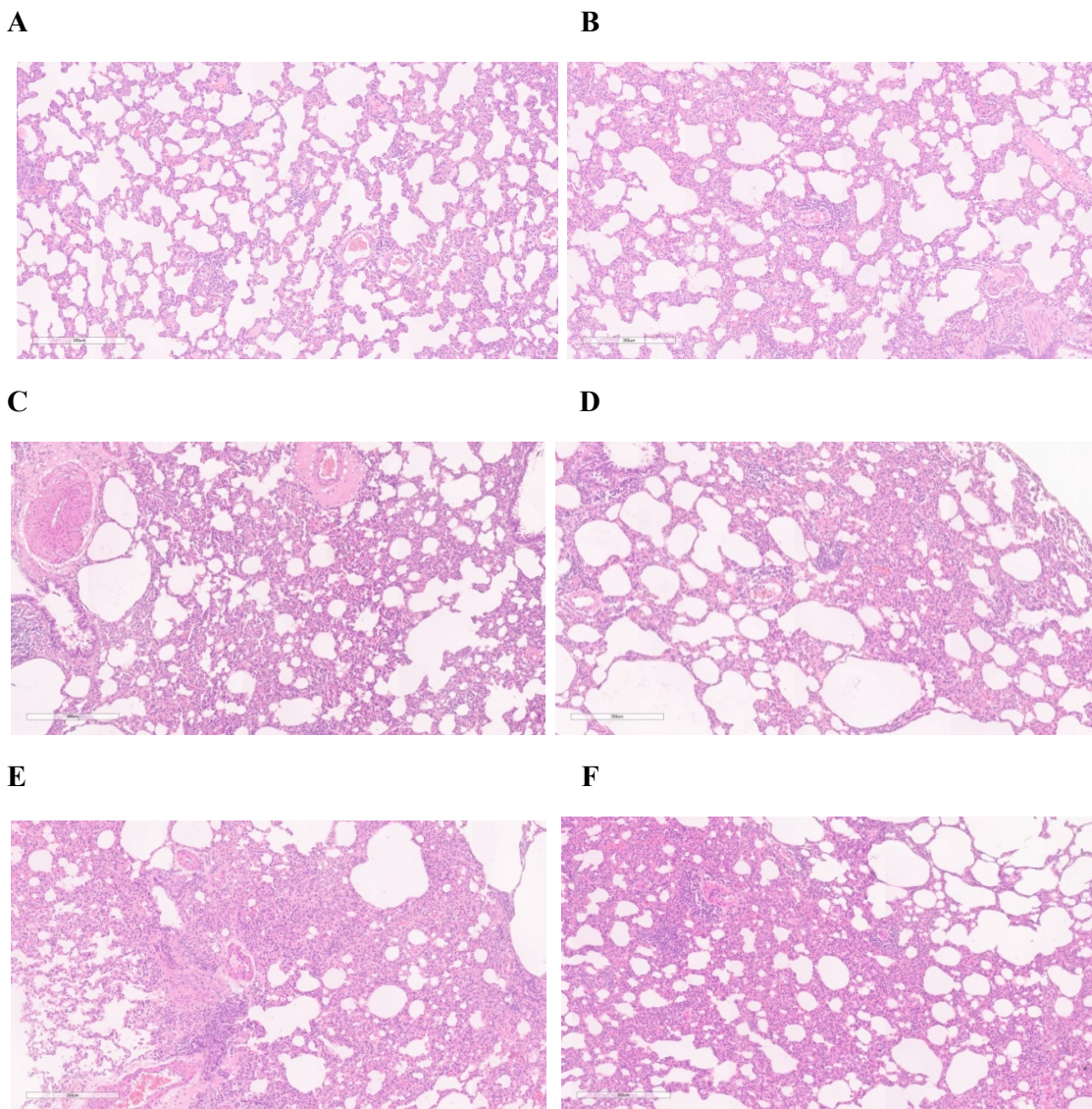
Mikroskopskom analizom tkiva pluća utvrđeno je da je tkivo pluća kontrolne grupe regularne morfologije, bez fokalnih promena i značajne inflamacije.

U plućima svih životinja grupe MIX 1 i MIX 2 postoje manji fokusi zapaljenja i uočeno je zadebljanje pojedinih alveolarnih septi zbog inflamacije i edema uz inflamatorni eksudat u pojedinim alveolama, kolaps pojedinih alveola i spajanje pojedinih alveola u veće vazdušne prostore.

U plućima većine životinja grupe MIX 3 i MIX 4 postoje fokusi zapaljenja i uočeno je zadebljanje pojedinih alveolarnih septi zbog inflamacije i edema uz inflamatorni eksudat u pojedinim alveolama, kolaps pojedinih alveola, spajanje pojedinih alveola u veće vazdušne prostore, kao i prisutne limfocitne agregate. U MIX 4 grupi fokusi zapaljenja su bili veći, inflamatorni eksudat bio je izraženiji, kao i broj limfocitnih agregata u poređenju sa MIX 3 grupom.

U plućima svih životinja u MIX 5 grupi postoje veći fokusi zapaljenja i uočeno je zadebljanje pojedinih alveolarnih septi zbog inflamacije i edema, uz gust inflamatorni eksudat u pojedinim alveolama, kolaps alveola, spajanje pojedinih alveola u veće vazdušne prostore i prisutan veći broj limfocitnih agregata.

Preseci tkiva pluća prikazani su na Slici 18.



**Slika 18. Histološki prikaz pluća u (A) kontrolnoj, (B) MIX 1, (C) MIX 2, (D) MIX 3, (E) MIX 4, (F) MIX 5 grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).**

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i histopatoloških promena u plućima, dobijena je dozna zavisnost za zadebljanje alveolarnih septi, ali za ovaj parametar nisu ispunjeni kriterijumi za potvrdu efekta. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 44.

**Tabela 44.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene histopatološke promene u mozgu kod

pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
Zadebljanje alveolarnih septi	9,12E-08 - 3,15E-01	3,04E-07 - 1,05E+00	6,08E-09 - 2,10E-02	6,08E-08 - 2,10E-01

MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza.

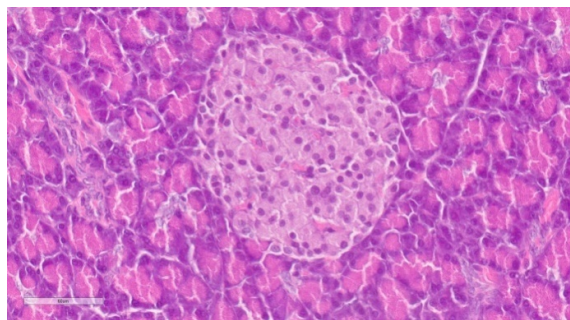
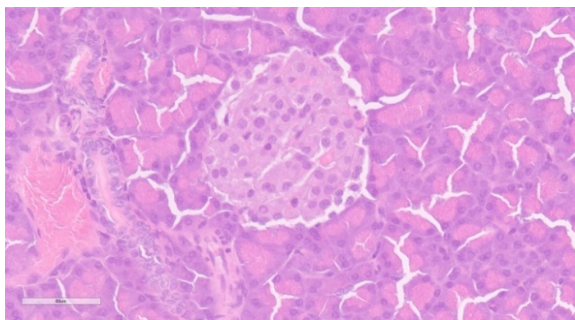
### Pankreas

Mikroskopskom analizom tkiva pankreasa utvrđeno je da nije bilo značajnih promena ni u kontrolnoj grupi ni u grupama tretiranim pojedinačnim metal(oid)ima. U MIX 5 grupi uočeno je da pojedine ćelije Langerhansovih ostrvaca imaju izrazito eozinofilnu citoplazmu, kao i da su im jedra smanjena, kondenzovana i hiperhromatična.

Preseci tkiva pankreasa prikazani su na Slici 19.

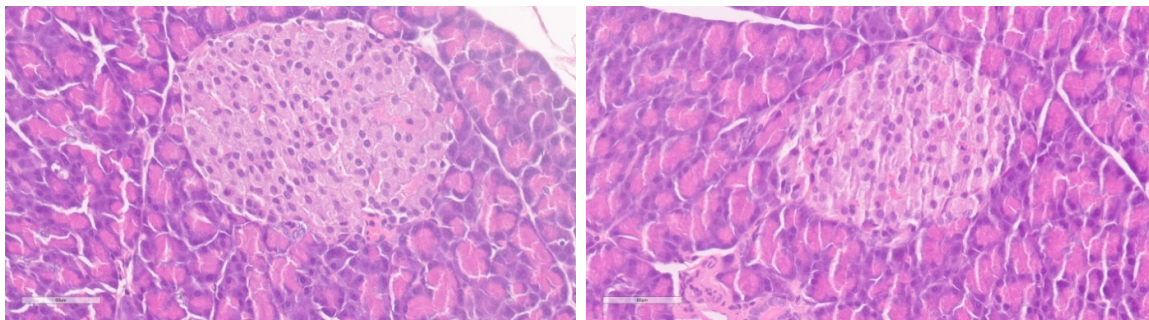
**A**

**B**



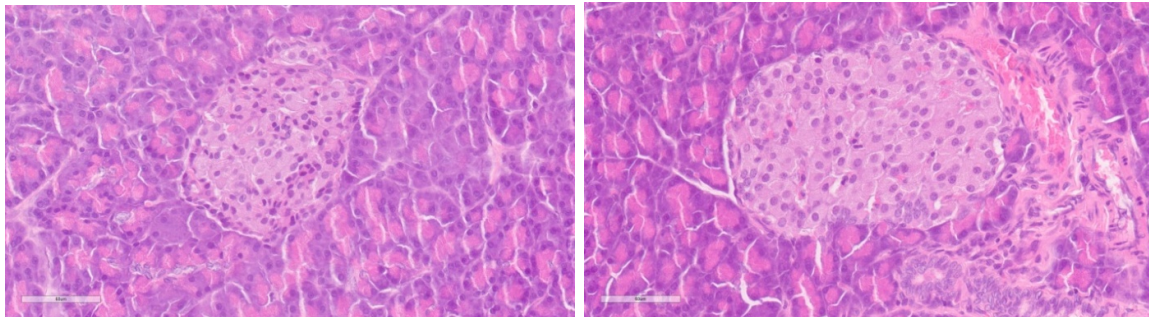
**C**

**D**



**E**

**F**



**Slika 19. Histološki prikaz pankreasa u (A) kontrolnoj, (B) MIX 1, (C) MIX 2, (D) MIX 3, (E) MIX 4, (F) MIX 5 grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).**

### Slezina

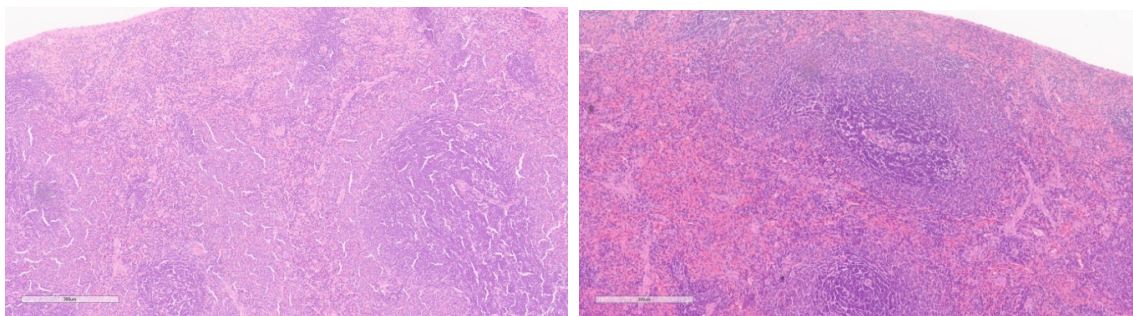
Mikroskopskom analizom tkiva slezine utvrđeno je da u svim analiziranim uzorcima postoji pasivna hiperemija i ekstramedularna hematopoeza.

Takođe, utvrđeno je da je tkivo slezine odgovarajuće građe odnosno regularne morfologije crvene i bele pulpe i u uzorcima kontrole i u uzorcima tretiranih grupa.

Preseci tkiva slezine prikazani su na Slici 20.

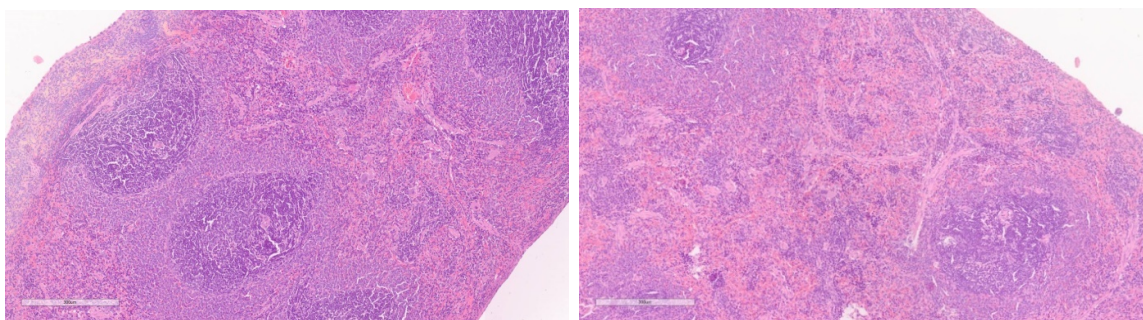
**A**

**B**



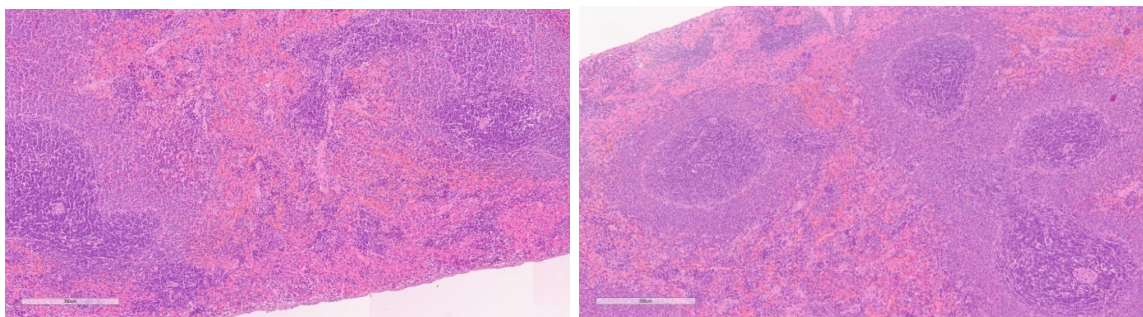
**C**

**D**



**E**

**F**



**Slika 20. Histološki prikaz slezine u (A) kontrolnoj, (B) MIX 1, (C) MIX 2, (D) MIX 3, (E) MIX 4, (F) MIX 5 grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).**

## Testisi

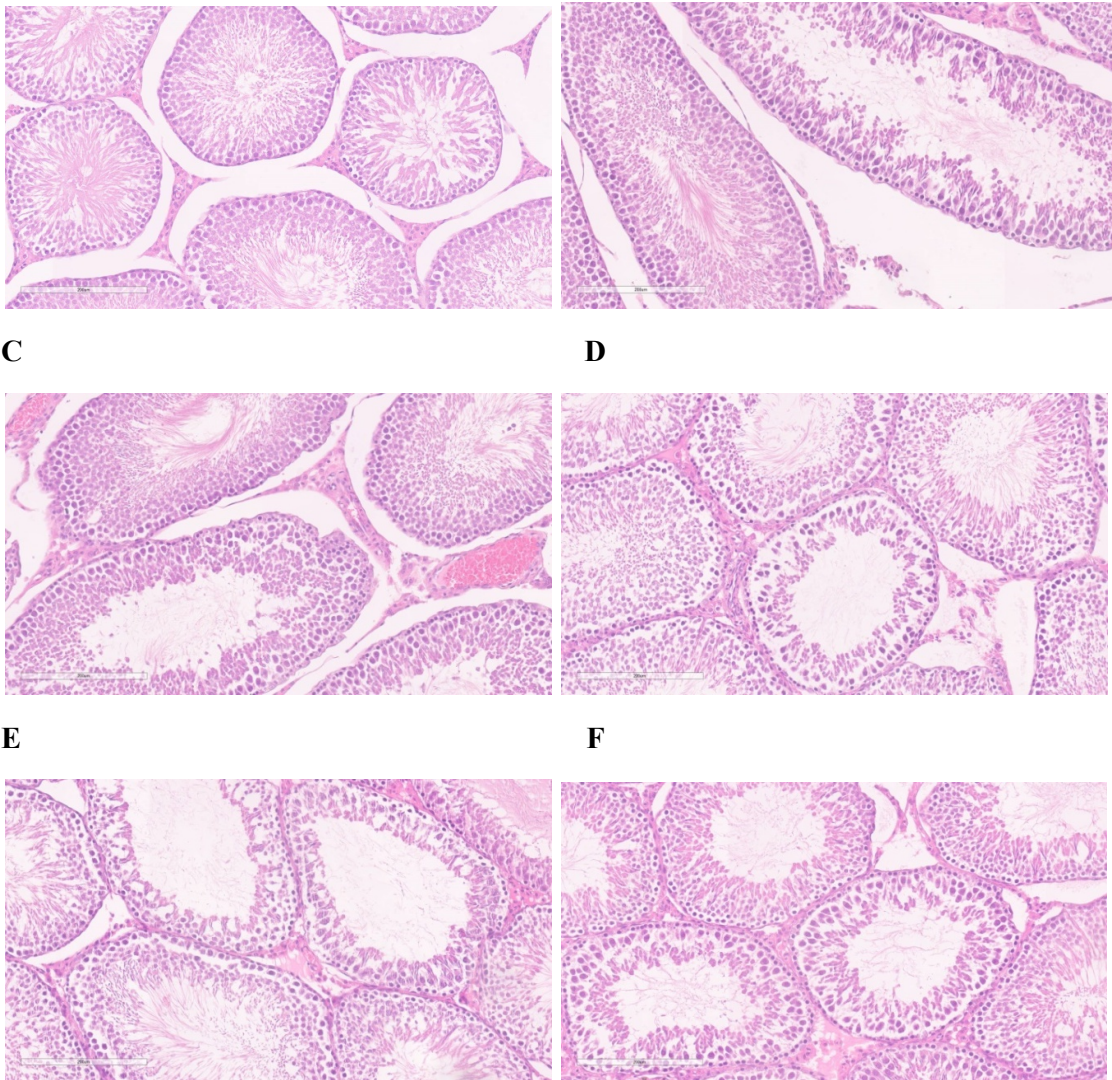
Mikroskopskom analizom tkiva testisa utvrđeno je da su u kontrolnoj grupi seminiferi tubuli uobičajene veličine i oblika, obloženi germinativnim epitelom i da su Laydigove ćelije odgovarajuće morfologije.

Uočeno je da u MIX 1 grupi pojedini seminiferi tubuli pokazuju znake lake atrofije, redukciju debljine germinativnog epitela i laku dilataciju lumena i narušen kontinuitet spermatogeneze (gubitak spermatida), a da su Laydigove ćelije očuvane morfologije. MIX 2 grupa pokazuje slične histopatološke promene kao i MIX 1 uz izraženiju dilataciju lumena, dok MIX 3 grupa pokazuje izraženiju atrofiju. U MIX 4 i MIX 5 grupi uočen je veći broj seminiferih tubula sa znacima atrofije, redukcija debljine germinativnog epitela i dilatacija lumena. U lumenu pojedinih seminiferih tubula tkiva iz MIX 4 i MIX 5 grupe nalaze se deskvamovane ćelije germinativnog epitela, veći broj seminiferih tubula pokazuje znake atrofije, redukciju debljine germinativnog epitela, dilataciju lumena i narušen kontinuitet spermatogeneze (gubitak spermatida), dok su Laydigove ćelije su očuvane morfologije.

Preseci tkiva testisa prikazani su na Slici 21.

**A**

**B**



**Slika 21. Histološki prikaz testisa u (A) kontrolnoj, (B) MIX 1, (C) MIX 2, (D) MIX 3, (E) MIX 4, (F) MIX 5 grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).**

Modelovanjem odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i histopatoloških promena u testisima, dobijena je dozna zavisnost za degeneraciju seminifernih tubula i edem intersticijuma. Kriterijume za potvrdu efekta ispunjava rezultat modelovanja odnosa eksternih doza Pb, Cd, Hg i As i edema intersticijuma. Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa doza odgovor prikazani su u Tabeli 45, dok je grafički prikaz potvrđenog efekta u Prilogu 1 (Slika 6).

**Tabela 45.** Intervali pouzdanosti referentne doze (BMD) (donji (BMDL) – gornji (BMDU)) za primenjene doze toksičnih metal(oid)a u odnosu na izmerene histopatološke promene u testisima kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

Parametar (BMDL – BMDU)	mg Pb/kg t.m./dan	mg Cd/kg t.m./dan	mg Hg/kg t.m./dan	mg As/kg t.m./dan
Degeneracija seminifernih	1,74E-03 - 4,56E-01	5,81E-03 - 1,52E+00	1,16E-04 - 3,04E-02	1,16E-03 - 3,04E-01

tubula				
<b>Edem intersticijuma</b>	<b>2,47E-02 - 6,51E-01</b>	<b>8,22E-02 - 2,17E+00</b>	<b>1,64E-03 - 4,34E-02</b>	<b>1,64E-02 - 4,34E-01</b>

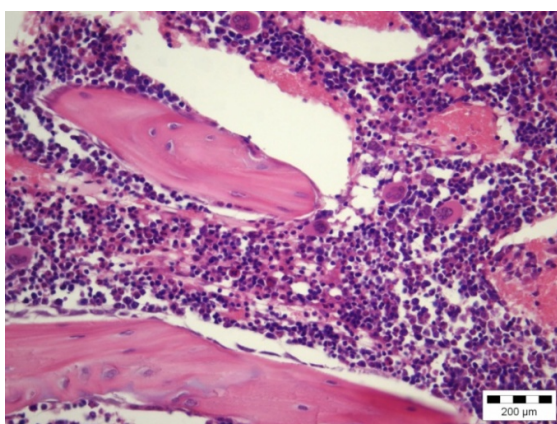
MIX: Pb+Cd+Hg+As; PROAST web 70.1 softver; metod usrednjavanja modela sa 200 iteracija zasnovan na kontinuiranim podacima (BMR od 5%) i arbitrarno odabranom dozom smeše (na osnovu primenjenih intervala doza i doze Cdx100 kao modela) na osnovu koje je proporcionalno izračunat BMD interval za svaki element u odnosu na opsege doza. Podebljano označene vrednosti su intervali doza-odgovor koji ispunjavaju kriterijume za prihvatanje (BMDU/BMDL < 50, BMD/BMDL < 20, da izračunata BMD nije 10 puta niža od najniže doze primenjene u studiji).

## Femur

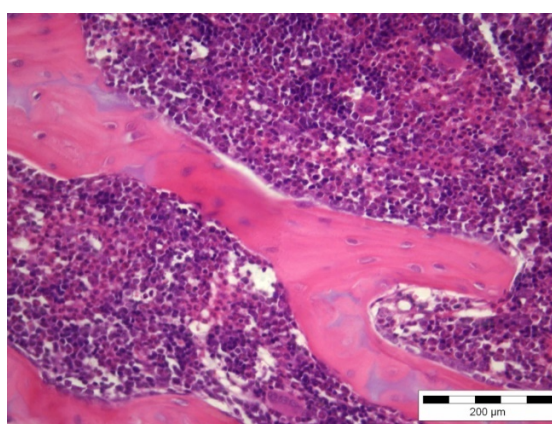
Mikroskopskom analizom tkiva femura nisu uočene značajne morfološke promene u tretiranim grupama.

Preseci tkiva femura prikazani su na Slici 22.

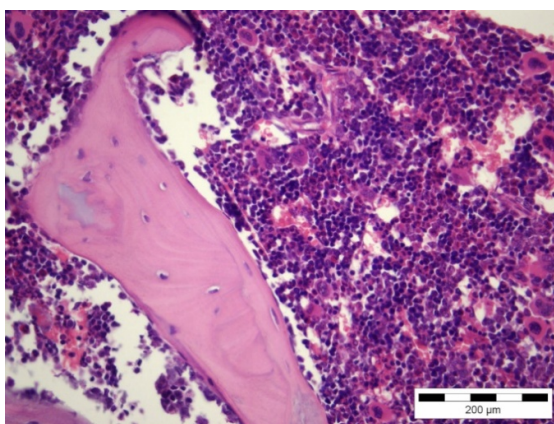
**A**



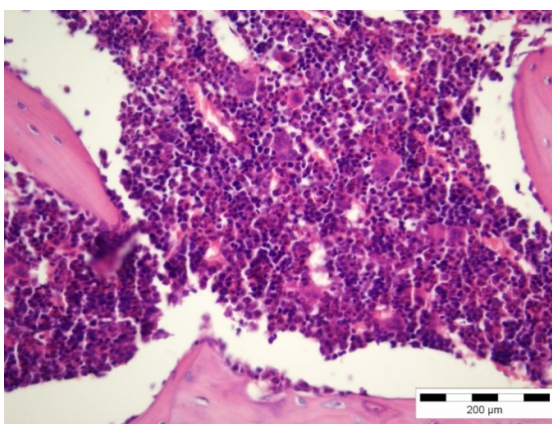
**B**



**C**

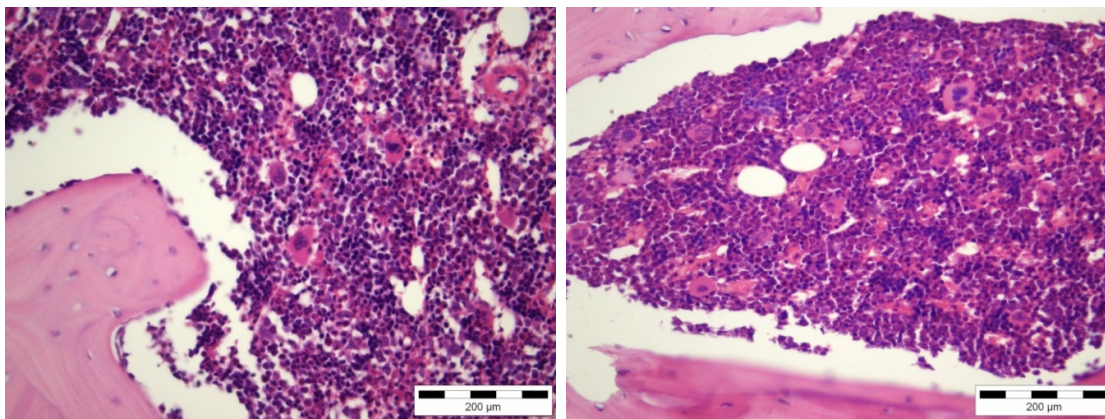


**D**



E

F



**Slika 22.** Histološki prikaz femura u (A) kontrolnoj, (B) MIX 1, (C) MIX 2, (D) MIX 3, (E) MIX 4, (F) MIX 5 grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim dozama smeše toksičnih metala (MIX), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).

#### 4.1.2. *In silico* rezultati ispitivanja toksičnosti smeše olova, kadmijuma, žive i arsena

##### 4.1.2.1. Uticaj smeše toksičnih metal(oid)a na razvoj bolesti

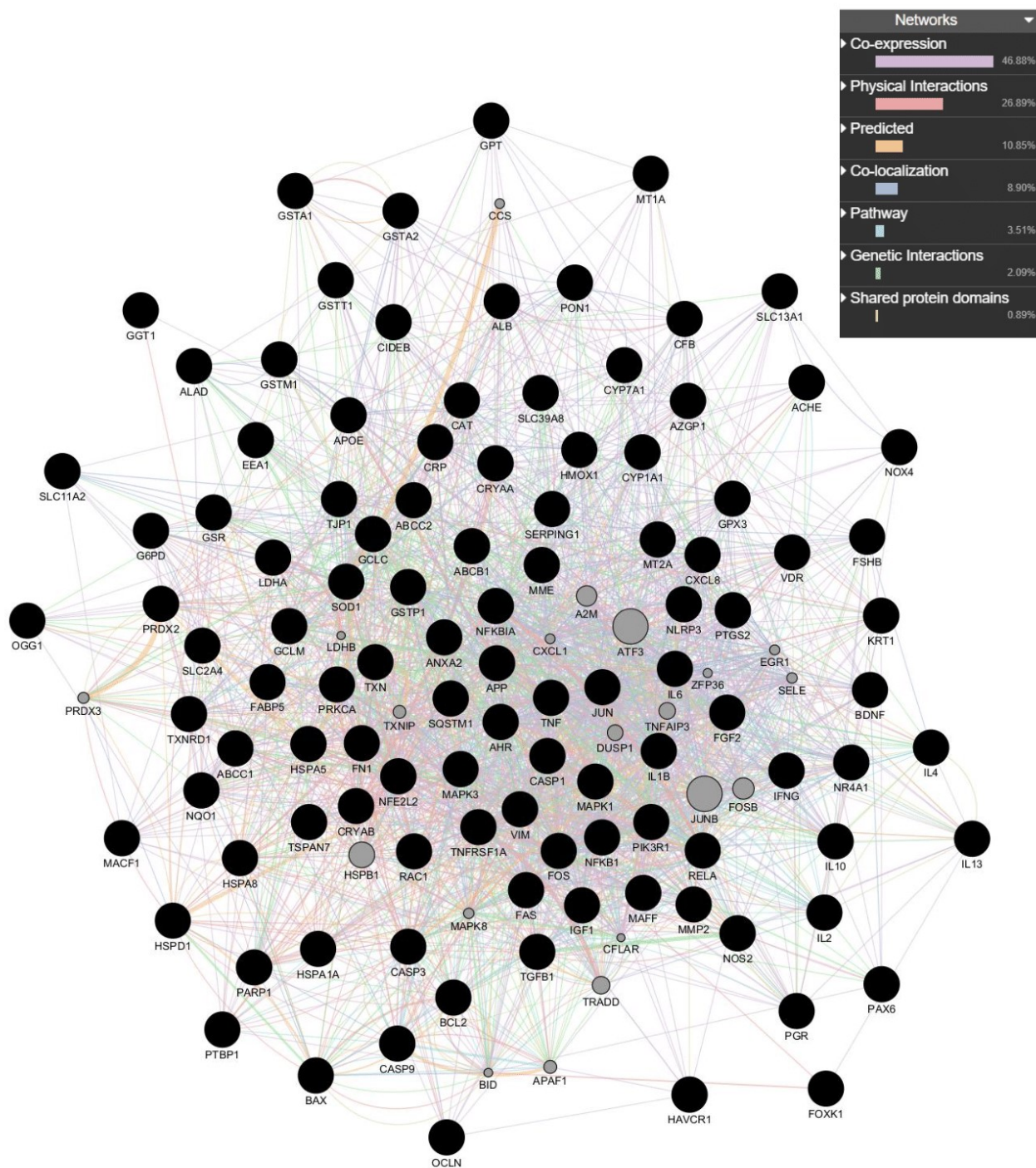
Toksikogenomskom analizom podataka iz CTD baze izdvojeni su geni povezani sa svakim od ispitivanih metala. Utvrđeno je da Pb utiče na 3453 gena, Cd na 6083 gena, Hg na 655 gena i As na 5268 gena. Rezultati ove analize su pokazali da smeša ispitivanih metal(oid)a utiče na 116 gena prikazanih u Tabeli 46.

**Tabela 46.** Zajednički geni na koje deluje smeša Pb+Hg+Cd+As (CTD baza podataka (<http://CTD.mdibl.org>) i MyVenn CTD alat (<http://ctdbase.org/tools/myVenn.go>))

Metal(oid)i (broj gena)	<b>Pb+Hg+Cd+As (116 gena)</b>
<b>Pb</b> (3453 gena)	<i>ABCB1, ABCC1, ABCC2, ACHE, AHR, ALAD, ALB, ANXA2, APOE, APP, AZGP1, BAX, BCL2, BDNF, CASP1, CASP3, CASP9, CAT, CFB, CIDEA, CRP, CRYAA, CRYAB, CXCL8, CYP-34A9, CYP1A1, CYP7A1, EEA1, FABP5, FAS, FGF2, FN1, FOS, FOXK1, FSHB, G6PD, GCLC, GCLM, GGT1, GPT, GPX1, GPX3, GSR, GSTA1, GSTA2, GSTM1, GSTP1, GSTT1, HAVCR1, HMOX1, HSP70, HSPA1A, HSPA5, HSPA8, HSPD1, IFNG, IGF1, IL10, IL13, IL1B, IL2, IL4, IL6, INS1, JUN, KRT1, LDHA, MACF1, MAFF, MAPK1, MAPK3, MME, MMP2, MT1, MT1A, MT2, MT2A, MTL-1, MTL-2, NFE2L2, NFKB1, NFKBIA, NLRP3, NOS2, NOX4, NQO1, NR4A1, OCLN, OGG1, PARP1, PAX6, PGR, PIK3R1, PON1, PRDX2, PRKCA, PTBP1, PTGS2, RAC1, RELA, SERPING1, SLC11A2, SLC13A1, SLC2A4, SLC39A8, SOD1, SQSTM1, TGFB1, TJP1, TNF, TNFRSF1A, TSPAN7, TXN, TXNRD1, VDR, VIM</i>
<b>Cd</b> (6083 gena)	
<b>Hg</b> (655 gena)	
<b>As</b> (5268 gena)	

Daljnom analizom u GeneMANIA softveru utvrđeni su tipovi interakcija među genima na koje deluje smeša Pb, Cd, Hg i As. Interakcije na koje utiče ispitivana smeša toksičnih metala (Pb, Hg, Cd i As), zajedno sa 20 srodnih gena prikazane su na slici 23. Utvrđeno je da je većina zajedničkih gena u koekspresiji (46,88%) i ostvaruje fizičke interakcije (26,89%). Interakcije koje je predvideo softver (10,85%), ko-lokalizacija (8,90%), interakcije signalnih puteva (3,51%), genetske

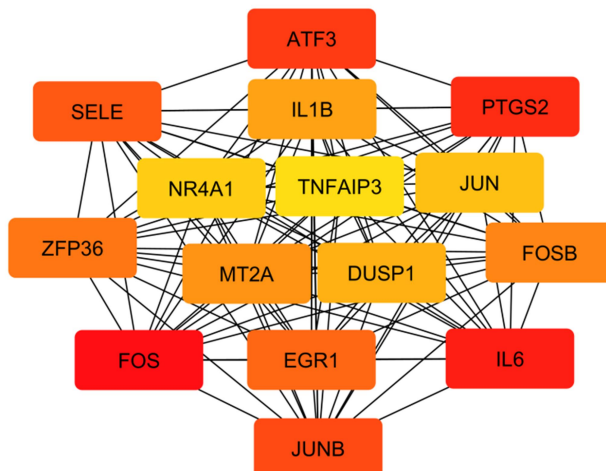
interakcije (2,09%) i interakcije u zajedničkim proteinskim domenima (0,89%) su manje zastupljene.



**Slika 23. Interakcije među genima na koje utiče ispitivana smeša toksičnih metal(oid)a (Pb, Hg, Cd i As), zajedno sa 20 srodnih gena (GeneMANIA, <http://geneMANIA.org/plugin/>). Koekspresija – dva gena su povezana ako su njihovi nivoi ekspresije slični u svim uslovima u studiji ekspresije gena; Fizičke interakcije – dva genska proizvoda su povezana ako je utvrđeno da su u interakciji u studiji interakcije protein-protein; Interakcije predviđene pomoću servera; Kolokalizacija – geni se eksprimiraju u istom tkivu ili se njihovi proteini nalaze u istom tkivu; interakcije signalnih puteva - dva genska proizvoda su povezana ako učestvuju u istoj reakciji u signalnom putu; Genetske interakcije - dva gena su funkcionalno povezana ako je utvrđeno da su efekti poremećaja jednog gena**

modifikovani perturbacijama drugog gena; Zajednički proteinski domeni - kada proizvodi dva gena, odnosno proteini, imaju zajedničke domene.

Najvažniji regulatorni geni (15 gena) izdvojeni iz seta zajedničkih gena na koje deluje smeša ispitivanih metal(oid)a prikazani su na slici 24 (Cytoscape Cytohubba dodatak).



**Slika 24. Najvažniji regulatorni geni (15 gena) izdvojeni iz seta zajedničkih gena na koje deluje smeša Pb+MeHg+Cd+As, rangirani po MCC skor (engl. Maximal Clique Centrality).** Boja čvorova predstavlja intenzitet korelacije pri čemu je žuta najniža, a crvena najveća (Cytoscape Cytohubba dodatak).

Dalja analiza (Set Analyzer CTD alat) seta najvažnijih gena, otkrila je najvažnije kategorije bolesti koje su povezane sa izloženošću smeši Pb, Cd, Hg i As i prikazane su u Tabeli 47. Ovi rezultati usmerili su detaljniju *in silico* analizu pojedinih sistema u organizmu i dalje ispitivanje hematoloških promena i neurodegenerativnih bolesti.

**Tabela 47.** Najvažnije kategorije bolesti povezane sa izloženošću smeši Pb+MeHg+Cd+As (CTD baza podataka (<http://CTD.mdibl.org>) i Set Analyzer CTD alat (<https://ctdbase.org/tools/analyzer.go>); prag statističke značajnosti: 0,01.

Kategorija bolesti	p-vrednost
Kardiovaskularne bolesti	7,34E-21
Bolesti nervnog sistema	

#### 4.1.2.2. Uticaj smeše toksičnih metal(oid)a na hematološke promene

##### Selekcija ciljnih gena

*In silico* analiza zasnovana je na rezultatima dobijenim u *in vivo* delu istraživanja, uzimajući u obzir anemiju, trombocitozu i hematološke bolesti kao sveobuhvatan pojam koji obuhvata poremećaje hematološke homeostaze i uključuje različite termine („anemija“, „poremećaji zgrušavanja krvi“, „poremećaji krvnih pločica/trombocita“, „poremećaji proteina u krvi“, „bolesti koštane srži“ itd.) u CTD bazi (<http://ctdbase.org/>). Pretragom CTD baze podataka ustanovljen je ukupan broj gena koji stupaju u interakciju sa testiranim toksičnim metal(oid)ima. Na kartici „Bolest“, selekcija gena je otkrila povezanost sa individualnom izloženošću pojedinačnim toksičnim metal(oid)ima i sa razvojem anemije, trombocitoze i hematoloških bolesti, što je prikazano u Tabeli 46. Zatim su ustanovljeni zajednički geni za ispitivane toksične metal(oid)e i ispitivane bolesti. Prilikom

ispitivanja anemije, ustanovljeno je da smeša toksičnih metal(loid)a interaguje sa 4 zajednička gena - *ACHE*, *GSR*, *PARP1*, *TNF*. Kod hematoloških oboljenja ustanovljeno je da smeša Pb, Cd, Hg i As interaguje sa 2 uobičajena gena - *ALAD*, *FAS*. Za razliku od anemije i hematoloških bolesti, broj gena povezanih sa ispitivanim metal(loid)ima i trombocitozom je primetno mali. Za Pb nisu ustanovljeni zajednički geni, dok je za Cd ustanovljeno četiri (*CALR*, *JAK2*, *MPL*, *THPO*), za Hg je ustanovljeno dva (*CALR*, *JAK2*), a za As je ustanovljen samo jedan (*JAK2*). Uzimajući u obzir gorenavedene rezultate, svi geni zahvaćeni ispitivanim metal(oid)ima povezani sa trombocitozom uzeti su u obzir za dalju *in silico* analizu: *CALR*, *JAK2*, *MPL*, *THPO* (Tabela 48).

**Tabela 48.** Geni povezani sa anemijom, trombocitozom i hematološkim bolestima i individualnom izloženosti ispitivanim metal(oid)ima i njihovoj smeši (MIX) (MyVenn CTD alat).

	Ukupan broj gena	Anemija	Trombocitoza	Hematološke bolesti
<b>Pb</b>	3386	<i>ACHE</i> , <i>AGT</i> , <i>ATG5</i> , <i>CSF2</i> , <i>GSR</i> , <i>HP</i> , <i>IGF2</i> , <i>KRAS</i> , <i>NUP98</i> , <i>PARP1</i> , <i>PRL</i> , <i>SLC40A1</i> , <i>SOD2</i> , <i>TNF</i>	/	<i>ALAD</i> , <i>FAS</i> , <i>GARI</i> , <i>MTR</i>
<b>Cd</b>	5891	<i>ACHE</i> , <i>AGT</i> , <i>ATG5</i> , <i>ATG7</i> , <i>ATP7A</i> , <i>CDK6</i> , <i>CLEC11A</i> , <i>CSF2</i> , <i>EPO</i> , <i>GSR</i> , <i>HAMP</i> , <i>HP</i> , <i>IGF2</i> , <i>IL2</i> , <i>KRAS</i> , <i>PARP1</i> , <i>PRL</i> , <i>PTH</i> , <i>SLC40A1</i> , <i>SLC46A1</i> , <i>SOD2</i> , <i>TNF</i> , <i>TYMS</i>	<i>CALR</i> , <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> , <i>THPO</i>	<i>ALAD</i> , <i>FAS</i> , <i>KLF1</i>
<b>Hg</b>	646	<i>ACHE</i> , <i>GSR</i> , <i>HAMP</i> , <i>IL2</i> , <i>PARP1</i> , <i>TNF</i> , <i>TYMS</i>	<i>CALR</i> , <i>JAK2</i>	<i>ALAD</i> , <i>FAS</i> , <i>MTR</i>
<b>As</b>	5084	<i>ACHE</i> , <i>ASPG</i> , <i>ATG7</i> , <i>CDK6</i> , <i>CSF2</i> , <i>GSR</i> , <i>IL2</i> , <i>KRAS</i> , <i>MTHFR</i> , <i>PARP1</i> , <i>PRL</i> , <i>PTH</i> , <i>SOD2</i> , <i>TNF</i> , <i>TNFRSF10A</i>	<i>JAK2</i>	<i>ALAD</i> , <i>FAS</i> , <i>MTHFR</i> , <i>MTR</i>
<b>Pb+Cd+Hg+As</b>		<i>ACHE</i> , <i>GSR</i> , <i>PARP1</i> , <i>TNF</i>	/	<i>ALAD</i> , <i>FAS</i>

#### Identifikacija miRNA i faktora transkripcije

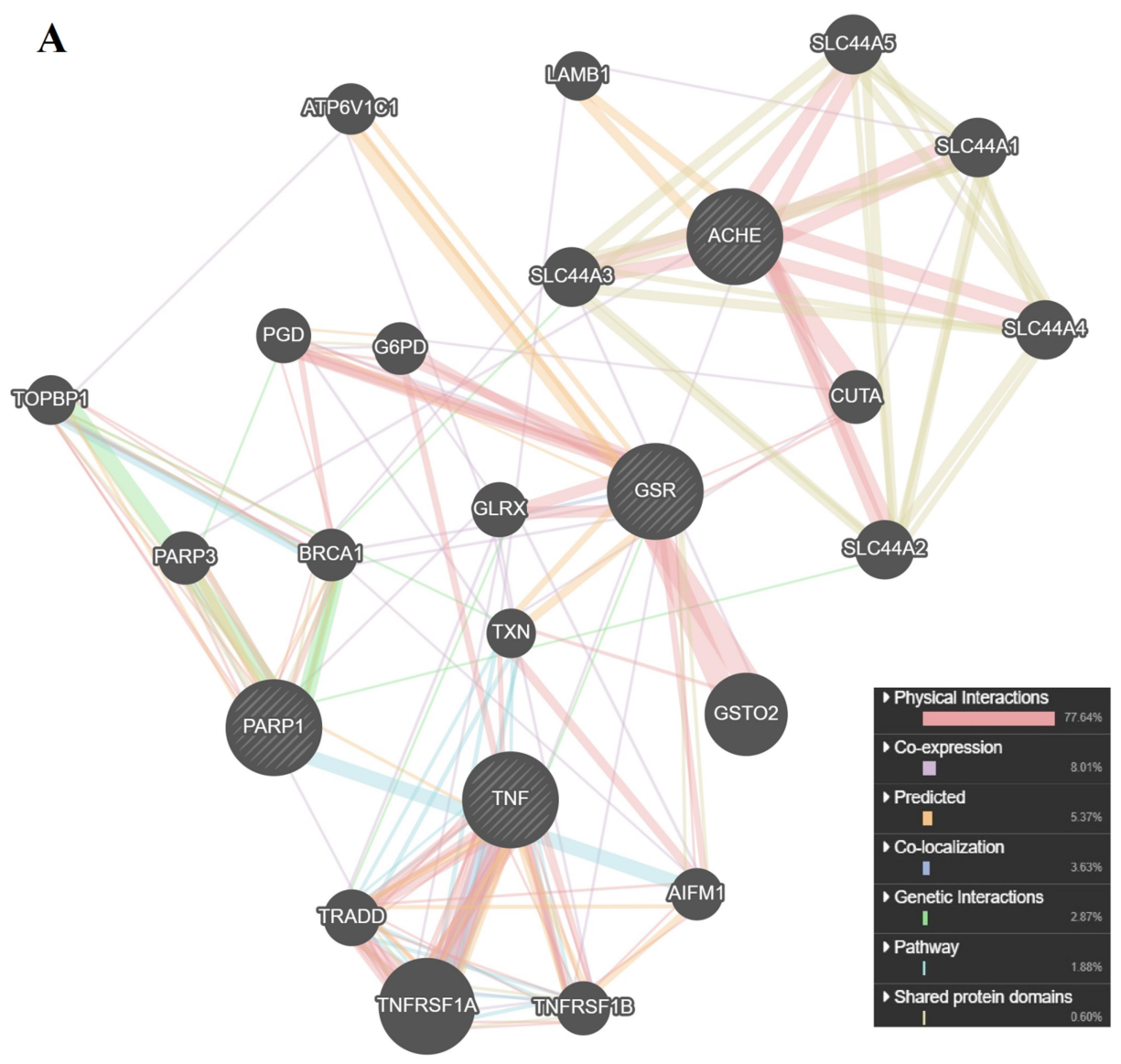
Analizom zasnovanom na interakcijama otkrivene su ciljne porodice miRNA za svaki skup odabranih gena: 1) anemija: hsa-miR-187-3p (*ACHE*), hsa-miR-148a-3p/hsa-miR-148b-3p/hsa-miR-152-3p (*GSR*), hsa-miR-129-1-3p/hsa-miR-129-2-3p (*PARP1*), hsa-miR-331-3p (*TNF*); 2) trombocitoza: hsa-miR-216a-5p (*CALR*, *JAK2*), hsa-miR-22-3p (*THPO*), hsa-miR-325-3p (*MPL*); 3) hematološke bolesti: hsa-miR-216b-5p (*FAS*), hsa-miR-15a-5p/hsa-miR-15b-5p/hsa-miR-16-5p/hsa-miR-195-5p/hsa-miR-424-5p/hsa-miR-497-5p/hsa-miR-6838-5p (*ALAD*).

Određeni su prioritetni transkripcioni faktori za hematološke kranje tačke: 1) anemija: GATA1 (*ACHE*, *GSR*, *PARP1*, *TNF*); trombocitoza: ERG (*JAK2*, *CALR*, *MPL*, *THPO*) 3) hematološke bolesti: CUX1 (*ALAD*, *FAS*).

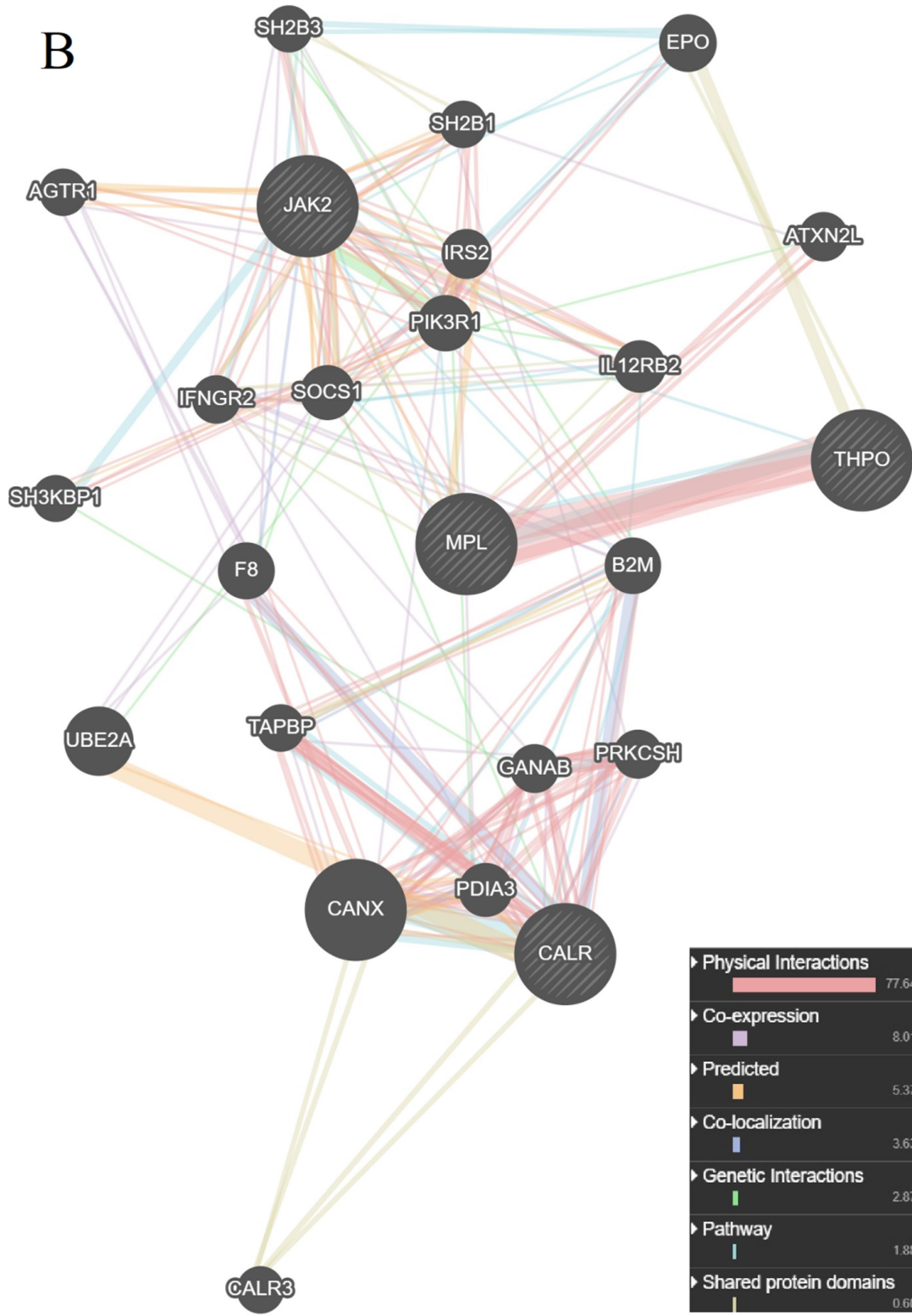
#### Identifikacija vrste interakcija između ciljnih gena

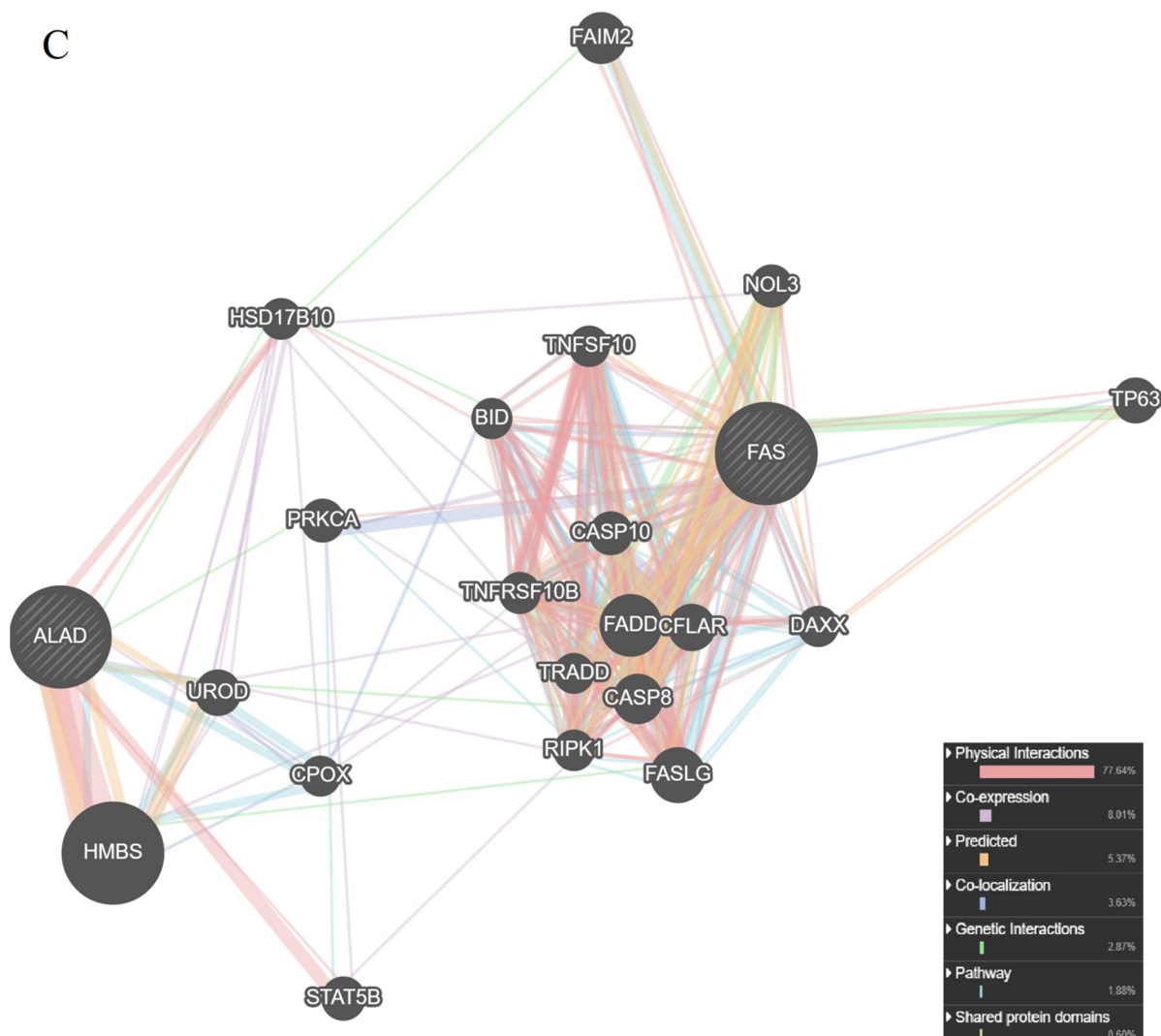
GeneMANIA server za predviđanje je zatim korišćen za ispitivanje vrste interakcija između zajedničkih gena Pb, Cd, Hg i As za anemiju i hematološke bolesti i svih gena za trombocitozu, kao i sa 20 srodnih gena. Interakcije mogu biti fizičke – dva gena su povezana ako su njihovi proteini u interakciji; koekspresija – dva gena su povezana ako su njihovi nivoi ekspresije slični u svim uslovima u studiji ekspresije gena; genetske interakcije - dva gena su funkcionalno povezana ako je utvrđeno da su efekti poremećaja jednog gena modifikovani perturbacijama drugog gena; kolokalizacija – geni se ekspimiraju u istom tkivu ili se njihovi proteini nalaze u istom tkivu; interakcije signalnih puteva – dva genska proizvoda su povezana ako učestvuju u istoj reakciji u signalnom putu; Zajednički proteinski domeni - kada proizvodi dva gena, odnosno proteini, imaju zajedničke domene; interakcije predviđene pomoću servera (143).

Na slici 25 prikazane su interakcije između selektovanih gena za anemiju (25A), trombocitozu (25B) i hematološke bolesti (25C) zajedno sa 20 srodnih gena, kao i prikaz udela tipa interakcija.



B





**Slika 25.** Interakcije između ciljnih gena povezanih sa izloženosti smeši toksičnih metal(oid)a (Pb, Hg, Cd i As) i anemijom (A), trombocitozom (B), hematološkim bolestima (C), zajedno sa 20 srodnih gena (Dominantni tip interakcija u sve tri ispitivane bolesti su fizičke interakcije, čiji je doprinos 77,64%) (GeneMANIA, <http://geneMANIA.org/plugin/>).

#### Interakcija toksičnih metal(oid)a i gena

U sledećem koraku analize ispitano je kako analizirani toksični metal(oid)i utiču na ciljne gene u okviru kartice „interakcije gena“ u bazi podataka CTD. Uočeno je da ispitivani toksični metal(oid)i utiču na ekspresiju proteina i ekspresiju iRNK-a. Uočene su binarne interakcije, u kojima jedna hemikalija, u ovom slučaju toksični metal(oid), može istovremeno povećati i smanjiti ekspresiju proteina i iRNK glasnika. Složene interakcije, odnosno uticaj više hemikalija na ekspresiju jednog gena, nisu uzete u obzir. Dobijeni podaci prikazani su u Tabeli 49.

**Tabela 49.** Uticaj Pb, Cd, Hg, As na ciljne gene povezane sa anemijom, trombocitozom i hematološkim oboljenjima

Bolest		Anemija				Trombocitoza				Hematološke bolesti	
Metal(oid)	Interaction	<i>ACHE</i>	<i>GSR</i>	<i>PARP1</i>	<i>TNF</i>	<i>JAK2</i>	<i>CALR</i>	<i>MPL</i>	<i>THPO</i>	<i>ALAD</i>	<i>FAS</i>
<i>Pb</i>	ekspresija iRNK-a	NA	NA	NA	↑	/	/	/	/	↓	NA
	ekspresija proteina	NA	NA	NA	↑	/	/	/	/	↓	↑

<i>Cd</i>	ekspresija iRNA	NA	↑	↑	↑	/	↑	↓	↓	NA	↑
	ekspresija proteina	↓	↑↓	NA	↑	/	NA	NA	NA	NA	↑
<i>Hg</i>	ekspresija iRNA	NA	NA	NA	↑	NA	↑	/	/	NA	
	ekspresija proteina	NA	NA	NA	↑	NA	NA	/	/	NA	
<i>As</i>	ekspresija iRNA	↑	↑	↓	↑↓	NA	/	/	/	NA	↑
	ekspresija proteina	NA	NA	↓	↑↓	NA	/	/	/	↓	NA

↑ - povećava; ↓ - smanjuje; ↑↓ - povećava se i smanjuje; / - ne utiče na te gene; NA - nema informacija

Interakcije svih ispitivanih metal(oid)a i ciljnih gena nisu bile uniformne. Određene interakcije se mogu smatrati aditivnim: uticaj Pb, Cd i As na FAS; uticaj Cd i Hg na CALR; uticaj Pb i As na ALAD; uticaj Pb, Cd i Hg na TNF. Aditivni uticaj Pb, Cd i Hg na TNF ukazuje na njegovu važnu ulogu u nastanku anemije. Nekoliko interakcija je ispoljilo suprotan način delovanja ili imalo dvojnju prirodu, što pokazuje uticaj Cd i As na PARP1 koji ukazuje na razlike u načinu delovanja pojedinih metal(oid)a.

Zatim je, analizom obogaćivanja genske ontologije (*ToppFun ToppGene* alat), istražena veza između signalnih puteva koji doprinose razvoju odabranih bolesti preko ciljnih gena (zajednički geni za anemiju i hematološka oboljenja; svi geni za trombocitozu). Rezultati su prikazani u Tabeli 50 za anemiju, Tabeli 51 za trombocitozu i Tabeli 52 za hematološka oboljenja.

**Tabela 50.** Putevi na koje utiče smeša toksičnih metal(oid)a (Pb+Cd+Hg+As) povezani sa razvojem anemije dejstvom zajedničkih gena (*ACHE, GSR, PARP1, TNF*) (*ToppFun* alat)

GO kategorija	Naziv	ID	p-vrednost	Geni
Putevi	Apoptoza izazvana slobodnim radikalima	MM1400	1.751E-6	2
	Apoptoza izazvana slobodnim radikalima	M96	2.813E-6	2
	Nekroza izazvana nanočesticama	M39487	4.125E-6	2
	TNFR1 signalni put	MM1516	2.359E-5	2
	TNFR1 signalni put	M42571	2.533E-5	2

**Tabela 51.** Putevi na koje utiče smeša toksičnih metal(oid)a (Pb+Cd+Hg+As) povezani sa razvojem trombocitoze dejstvom svih gena na koje deluje (*JAK2, CALR, MPL, THPO*) (*ToppFun* alat)

GO kategorija	Naziv	ID	p-vrednost	Geni
Putevi	Citokin sličan hormonu i Jak-STAT signalni put	M47904	6.140E-9	3
	TPO (trombopoetin) signalni put	M11520	1.827E-8	3
	TPO (trombopoetin) signalni put	MM1519	2.076E-8	3
	16p11.2 sindrom distalne delecije	M40056	3.293E-5	2
	Agregacija trombocita (formiranje krvnog čepa)	M10735	4.619E-5	2

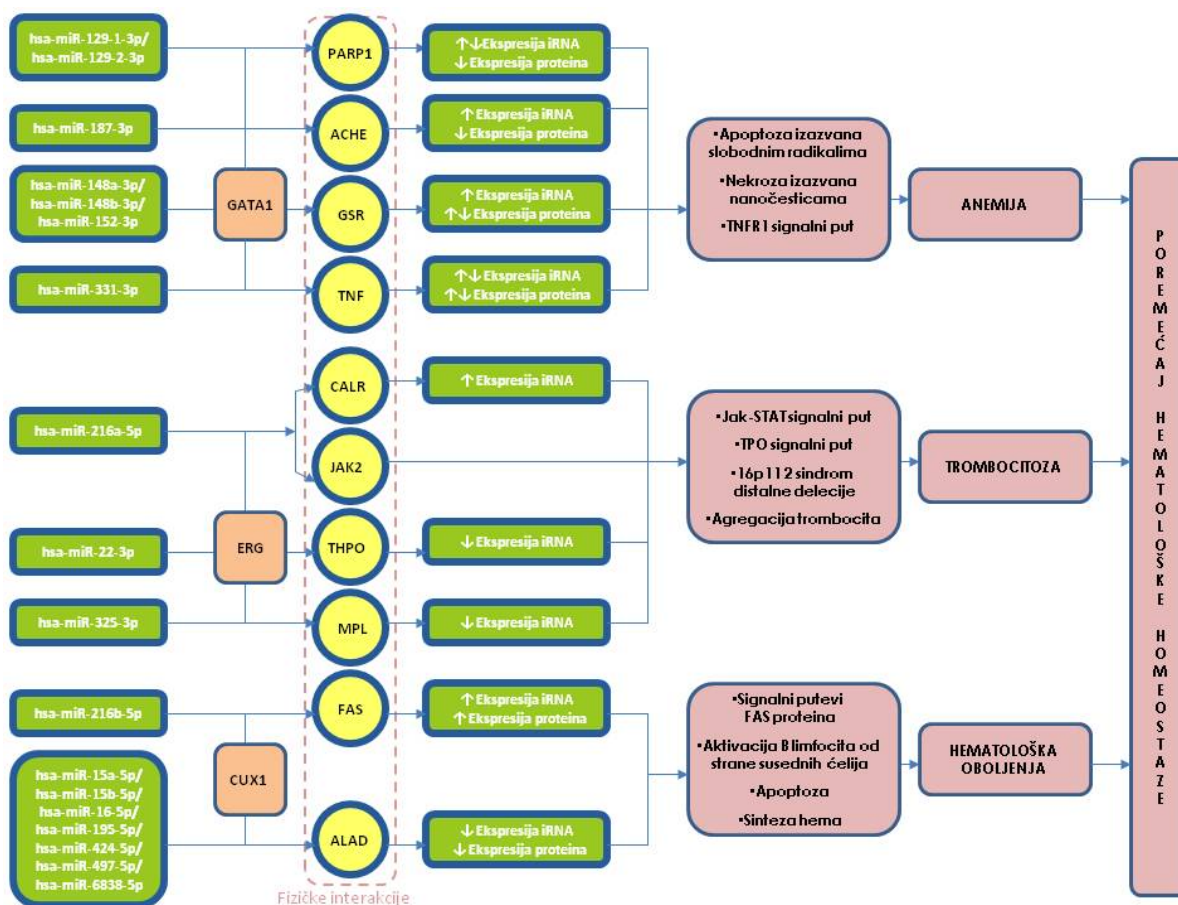
**Tabela 52.** Putevi na koje utiče smeša toksičnih metal(oid)a (Pb+Cd+Hg+As) povezani sa razvojem hematoloških oboljenja dejstvom zajedničkih gena (*ALAD, FAS*) (*ToppFun* alat)

GO kategorija	Naziv	ID	p-vrednost	Geni
Putevi	FasL/ CD95L signalizacija	M27710	7.219E-4	1
	Aktivacija B limfocita od strane susednih ćelija	MM1552	8.663E-4	1
	FAS-JNK signalni put	M47710	1.011E-3	1
	TNF-tip receptora Fas izaziva apoptozu	M5060	1.299E-3	1

	vezivanjem liganda			
	Biosinteza hema	M39470	1.299E-3	1

Predloženi dijagram MoA

Predloženi dijagram MoA je prikazan na slici 26.



Slika 26. Predloženi MoA dijagram poremećaja hematološke homeostaze izazvane smešom toksičnih metal(oid)a (Pb+Cd+Hg+As).

#### 4.1.2.3. Uticaj smeše toksičnih metal(oid)a na razvoj neurodegenerativnih bolesti

##### Selekcija ciljnih gena

Literaturni podaci ukazuju na to da neurodegenerativne bolesti imaju veliki broj različitih patoloških obrazaca (23). Mnoga istraživanja poslednjih godina ukazuju na uticaj metala na razvoj neurodegenerativnih procesa, što potvrđuje povećanje nivoa toksičnih metala u krvi pacijenata obolelih od neurodegenerativnih bolesti poput ALS, AD i PD (149). U ovoj studiji istražena je veza između neurodegenerativnih bolesti (ALS – amiotrofična lateralna skleroza, PD – Parkinsonova bolest i AD - Alchajmerova bolest) i toksičnih metal(oid)a (Pb, Cd, MeHg (neurotoksični, organski oblik žive), As) analizom interakcija hemikalija–gen/protein iz CTD baze podataka (CTD; <http://CTD.mdibl.org>). Toksikogenomskom analizom podataka iz CTD baze izdvojeni su geni povezani sa svakim od ispitivanih metal(oid)a i sa razvojem odabranih neurodegenerativnih bolesti (Tabela 53). Skupovi gena su izdvojeni iz CTD baze podataka u okviru kartica „bolesti“ za svaki metal(oid). Nakon toga, MyVenn CTD alat je korišćen za selekciju zajedničkih gena na koju deluje

smeša metal(oid)a. Utvrđeno je da Pb utiče na 16, 31 i 37 gena povezanih sa razvojem ALS, PD i AD; MeHg utiče na 10, 39 i 21 gen koji je povezan sa razvojem ALS, PD i AD; Cd utiče na 11, 40 i 46 gena povezanih sa razvojem ALS, PD i AD; As utiče na 14, 39 i 42 gena povezanih sa razvojem ALS, PD i AD. Rezultati su pokazali da je smeša ispitivanih metal(oid)a u interakciji sa 7 gena povezanih sa ALS (*GSR, GSTP1, PON1, SOD1, SOD2, SQSTM1, TP53*), 13 gena povezanih sa PD (*ABCB1, BDNF, GSTA4, GSTM1, GSTP1, HMOX1, IL6, MAPT, NQO1, SOD1, SOD2, TH, TNF*) i 14 gena povezanih sa AD (*ACHE, APP, BAX, BCL2, BDNF, CALM1, CASP3, HMOX1, IL1B, MAPT, NOS3, SOD2, TNF, VEGFA*). Samo jedan gen (*SOD2*) je zajednički za sve tri bolesti i povezan sa izloženošću smeši metal(oid)a. Pored toga, *BDNF, HMOX1, MAPT* i *TNF* su zajednički geni za PD i AD, dok je *GSTP1* zajednički gen za ALS i PD.

**Tabela 53.** Geni povezani sa neurodegenerativnim bolestima i sa ispitivanim metal(oid)ima toksičnim za životnu sredinu i njihovom smešom (CTD baza podataka (<http://CTD.mdibl.org>) i MyVenn CTD alat (<http://ctdbase.org/tools/miVenn.go>))

	Amiotrofična lateralna skleroza (ALS)	Parkinsonova bolest (PD)	Alchajmerova bolest(AD)
<b>Pb</b>	<i>ATXN2, DPP6, FUS, GFAP, GSR, GSTP1, PON1, PTGS2, SLC1A2, SLC6A1, SOD1, SOD2, SQSTM1, TARDBP, TNFRSF21, TP53</i>	<i>ABCB1, ATP13A2, BDNF, CP, DRD2, FCER2, GFAP, GPXI, GSTA4, GSTM1, GSTP1, HFE, HMOX1, IGF2, IL6, KCNJ4, MAOA, MAPT, MTA1, NQO1, PINK1, RPL23A, RPL6, RPS8, SNCA, SOD1, SOD2, TH, TMEM230, TNF, VPS35</i>	<i>A2M, ACE, ACHE, ADAMTS1, AMFR, APOE, APP, BACE1, BAX, BCL2, BDNF, CALM1, CASP3, CLU, CYP46A1, F2, GSK3B, HFE, HMOX1, IGF1, IGF2, IL1B, LEP, MAPT, MIR146A, NOS3, PPARG, PRNP, PSEN1, SLC30A4, SLC30A6, SOD2, TF, TNF, TPPI, VEGFA, VSNL1</i>
<b>MeHg</b>	<i>ATXN2, GFAP, GSR, GSTP1, PON1, SLC1A2, SOD1, SOD2, SQSTM1, TP53</i>	<i>ABCB1, BDNF, CP, CYP2E1, DDC, DNMI1, FBPI, FGB, GFAP, GPXI, GSTA4, GSTM1, GSTP1, HMOX1, HSPA1A, HSPA9, IL6, INS, MAOB, MAP2, MAP3K5, MAPT, NGF, NOS1, NQO1, OBP99B, PARK7, PRKN, PRM, RPL6, RPS8, SLC18A2, SLC6A3, SNCA, SOD1, SOD2, TALDO1, TH, TNF</i>	<i>ACHE, APP, BAX, BCL2, BDNF, CALM1, CASP3, CST3, F2, HMOX1, IL1B, INS, MAOB, MAPT, NOS3, PGRMC1, PRNP, SOD2, TNF, TPPI, VEGFA</i>
<b>Cd</b>	<i>FUS, GSR, GSTP1, PLA2G4A, PON1, PTGS2, SOD1, SOD2, SQSTM1, TNFRSF21, TP53</i>	<i>ABCB1, ATP13A2, BDNF, CP, CYP2E1, DRD1, DRD2, EDN1, ENO2, GPXI, GSTA4, GSTM1, GSTP1, HGF, HMOX1, HSPA1A, IGF1R, IGF2, IGF2R, IL6, INS, LRRK2, MAOA, MAOB, MAP2, MAPT, MTA1, NCAPG2, NGF, NOS1, NQO1, PINK1, PPARGC1A, PRKN, RPL14, SLC2A14, SOD1, SOD2, TH, TNF</i>	<i>A2M, ACE, ACHE, APOE, APP, ATP5F1A, BACE1, BAX, BCHE, BCL2, BDNF, BIN1, CALM1, CASP3, CLU, CRH, CST3, CTR1B, ENO1, ESR1, F2, GSK3B, HMOX1, IGF1, IGF1R, IGF2, IGF2R, IL1B, INS, MAOB, MAPT, MIR146A, MIR375, NOS3, NPY, PLA2, PPARG, PRNP, PSEN1, SLC30A4, SOD2, TF, TNF, TPPI, VEGFA, VSNL1</i>
<b>As</b>	<i>ATXN2, CD40LG, DPP6, FUS, GFAP, GSR, GSTP1, OPTN, PON1, PTGS2, SOD1, SOD2, SQSTM1, TP53</i>	<i>ABCB1, BDNF, BST1, CEACAM6, CNTNAP2, CYP2E1, DRD2, FCER2, GAK, GDNF, GFAP, GSTA4, GSTM1, GSTP1, HGF, HLA-DRA, HLA-DRB5, HMOX1, HSPA1A, HSPA9, IGF1R, IGF2R, IL6, INSR, MAOA, MAP2, MAPT, MTA1, MTHFR, NGF, NQO1, PPARGC1A, PRKN, SNCA, SOD1, SOD2, TH, TNF, TRPM2</i>	<i>ACHE, ADAM10, ADAMTS1, APOE, APP, BACE1, BAX, BCL2, BDNF, CALM1, CASP3, CD2AP, CST3, CYP46A1, ENO1, EPHA1, ESR1, GSK3B, HLA-DRB5, HMOX1, IGF1, IGF1R, IGF2R, IL1B, INSR, LEP, MAPT, MPO, MTHFR, NOS3, PLA2, PPARG, PSEN1, PYY, SLC30A6, SOD2, TFAM, TNF, TOMM40, TPPI, VEGFA, WWOX</i>
<b>Pb+MeHg+Cd+As</b>	<i>GSR, GSTP1, PON1, SOD1, SOD2, SQSTM1, TP53</i>	<i>ABCB1, BDNF, GSTA4, GSTM1, GSTP1, HMOX1, IL6, MAPT, NQO1, SOD1, SOD2, TH, TNF</i>	<i>ACHE, APP, BAX, BCL2, BDNF, CALM1, CASP3, HMOX1, IL1B, MAPT, NOS3, SOD2, TNF, VEGFA</i>

Promene u ciljnim genima (aktivnosti proteina, ekspresiji iRNK, ekspresiji proteina i vezivanju za protein)

Tačan način interakcije između ispitivanih toksičnih metala i zajedničkih gena za svaku ispitivanu neurodegenerativnu bolest, uključujući aktivnost proteina, ekspresiju mRNK, ekspresiju proteina i vezivanje za proteine, prikazan je u Tabeli 54.

**Tabela 54.** Interakcije između ispitivanih toksičnih metala (Pb, MeHg, Cd, As) i zajedničkih gena povezanih sa selektovanim neurodegenerativnim bolestima

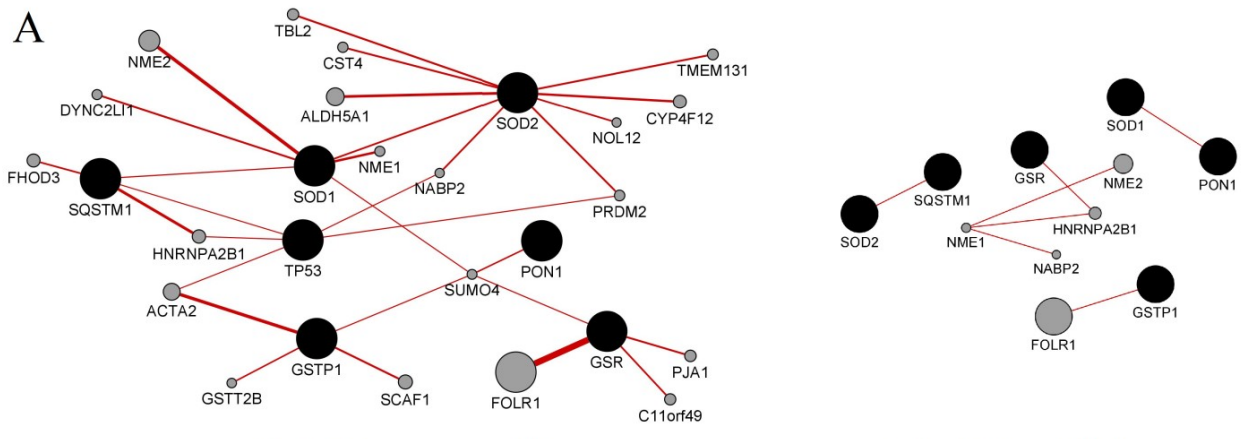
Metal(oid)	Pb			MeHg			Cd			As		
	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNA	Ekspresija proteina	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNA	Ekspresija proteina	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNA	Ekspresija proteina	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNA	Ekspresija proteina
<b>ALS</b>												
GSR	↑↓	↑	NA	↑↓	↑	↑	↑↓	↑	↑↓	↑↓	NA	NA
GSTP1	NA	↑	NA	NA	↑	NA	NA	↑	NA	NA	↑	NA
PON1	↓	NA	NA	↓	NA	NA	↑↓	NA	NA	NA	NA	NA
SOD1	↓	↑	↓	NA	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	NA	↑	↓
<b>SOD2</b>	NA	NA	↑↓	NA	↑↓	↑	↑↓	↑↓	↑↓	NA	↑↓	↓
SQSTM1	NA	NA	↑↓	NA	NA	↓	NA	↑	↓	NA	NA	↑
TP53	NA	↓	↑	NA	NA	↑	↑↓	↑↓	↑	NA	↑↓	↑↓
<b>PD</b>												
ABCB1	NA	↑	↑	NA	↑	NA	NA	NA	↑	NA	NA	NA
BDNF	NA	↓	↓	NA	↑	↑	NA	NA	NA	NA	↓	↓
GSTA4	NA	NA	↓	NA	↑	NA	NA	↑	NA	NA	↓	NA
GSTM1	NA	NA	↓	NA	↓	↓	NA	NA	↑	NA	↑	NA
GSTP1	NA	↑	NA	NA	↑	NA	NA	↑	NA	NA	↑	↑
HMOX1	NA	↑	↓	NA	↑	NA	↑↓	↑	↑	NA	↑	↑
IL6	NA	NA	↑	NA	NA	↑	NA	↑↓	↑	NA	NA	NA
MAPT	NA	NA	NA	NA	↑↓	↓	NA	↓	↓	↑	↑	↑
NQO1	↑	↑↓	↑↓	NA	↑↓	↓	↑	↑	↑	NA	↑	↓
SOD1	NA	↑	↓	NA	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	NA	↑↓	↓
<b>SOD2</b>	NA	NA	↑↓	NA	↑↓	↑	↑↓	↑↓	↑↓	NA	↑↓	↑↓
TH	NA	NA	↓	NA	↓	↓	NA	↑	NA	NA	↓	↑↓
TNF	NA	↑	↑	NA	NA	↑	NA	↑↓	↑	NA	↑	NA
<b>AD</b>												
ACHE	↓	NA	NA	↓	NA	NA	↓	NA	NA	↓	↑	NA
APP	NA	↑	↑	NA	NA	NA	NA	NA	↑	NA	NA	↑
BAX	NA	↑	↑	NA	↑↓	↑↓	NA	↑	↑↓	NA	↑	↑↓
BCL2	NA	↓	↓	NA	↓	↓	NA	↑↓	↑↓	NA	↑	↑
BDNF	NA	↓	↓	NA	↑	↑	NA	NA	NA	NA	↓	↓
CALM1	NA	NA	NA	NA	↑	NA	NA	↓	NA	NA	NA	NA
CASP3	↑	NA	↑	↑	↑	↑	↑	↑↓	↑	↑	↑	NA
HMOX1	NA	↑↓	↓	NA	↑	NA	NA	↑	↑	NA	↑	↑
IL1B	NA	↑↓	↑↓	NA	NA	↑↓	NA	↑↓	↑	NA	↑↓	↑↓
MAPT	NA	NA	NA	NA	↑↓	↓	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NOS3	NA	↓	↑↓	NA	NA	NA	NA	NA	NA	↓	↓	↓
<b>SOD2</b>	NA	NA	↑↓	NA	↑↓	↑	↑↓	↑↓	↑↓	NA	↑↓	↓
TNF	NA	↑↓	↑↓	NA	NA	↑	NA	↑↓	↑	NA	↓	↑↓
VEGFA	NA	NA	NA	NA	↑	↑	NA	↑↓	↑↓	NA	NA	↑

↑ - povećava; ↓ - smanjuje; ↑↓ - povećava i smanjuje; NA – nema informacija

#### Identifikacija vrste interakcija između ciljnih gena

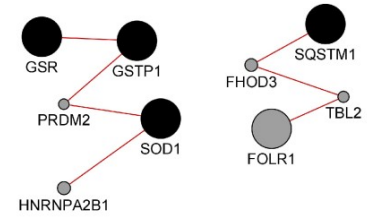
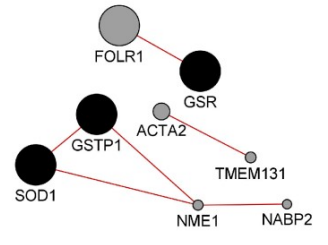
GeneMANIA server za predviđanje je zatim korišćen za ispitivanje vrste interakcija između zajedničkih gena Pb, Cd, Hg i As za ALS, AD i PD, kao i sa 20 srodnih gena (slika 27). Pokazalo se da je većina gena povezanih sa razvojem ALS ostvaruje fizičke interakcije (68,18% interakcija) i kolokalizaciju (23,28% interakcija), dok su koekspresija (8,52% interakcija) i genetske interakcije (0,02% interakcija) bile su manje zastupljene. U slučaju gena povezanih sa razvojem PD, najznačajnija vrsta interakcije bila je koekspresija (60,85% interakcija), dok su sledeće bile fizičke interakcije (20,71% interakcija) i interakcije koje je predvideo server (18,45% interakcija). Većina gena povezanih sa AD je učestvovala u interakcijama koje je predvideo server (44,30% interakcija), fizičkim interakcijama (19,15% interakcija), koekspresiji (16,54% interakcija) i genetskim interakcijama (10,24% interakcija), dok su kolokalizacija (6,22% interakcija), interakcije puteva (3,33% interakcija) i interakcije u zajedničkim proteinskim domenima (0,23% interakcija) bile manje zastupljene.

A



Physical Interactions - 68.18%

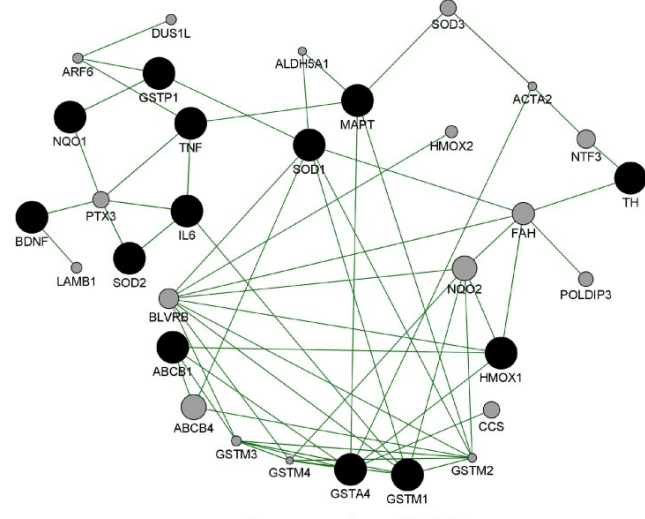
Co-localization - 23.28%



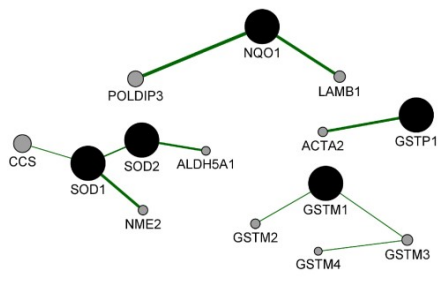
Co-expression - 8.52%

Genetic Interactions - 0.02%

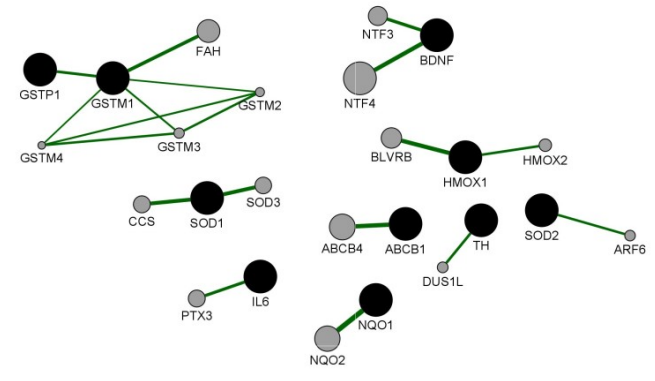
B



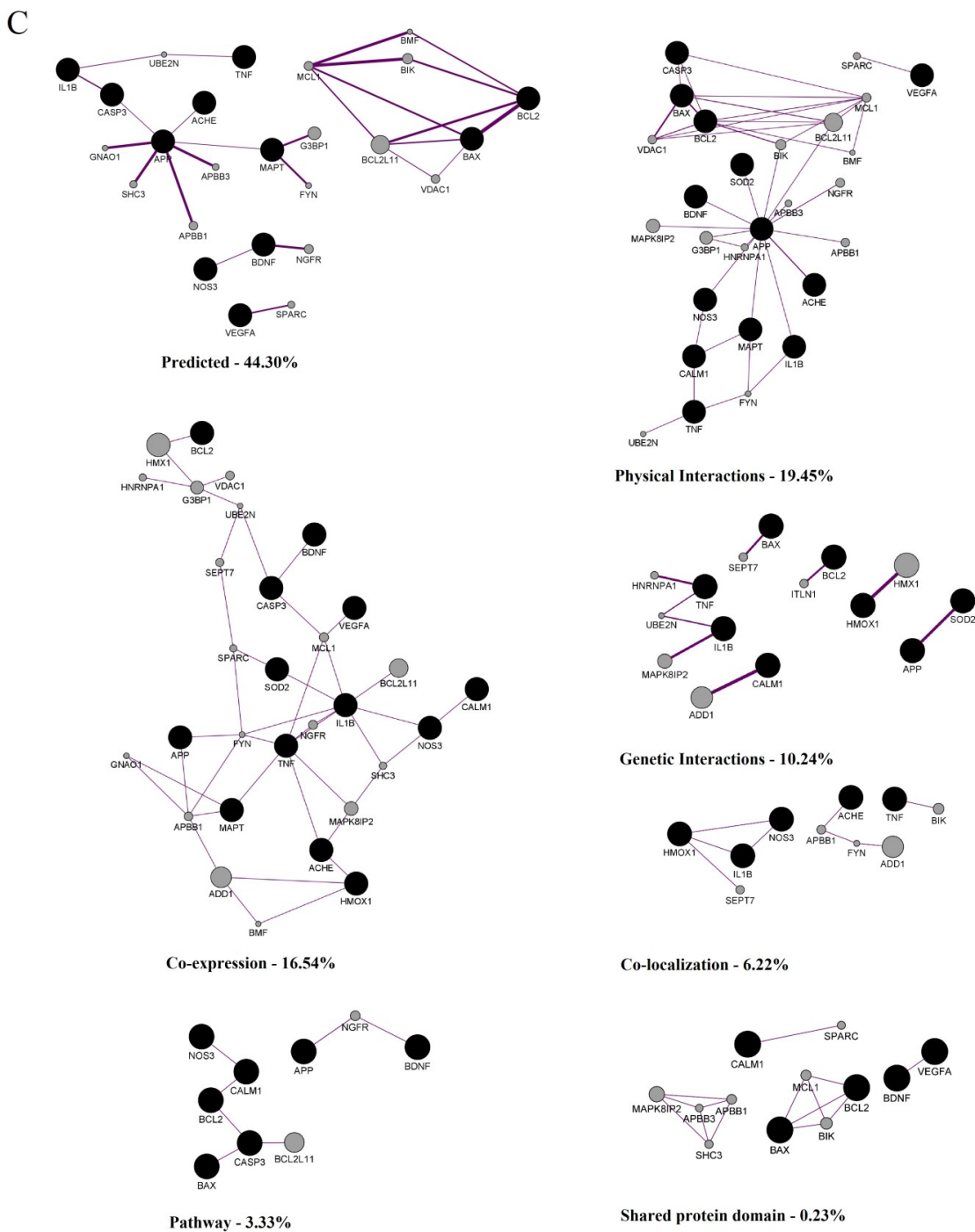
Co-expression - 60.85%



Physical Interactions - 20.71%



Predicted - 18.45%



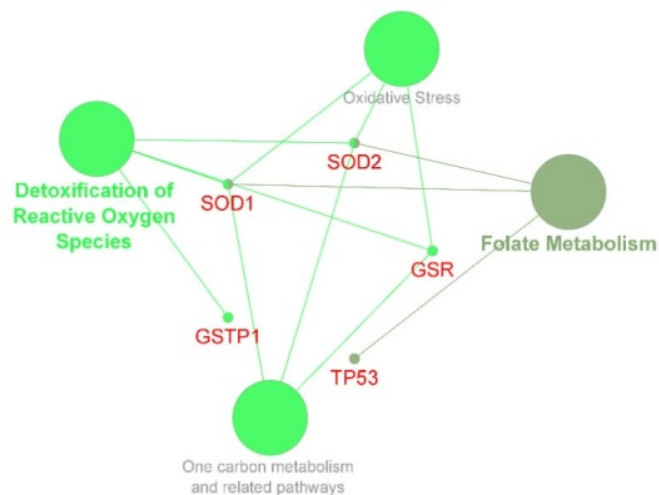
**Slika 27. Interakcije na koje utiče ispitivana smeša toksičnih metal(oid)a (Pb, MeHg, Cd i As), zajedno sa 20 srodnih gena povezanih sa: A – amiotrofičnom lateralnom sklerozom (ALS), B – Parkinsonovom bolešću (PD), C – Alchajmerovom bolešću (AD) (GeneMANIA, <http://geneMANIA.org/plugin/>). Interakcije mogu biti fizičke – dva gena su povezana ako su njihovi proteini u interakciji; koekspresija – dva gena su povezana ako su njihovi nivoi ekspresije slični u svim uslovima u studiji ekspresije gena; genetske interakcije - dva gena su funkcionalno povezana ako je utvrđeno da su efekti poremećaja jednog gena modifikovani perturbacijama drugog gena; kolokalizacija – geni se ekspimiraju u istom tkivu ili se njihovi proteini nalaze u istom tkivu; interakcije signalnih puteva – dva genska proizvoda su povezana ako učestvuju u istoj reakciji u signalnom putu; Zajednički proteinski domeni - kada proizvodi dva gena, odnosno proteini, imaju zajedničke domene; interakcije predviđene pomoću servera (Warde-Farley et al. 2010).**

Identifikacija molekularnih puteva i bioloških procesa povezanih sa genima na koje utiče ispitivana smeša metala

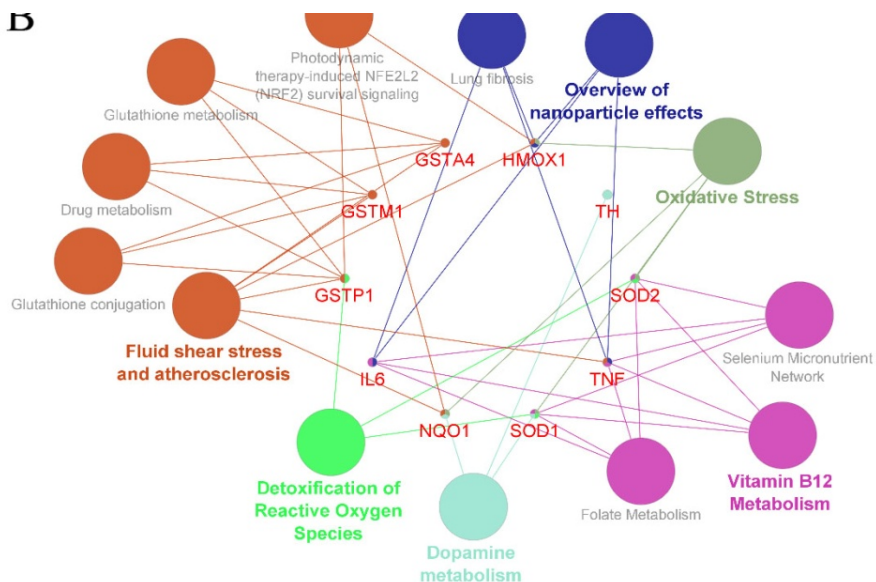
Da bi se istražio biološki značaj istraživanih gena, dalji koraci su bili usmereni na identifikaciju molekularnih puteva i bioloških procesa povezanih sa genima na koje utiče ispitivana smeša metala.

Analiza puteva je izvršena pomoću Cytoscape dodatka ClueGO+CluePedia verzija 2.5.6 i 1.5.6. Za identifikaciju molekularnih puteva odabrane su baze podataka KEGG, Reactome i WikiPathways. Geni povezani sa ispitivanom smešom metala i povezani sa ALS mogu se grupisati u 2 glavna molekularna puta: Detoksikacija reaktivnih vrsta kiseonika i metabolizam folata (slika 27A). Zajednički geni povezani sa Parkinsonovom bolešću grupišu se oko 6 molekularnih puteva: stres smicanja tečnosti i ateroskleroza, detoksikacija reaktivnih vrsta kiseonika, metabolizam dopamina, metabolizam vitamina B12, oksidativni stres, pregled efekata nanočestica (slika 27B). Očekivano, zajednički geni povezani sa Alchajmerovom bolešću grupisani su oko puta koji je povezan sa Alchajmerovom bolešću i signalnim putem AGE-RAGE koji se obično vidi kod dijabetičkih komplikacija (Slika 27C).

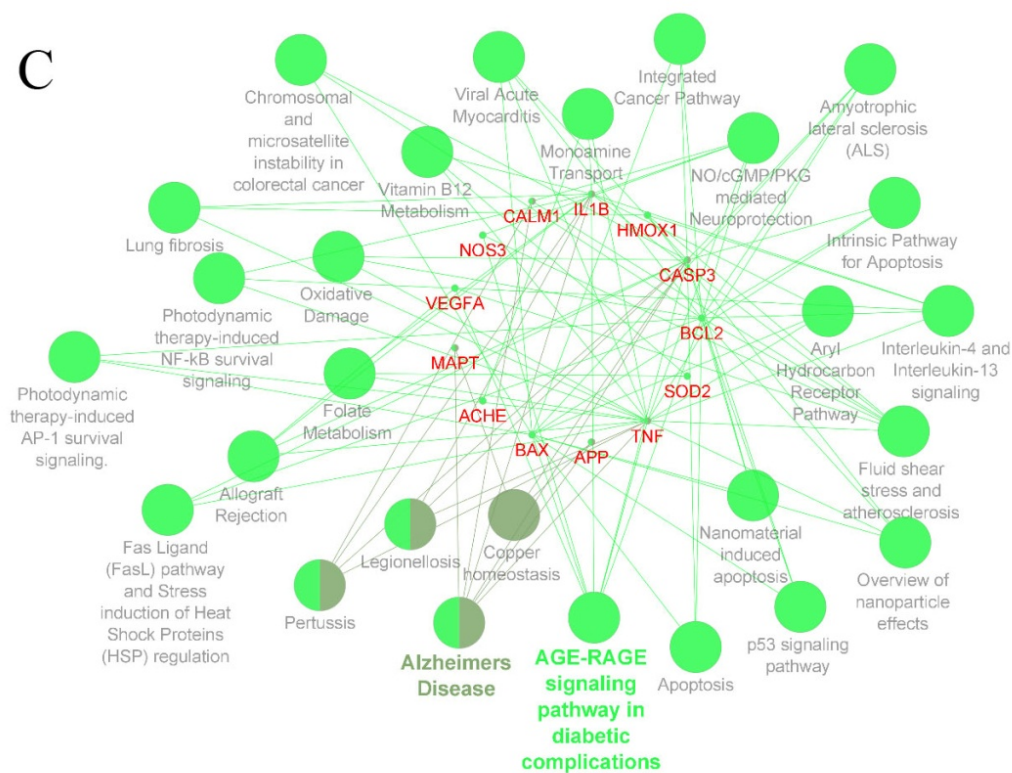
A



B



C



**Slika 27. Molekularni putevi povezani sa ispitivanom smešom toksičnih metal(oid)a i povezani sa neurodegenerativnim oboljenjima:** (A) Amiotrofična lateralna skleroza (ALS): 2 glavna molekularna puta - Detoksifikacija reaktivnih vrsta kiseonika (svetlo zelena) i metabolizam folata (maslinasto zelena) ); (B) Parkinsonova bolest (PD): 6 glavnih molekularnih puteva - stres smicanja tečnosti i ateroskleroza (narandžasta), detoksifikacija reaktivnih vrsta kiseonika (svetlo zelena), metabolizam dopamina (svetlo plava), metabolizam vitamina B12 (ružičasta), oksidativni stres ( maslinasto zelena), Pregled efekata nanočestica (plava) i (C) Alchajmerova bolest (AD): 2 glavna molekularna puta – Alchajmerova bolest (svetlo zelena/maslinasto zelena) i signalni put AGE-RAGE kod dijabetičkih komplikacija (svetlo zelena) (Cytoscape dodatak ClueGO+CluePedia verzija 2.5.6 i 1.5.6).

Analiza ontologije gena sprovedena u okviru ove doktorske disertacije otkrila je najvažnije biološke procese na koje utiče ispitivana smeša toksičnih metal(oid)a i koji su povezani sa razvojem neurodegenerativnih bolesti. Metabolički proces glutationa naveden je kao najvažniji proces koji doprinosi razvoju ALS, ćelijski odgovor na toksičnu supstancu na PD, dok je za AD smrt neurona najznačajniji proces. Najvažnijih 10 bioloških procesa povezanih sa zajedničkim genima za svaku odabranu neurodegenerativnu bolest prikazano je u Tabeli 55, sortirano prema statističkoj značajnosti ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 55.** Biološki procesi povezani sa neurodegenerativnim oboljenjima i sa genima na koje utiče ispitivana smeša toksičnih metal(oid)a (ToppGeneSuite portal (<https://toppgene.cchmc.org>), i njegova ToppFun funkcija (<https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>))

Neurodegenerativna bolest	ID	Naziv	p-vrednost	Geni
Amiotrofična lateralna skleroza (ALS)	GO:0006749	metabolički proces glutationa	2.825E-9	<i>GSTP1, SOD1, GSR, SOD2</i>
	GO:0009636	odgovor na toksičnu supstancu	3.991E-9	<i>PONI, TP53, GSTP1, SOD1, GSR, SOD2</i>
	GO:0097237	ćelijski odgovor na toksičnu supstancu	8.402E-9	<i>TP53, GSTP1, SOD1, GSR, SOD2</i>
	GO:0034599	ćelijski odgovor na oksidativni stres	2.559E-8	<i>TP53, GSTP1, SOD1, GSR, SOD2</i>
	GO:0098869	detoksikacija ćelijskih oksidanata	2.600E-8	<i>GSTP1, SOD1, GSR, SOD2</i>

	GO:1990748	ćelijska detoksikacija	3.730E-8	<i>GSTP1, SOD1, GSR, SOD2</i>
	GO:2000379	pozitivna regulacija metaboličkog procesa reaktivnih vrsta kiseonika	4.417E-8	<i>TP53, GSTP1, SOD1, SOD2</i>
	GO:0098754	detoksikaciju	8.378E-8	<i>GSTP1, SOD1, SOD2, GSR</i>
	GO:0048147	negativna regulacija proliferacije fibroblasta	1.825E-7	<i>TP53, GSTP1, SOD2</i>
	GO:0006979	odgovor na oksidativni stres	1.993E-7	<i>TP53, GSTP1, SOD1, GSR, SOD2</i>
<b>Parkinsonova bolest (PD)</b>	GO:0097237	ćelijski odgovor na toksičnu supstancu	8.052E-15	<i>GSTM1, NQO1, GSTP1, TH, IL6, TNF, SOD1, SOD2, HMOX1</i>
	GO:0000302	odgovor na reaktivne vrste kiseonika	1.041E-12	<i>NQO1, GSTP1, MAPT, IL6, TNF, SOD1, SOD2, HMOX1</i>
	GO:0006801	metabolički proces superoksida	3.958E-12	<i>NQO1, GSTP1, MAPT, TNF, SOD1, SOD2</i>
	GO:0034599	ćelijski odgovor na oksidativni stres	6.593E-12	<i>NQO1, GSTP1, MAPT, IL6, TNF, SOD1, SOD2, HMOX1</i>
	GO:0009636	odgovor na toksičnu supstancu	8.901E-12	<i>GSTM1, NQO1, GSTP1, TH, IL6, TNF, SOD1, SOD2, HMOX1</i>
	GO:1901214	regulacija smrti neurona	2.356E-11	<i>NQO1, MAPT, IL6, BDNF, TNF, SOD1, SOD2, HMOX1</i>
	GO:0070997	smrt neurona	5.094E-11	<i>NQO1, MAPT, IL6, BDNF, TNF, SOD1, SOD2, HMOX1</i>
	GO:1990748	ćelijska detoksikacija	5.594E-11	<i>GSTM1, NQO1, GSTP1, TNF, SOD1, SOD2</i>
	GO:2000379	pozitivna regulacija metaboličkog procesa reaktivnih vrsta kiseonika	7.219E-11	<i>GSTP1, MAPT, IL6, TNF, SOD1, SOD2</i>
	GO:0042493	odgovor na supstancu	1.251E-10	<i>NQO1, GSTP1, TH, IL6, BDNF, TNF, SOD1, SOD2, HMOX1, ABCB1</i>
<b>Alchajmerova bolest (AD)</b>	GO:0070997	smrt neurona	7.520E-19	<i>IL1B, CASP3, BAX, MAPT, ACHE, BDNF, BCL2, TNF, SOD2, HMOX1, VEGFA, APP</i>
	GO:0051402	proces apoptoze neurona	5.353E-16	<i>IL1B, CASP3, BAX, BDNF, BCL2, TNF, SOD2, HMOX1, VEGFA, APP</i>
	GO:1901214	regulacija smrti neurona	6.822E-15	<i>IL1B, CASP3, BAX, MAPT, BDNF, BCL2, TNF, SOD2, HMOX1, VEGFA</i>
	GO:0097190	signalni put apoptoze	1.660E-14	<i>IL1B, CASP3, BAX, MAPT, NOS3, BDNF, BCL2, TNF, SOD2, HMOX1, VEGFA</i>
	GO:2001234	negativna regulacija signalnog puta apoptoze	1.816E-14	<i>IL1B, BAX, NOS3, BDNF, BCL2, TNF, SOD2, HMOX1, VEGFA</i>
	GO:0043523	regulacija procesa apoptoze neurona	2.634E-14	<i>IL1B, CASP3, BAX, BDNF, BCL2, TNF, SOD2, HMOX1, VEGFA</i>
	GO:0009628	odgovor na abiotički stimulus	7.810E-13	<i>CALM1, IL1B, CASP3, BAX, MAPT, NOS3, BCL2, TNF, SOD2, HMOX1, VEGFA, APP</i>
	GO:0097191	ekstrinzični signalni put apoptoze	1.462E-12	<i>IL1B, CASP3, BAX, NOS3, BCL2, TNF, HMOX1, VEGFA</i>
	GO:2001233	regulacija signalnog puta apoptoze	2.879E-12	<i>IL1B, BAX, NOS3, BDNF, BCL2, TNF, SOD2, HMOX1, VEGFA</i>
	GO:0010648	negativna regulacija ćelijske komunikacije	5.997E-12	<i>CALM1, IL1B, BAX, MAPT, ACHE, NOS3, BDNF, BCL2, TNF, SOD2, HMOX1, VEGFA</i>

## 4.2. Ispitivanje protektivnog dejstva probiotika

### 4.2.1. *In vitro* rezultati uticaja probiotika na smanjenje koncentracije metal(oid)a

Koncentracije ispitivanih metal(oid)a pre i nakon inkubiranja pojedinačnih rastvora Pb, Cd, Hg i As sa multikomponentnim i monokomponentnim probiotikom prikazane su u Tabeli 56. Uočeno je da je svaki ispitivani metal(oid) bio značajno smanjen nakon perioda inkubiranja njihovih rastvora i sa multikomponentnim probiotikom i sa monokomponentnim probiotikom. U *in vitro* uslovima monokomponentni probiotik efikasniji u smanjenju koncentracija Cd i As, dok je dejstvo mono- i multikomponentnog probiotika veoma slično u smanjenju koncentracije Pb i Hg.

**Tabela 56.** Koncentracije ispitivanih metal(oid)a pre i nakon inkubiranja rastvora pojedinačnih metal(oid)a sa multikomponentnim (P) i monokomponentnim probiotikom (SB)

Prikaz vrednosti ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>Pb</b>	<b>Pb + P</b>	<b>Pb + SB</b>
Srednja vrednost	1179	5,517****	6,700****
SD	212,6	3,629	0,7204
% u odnosu na Pb		-99,532	-99,432
	<b>Cd</b>	<b>Cd + P</b>	<b>Cd + SB</b>
Srednja vrednost	3135	2203*	1420***#
SD	444,7	157,2	143,3
% u odnosu na Cd		-29,729	-54,705
	<b>Hg</b>	<b>Hg + P</b>	<b>Hg + SB</b>
Srednja vrednost	54,24	7,399****	4,581****
SD	2,481	0,8633	3,961
% u odnosu na Hg		-86,359	-91,554
	<b>As</b>	<b>As + P</b>	<b>As + SB</b>
Srednja vrednost	583,6	239,3**	131,7***
SD	104,4	24,95	48,34
% u odnosu na As		-58,996	-77,433

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). Koncentracije metal(oid)a: Pb: 1 mg/mL; Cd: 3 mg/mL; Hg: 0,06 mg/mL; As: 0,6 mg/mL. P: multikomponentni probiotik ( $8,5 \times 10^9$  CFU/kg/dan: *Saccharomysces cerevisiae* var. *bouardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5 \times 10^9$  CFU/kg/dan *Saccharomysces cerevisiae* var. *bouardii*). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 (u poređenju sa rastvorima pojedinačnih metal(oid)a: Pb, Cd, Hg, As); #p < 0.05 (u poređenju sa rastvorom Cd + P).

Koncentracije ispitivanih metal(oid)a pre i nakon inkubiranja rastvora smeše metal(oid)a (MIX 5: Pb+Cd+Hg+As) sa multikomponentnim i monokomponentnim probiotikom prikazane su u Tabeli 57. Uočeno je da je koncentracija svakog ispitivanog metal(oid)a bila smanjena nakon perioda inkubiranja rastvora smeše najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnog probiotika, kao i rastvora smeše najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnog probiotika. U *in vitro* uslovima monokomponentni probiotik bio je efikasniji u vezivanju svih ispitivanih metal(oid)a iz smeše, sa statističkom značajnošću u slučaju Pb, Cd i As. Multikomponentni probiotik značajno je smanjio nivo Pb u poređenju sa rastvorom smeše najviših ispitivanih doza metal(oid)a.

**Tabela 57.** Koncentracije ispitivanih metal(oid)a pre i nakon inkubiranja rastvora smeše metal(oid)a (MIX 5) sa multikomponentnim (P) i monokomponentnim probiotikom (SB)

Prikaz vrednosti ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>Pb (MIX 5)</b>	<b>Pb + P (MIX 5)</b>	<b>Pb + SB (MIX 5)</b>
Srednja vrednost	1113	16,04****	12,33****
SD	177,2	4,433	2,510

% u odnosu na Pb (MIX 5)		-98,5588	-98,8922
	<b>Cd (MIX 5)</b>	<b>Cd + P (MIX 5)</b>	<b>Cd + SB (MIX 5)</b>
Srednja vrednost	3405	2593	1470*
SD	483,6	701,6	349,3
% u odnosu na Cd (MIX 5)		-23,8473	-56,8282
	<b>Hg (MIX 5)</b>	<b>Hg + P (MIX 5)</b>	<b>Hg + SB (MIX 5)</b>
Medijana	50,38	0,1702	0,04543
Opseg	(50,29-50,47)	(0,0713-0,2691)	(0,09087-0,09087)
% u odnosu na Hg (MIX 5)		-99,6622	-99,9098
	<b>As (MIX 5)</b>	<b>As + P (MIX 5)</b>	<b>As + SB (MIX 5)</b>
Medijana	560,4	92,96	51,70*
Opseg	(445,6-579,6)	(57,35-96,2)	(44,74-51,7)
% u odnosu na As (MIX 5)		-83,4118	-90,7744

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (Pb: 1 mg/mL + Cd: 3 mg/mL + Hg: 0,06 mg/mL + As: 0,6 mg/mL). P: multikomponentni probiotik ( $8,5 \times 10^9$  CFU/kg/dan: *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5 \times 10^9$  CFU/kg/dan *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii*). \*p < 0.05, \*\*\*\* p < 0.0001 (u poređenju sa koncentracijama pojedinačnih metal(oid)a u rastvoru MIX5: Pb (MIX 5), Cd (MIX 5), Hg (MIX 5), As (MIX 5)).

#### 4.2.2. *In vivo* rezultati uticaja probiotika na smanjenje toksičnosti metal(oid)a

##### 4.2.2.1. Promene u ponašanju, unosu hrane i vode

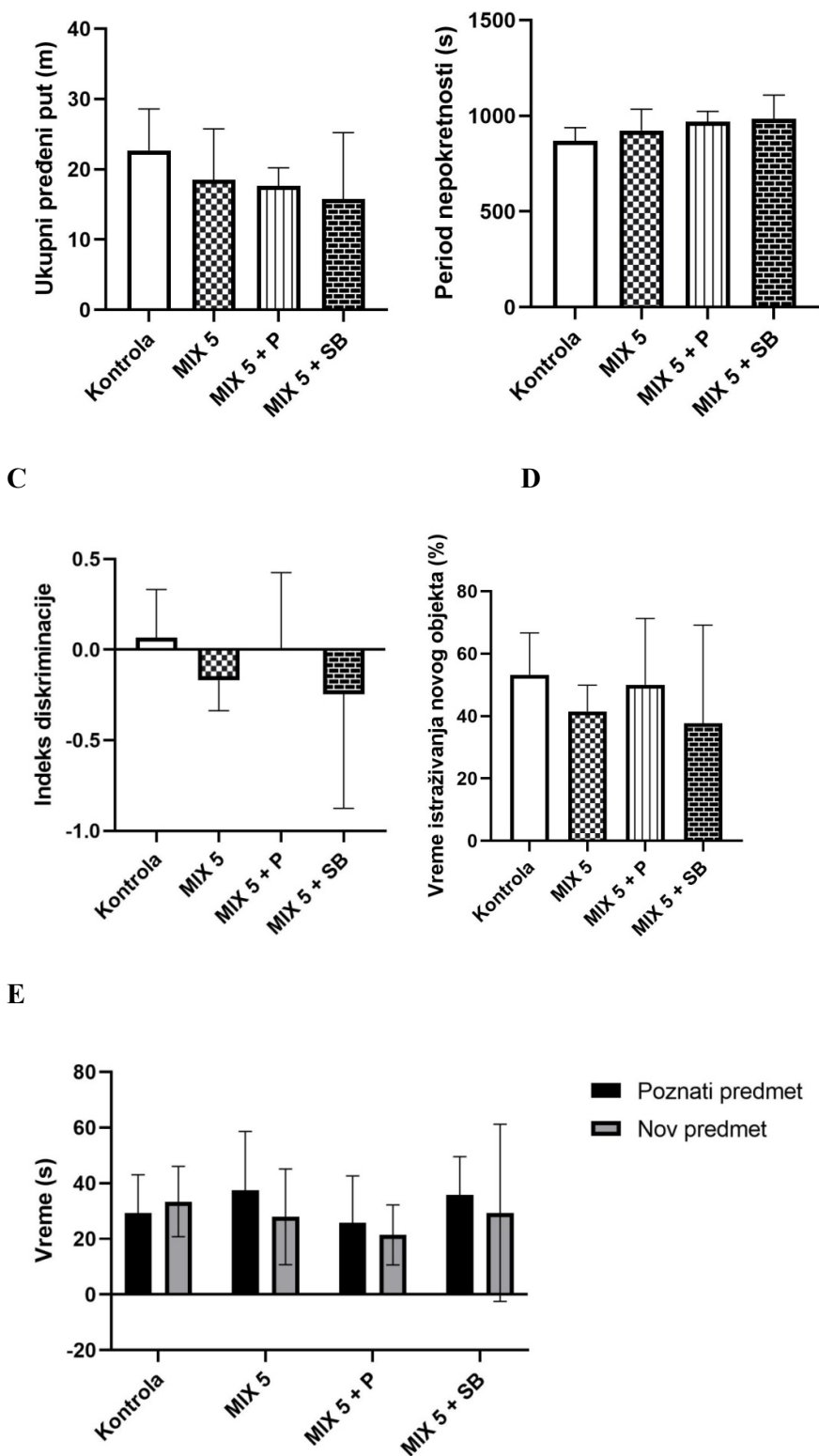
Analiza SLA testa nije pokazala značajne izmene u dužini pređenog puta i trajanju perioda nepokretnosti, ali je uočeno blago smanjenje dužine pređenog puta i blago produženje perioda nepokretnosti u svim tretiranim grupama (slika 28 A, slika 28 B).

Negativne vrednosti indeksa diskriminacije i najmanji procenat vremena provedenog u istraživanju novog predmeta u NORT testu uočeni su u MIX 5 i MIX 5 + SB grupi (slika 28 C, slika 28 D).

Životinje u svim tretiranim grupama provele su više vremena istražujući poznati predmet u poređenju sa vremenom provedenim u istraživanju novog predmeta, ali ta razlika nije bila statistički značajna (slika 28 E).

A

B



**Slika 28. Efekti subakutnog (28-dnevnog) oralnog izlaganja pacova najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB) na ponašanje.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD), slika 28A, 28B, 28C, 28D/ t-test za uparene uzorke, slika 28E). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik

( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii*). Spontana lokomotorna aktivnost: ukupni pređeni put (slika 28A) i period nepokretnosti (slika 28B); posmatranje svake životinje trajalo je dvadeset minuta. Test istraživanja poznatog i novog predmeta (NORT test): indeks diskriminacije (slika 28C); trajanje posmatranja svake životinje je pet minuta. Vreme istraživanja novog objekta (%; NORT test) (slika 28D); trajanje posmatranja svake životinje je bilo pet minuta. Vreme utrošeno na istraživanje poznatih i novih objekata nakon 1 sata (NORT test) (slika 28E).

Nije bilo statistički značajnih promena u unosu vode i hrane između ispitivanih grupa i kontrole, osim u unosu hrane nakon treće nedelje tretmana u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi, gde je uočeno smanjenje u poređenju sa kontrolom. Takođe, nakon četvrte nedelje uočeno je statistički značajno smanjenje unosa hrane u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolom, dok je to smanjenje anulirano u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi.

Iako nije bilo statistički značajnih promena u unosu vode u četiri ispitivana vremenska perioda, nakon četvrte nedelje uočeno je blago smanjenje unosa vode u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolom, dok je to smanjenje anulirano u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi.

#### 4.2.2.2. Prirast telesne mase i relativna masa organa

Prirast mase u četiri vremenska perioda kod eksperimentalnih životinja izloženih izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnog probiotika i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnog probiotika tokom 28 dana prikazan je u Tabeli 58.

U poređenju sa kontrolnom grupom, statistički značajno smanjenje prirasta mase uočeno je u MIX 5 grupi nakon prve, druge i četvrte nedelje izloženosti, dok je nakon treće nedelje uočeno blago smanjenje u MIX 5 grupi. Smanjenje prirasta mase anulirano je u MIX 5 + P grupi nakon prve, druge i četvrte nedelje, dok je u MIX 5 + SB smanjenje prirasta mase anulirano nakon druge nedelje.

**Tabela 58.** Prirast telesne mase kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

Prirast mase		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
<b>7. dan</b>	Srednja vrednost	0,3746	0,2320**	0,3301	0,2594*
	SD	0,06266	0,07668	0,02699	0,05131
<b>14. dan</b>	Srednja vrednost	0,6929	0,4080**	0,5649	0,5077
	SD	0,1046	0,1042	0,1347	0,1001
<b>21. dan</b>	Srednja vrednost	0,8074	0,5890	0,7779	0,6723
	SD	0,2827	0,1351	0,1515	0,09646
<b>28. dan</b>	Srednja vrednost	1,062	0,5552***	0,8678#	0,7746*
	SD	0,2062	0,08246	0,1495	0,1038

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii*). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 (u poređenju sa kontrolom); #p < 0.05 (u poređenju sa MIX 5).

Relativne mase organa kod pacova izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su u Tabeli 59.

Uočeno je da je relativna masa jetre značajno smanjena u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolom, dok je taj efekat anuliran u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi. Interesantno, uočeno je značajno povećanje relativne mase mozga u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi u poređenju sa kontrolom. Takođe, uočeno je značajno povećanje relativne mase testisa u MIX 5 i MIX 5 + P grupi u poređenju sa kontrolom, dok je to povećanje anulirano u MIX 5 + SB grupi.

**Tabela 59.** Relativne mase organa kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

Relativna masa organa		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
<b>Jetra</b>	Srednja vrednost	3,723	2,903**	3,640##	3,758##
	SD	0,2228	0,2511	0,2245	0,4166
<b>Bubrezi</b>	Srednja vrednost	0,6218	0,5907	0,6301	0,6296
	SD	0,03452	0,04803	0,03938	0,05132
<b>Mozak</b>	Srednja vrednost	0,4470	0,4940	0,5424**	0,5337**
	SD	0,009327	0,05808	0,03852	0,02360
<b>Srce</b>	Medijana	0,2809	0,3013	0,2976	0,3217
	Opseg	(0,2567-0,3535)	(0,2896-0,3182)	(0,2816-0,3501)	(0,2984-0,33)
<b>Pluća</b>	Medijana	0,4356	0,4613	0,5099	0,4583
	Opseg	(0,4226-0,4867)	(0,3822-0,7063)	(0,4482-0,5477)	(0,4108-0,5767)
<b>Pankreas</b>	Srednja vrednost	0,3641	0,2998	0,3002	0,3450
	SD	0,09712	0,09058	0,07845	0,1155
<b>Slezina</b>	Srednja vrednost	0,1766	0,1500	0,1854#	0,1763
	SD	0,01134	0,01198	0,02281	0,01638
<b>Testisi</b>	Srednja vrednost	0,6682	0,8262*	0,8200*	0,7875
	SD	0,08768	0,05430	0,08842	0,03739
<b>Femur</b>	Srednja vrednost	0,2444	0,2735	0,2806	0,2780
	SD	0,01301	0,02839	0,04141	0,006163

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal-Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (u poređenju sa kontrolom); #p < 0.05, ##p < 0.01 (u poređenju sa MIX 5).

#### 4.2.2.3. Nivoi ispitivanih metal(oid)a u krvi i tkivima

Nivoi ispitivanih metal(oid)a u krvi i tkivima eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših primenjenih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i višekomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom porobiotiku prikazani su u Tabeli 60.

U poređenju sa kontrolnom grupom, nivoi Pb u krvi bili su povećani u svim tretiranim grupama, nivoi Cd u krvi bili su povećani u MIX 5 i MIX 5 + P, a nivoi As bili su značajno povećani jedino u MIX 5 grupi. Nivo Hg u krvi bio je najveći u MIX 5 grupi. Nivoi Cd, Hg i As u krvi bili su smanjeni u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupama. Značajnije smanjenje Cd u krvi uočeno je u MIX 5 + SB grupi, dok je značajnije smanjenje nivoa Hg u krvi uočeno u MIX 5 +P u poređenju sa MIX 5 grupom. Nivoi Pb u krvi bili su blago smanjeni u MIX 5 +P i MIX 5 + SB, ali su ti nivoi i dalje bili značajno viši od kontrolnih.

Uočeno je značajno povećanje Cd u tkivu jetre u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolom koje je anulirano u MIX 5 + P grupi, ali ne i u MIX 5 + SB grupi. Takođe, uočeno i povećanje nivoa As tkivu jetre u MIX 5, MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi. U poređenju sa kontrolnom grupom, nivoi Pb i Hg u tkivu jetre bili su blago povećani u MIX 5 grupi. Nivoi ovih metala u tkivu jetre bili su smanjeni u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi, a u MIX 5 + P čak ispod nivoa kontrolne grupe.

U poređenju sa kontrolnom grupom, nivoi Pb, Cd, Hg i As u tkivu bubrega bili su povećani u svim tretiranim grupama. Nivoi svih ispitivanih metala bili su smanjeni u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi u poređenju sa MIX 5 grupom, ali je samo povećanje nivoa Pb bilo anulirano u MIX 5 + SB grupi.

U poređenju sa kontrolnom grupom, nivoi Cd i As u tkivu mozga bili su značajno povećani u svim tretiranim grupama.

Nivoi svih ispitivanih metal(oid)a u tkivu srca bili su ispod limita kvantifikacije u MIX 5 + SB grupi, dok su nivoi Hg u tkivu srca bili ispod limita kvantifikacije u svim grupama.

U poređenju sa kontrolnom grupom, nivoi Cd i As u tkivu pluća bili su značajno povećani jedino u MIX 5 grupi, dok je povećanje nivoa ovih elemenata bilo anulirano u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi.

U tkivu pankreasa nije bilo značajnih razlika pri poređenju grupa, osim u nivou Cd koji je bio značajno povećan u MIX 5 + SB grupi u poređenju sa kontrolnom grupom.

U tkivu slezine As je detektovan u svim tretiranim grupama (MIX 5 : 0,6098 µg/g, MIX 5 + P : 0,1488 µg/g, 0,4082 µg/g), ali ne i u kontrolnoj grupi. Ostali metali bili su ispod nivoa limita kvantifikacije. Vrednost As bila je najviša u As grupi, dok je u MIX 5 + P i MIX 5 + SB bila smanjena u poređenju sa MIX 5.

U tkivu testisa Cd je detektovan u svim tretiranim grupama (MIX 5 : 0,2221 µg/g, MIX 5 + P : 0,1107 µg/g, 0,1374 µg/g), ali ne i u kontrolnoj grupi. Ostali metali bili su ispod nivoa limita kvantifikacije. Vrednost Cd bila je najviša u Cd grupi, dok je u MIX 5 + P i MIX 5 + SB bila smanjena u poređenju sa MIX 5.

U poređenju sa kontrolnom grupom, nivoi Pb, Cd i As u tkivu femura bili su povećani u svim tretiranim grupama. Nivoi ovih metala bili su smanjeni u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi u poređenju sa MIX 5 grupom, ali je povećanje nivoa Pb bilo anulirano u MIX 5 +P grupi, kao i

povećanje nivoa As u MIX 5 + P i MIX 5 + SB. U tkivu femura Hg je detektovana jedino u MIX 5 grupi, dok je u ostalim grupama nivo Hg bio ispod limita kvantifikacije.

**Tabela 60.** Nivoi ispitivanih metal(oid)a u krvi i tkivima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

Izmereni metal(oid)i (µg/mL)		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
<b>Krv</b>					
<b>Pb</b>	Srednja vrednost	0,03915	0,08886**	0,07468*	0,08638*
	SD	0,01268	0,02454	0,03051	0,01559
<b>Cd</b>	Medijana	0,008500	0,08480***	0,02930*	0,02270
	Opseg	(0,0072-0,0098)	(0,0608-0,1248)	(0,0167-0,0348)	(0,01715-0,0321)
<b>Hg</b>	Medijana	0,01135	0,03570	0,001500##	0,005250
	Opseg	(0,00765-0,014)	(0,0191-0,03835)	(0,0013-0,0084)	(0,004075-0,03298)
<b>As</b>	Medijana	0,002050	3,985***	0,005600#	0,005400#
	Opseg	(0,00145-0,0043)	(2,435-5,429)	(0,0046-0,0144)	(0,0035-0,0234)
Izmereni metal(oid)i (µg/g)		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
<b>Jetra</b>					
<b>Pb</b>	Medijana	0,1621	0,2203	0,1530	0,1673
	Opseg	(0,1291-0,1951)	(0,174-0,3243)	(0,1418-0,2042)	(0,1272-0,3359)
<b>Cd</b>	Medijana	0,05487	9,235***	6,488	6,839*#
	Opseg	(0,04335-0,06529)	(8,37-13,23)	(4,907-7,129)	(5,897-8,61)
<b>Hg</b>	Medijana	0,01728	0,07832	0,0002340##	0,03897
	Opseg	(0,01645-0,02209)	(0,03188-0,09673)	(0,0002035-0,002123)	(0,0000733-0,0391)
<b>As</b>	Srednja vrednost	0,05092	0,1498***	0,1221**	0,1365**
	SD	0,008347	0,01879	0,02478	0,05309
<b>Bubrezi</b>					
<b>Pb</b>	Medijana	0,01698	0,7348**	0,6283**	0,4451
	Opseg	(0,01622-0,02217)	(0,5751-1,028)	(0,6003-1,085)	(0,3666-0,6817)
<b>Cd</b>	Medijana	0,01013	5,372***	4,874*	5,248**

	Opseg	(0,008116-0,0407)	(5,108-6,919)	(4,214-5,372)	(4,848-5,706)
<b>Hg</b>	Srednja vrednost	0,04305	2,157***	1,121*#	1,591**
	SD	0,03140	0,8627	0,6780	0,7324
<b>As</b>	Srednja vrednost	0,08852	0,2037***	0,1666**	0,1521*#
	SD	0,02768	0,05283	0,02888	0,02014
<b>Mozak</b>					
<b>Pb</b>	Medijana	0,04043	0,07186	0,04437	0,07098
	Opseg	(0,03633-0,069)	(0,05-0,1359)	(0,03772-0,04939)	(0,05853-0,09067)
<b>Cd</b>	Srednja vrednost	0,002134	0,01935***	0,01903***	0,02124***
	SD	0,0008414	0,006318	0,003598	0,005066
<b>Hg</b>	Medijana	0,01159	0,02260	0,01138	0,01044
	Opseg	(0,008048-0,01276)	(0,009483-0,04326)	(0,00446-0,02713)	(0,007153-0,2738)
<b>As</b>	Srednja vrednost	0,01371	0,04250****	0,03453***	0,03763***
	SD	0,003514	0,007440	0,008555	0,009257
<b>Srce</b>					
<b>Pb</b>	Medijana	0,3117	0,3430	0,3674	NA
	Opseg	(0,301-0,4734)	(0,2581-0,7049)	(0,2623-0,7799)	NA
<b>Cd</b>	Medijana	0,05810	0,1331	0,2381	NA
	Opseg	(0,03223-0,06229)	(0,1099-0,476)	(0,08751-0,2831)	NA
<b>As</b>	Medijana	0,09326	0,2659	0,3024	NA
	Opseg	(0,02027-0,1662)	(0,1684-0,3078)	(0,179-0,6086)	NA
<b>Pluča</b>					
<b>Pb</b>	Medijana	0,1713	0,1813	0,1334#	0,2091+
	Opseg	(0,1525-0,1901)	(0,16-0,287)	(0,1193-0,1402)	(0,1661-0,2792)
<b>Cd</b>	Medijana	0,06064	0,4364*	0,3480	0,2975
	Opseg	(0,03824-0,06795)	(0,3133-0,8617)	(0,2444-0,9074)	(0,235-0,8612)
<b>Hg</b>	Srednja	0,04766	0,02859	0,03500	0,02671

	vrednost				
	SD	0,01112	0,02447	0,03270	0,02334
<b>As</b>	Srednja vrednost	0,1696	0,4284*	0,3868	0,2844
	SD	0,08348	0,1501	0,1676	0,09225
<b>Pankreas</b>					
<b>Pb</b>	Medijana	0,4625	0,4931	0,4960	0,5364
	Opseg	(0,3219-0,5322)	(0,351-0,7265)	(0,4526-0,8337)	(0,4064-0,6811)
<b>Cd</b>	Medijana	0,1414	0,9778	0,9825	2,244*
	Opseg	(0,03078-0,2029)	(0,3123-2,497)	(0,6404-1,979)	(0,9068-2,654)
<b>As</b>	Medijana	0,01066	0,06210	NA	NA
	Opseg	(0,003703-0,1049)	(0,03839-0,08581)	NA	NA
<b>Femur</b>					
<b>Pb</b>	Medijana	0,1779	1,420***	1,023	1,388**
	Opseg	(0,1736-0,2118)	(1,289-2,219)	(0,8674-1,392)	(1,278-1,468)
<b>Cd</b>	Srednja vrednost	0,07584	0,3244****	0,2663**	0,2678***
	SD	0,03140	0,1150	0,07850	0,04857
<b>Hg</b>	Srednja vrednost	NA	0,3045	NA	NA
	SD	NA	0,2944	NA	NA
<b>As</b>	Srednja vrednost	0,05656	0,1262*	0,06817	0,1198
	SD	0,05870	0,04611	0,05628	0,04417

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomices cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomices cerevisiae* var. *boulardii*). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  (u poređenju sa kontrolom); # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  (u poređenju sa MIX 5); \* $p < 0,05$  (u poređenju sa MIX 5 + P). NA- ispod limita kvantifikacije (LOQ: 0,00002  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 4.2.2.4. Hematološki parametri

Hematološki parametri izmereni kod eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su u Tabeli 61. Povećan broj leukocita, apsolutnog broj

limfocita, apsolutnog broja neutrofila, monocita i apsolutnog broja monocita primećen je u MIX 5 + P grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Apsolutni broj eritrocita u u MIX 5 grupi bio je statistički značajni smanjen u odnosu na kontrolnu grupu, dok je u MIX 5 + P i MIX 5 + SB bio povećan i u poređenju sa kontrolnom grupom i u poređenju sa MIX 5. Uočeno je i značajno smanjenje hemoglobin i hematokrita u odnosu na kontrolnu grupu, dok su njihove vrednosti u MIX 5 + P i MIX 5 + SB bile više i od kontrolnih (bez statističke značajnosti) sa izraženijim efektom MIX 5 + P. MCV vrednost bila je značajno smanjena, dok je vrednost MCHC bila značajno povećana u grupi MIX 5 u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti MCH su značajno niže u grupama MIX 5 + P i MIX 5 + SB u poređenju sa kontrolnom grupom. Primećeno je da je broj trombocita značajno povećan u grupi MIX 5 u poređenju sa kontrolnom grupom, dok u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupama nije bilo značajne razlike, iako su vrednosti bile više od kontrolnih.

**Tabela 61.** Hematološki parametri kod pacova nakon subakutnog (28-dnevnog) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB).

Parametar	Prikaz rezultata	Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
<b>Leukociti [10<sup>9</sup>/l]</b>	Srednja vrednost	3,400	5,520	6,840*	6,000
	SD	1,643	2,184	1,633	2,970
	% u odnosu na kontrolu		62,353	101,176	76,471
<b>Limfociti [%]</b>	Srednja vrednost	82,76	81,10	78,36	80,10
	SD	3,503	4,528	5,954	3,564
	% u odnosu na kontrolu		-2,006	-5,317	-3,214
<b>Monociti [%]</b>	Srednja vrednost	2,420	2,080	4,380**###	2,560 <sup>++</sup>
	SD	0,6573	1,071	0,6458	0,9263
	% u odnosu na kontrolu		-14,050	80,992	5,785
<b>Neutrofili [%]</b>	Srednja vrednost	9,420	10,66	9,820	10,28
	SD	2,253	3,066	3,826	1,418
	% u odnosu na kontrolu		13,163	4,246	9,130
<b>Eozinofili [%]</b>	Medijana	0,2000	0,1000	0,1000	0,1000
	Opseg	0,1000-0,4000	0,1000-0,2000	0,1000-0,6000	0,1000-0,2000
	% u odnosu na kontrolu		-50,000	-50,000	-50,000

<b>Bazofili [%]</b>	Srednja vrednost	5,160	6,020	7,140	6,920
	SD	1,057	1,773	2,409	1,512
	% u odnosu na kontrolu		16,667	38,372	34,109
<b>Limfociti aps. [10<sup>9</sup>/l]</b>	Srednja vrednost	2,838	4,488	5,362*	4,872
	SD	1,398	1,806	1,304	2,588
	% u odnosu na kontrolu		58,140	88,936	71,670
<b>Monociti aps. [10<sup>9</sup>/l]</b>	Srednja vrednost	0,0840	0,1100	0,3020****###	0,1460 <sup>+++</sup>
	SD	0,04722	0,05099	0,08289	0,05771
	% u odnosu na kontrolu		30,952	259,524	73,810
<b>Neutrofili aps. [10<sup>9</sup>/l]</b>	Srednja vrednost	0,3040	0,5880	0,6720*	0,5940
	SD	0,1369	0,3114	0,3199	0,2415
	% u odnosu na kontrolu		93,421	121,053	95,395
<b>Eozinofili aps. [10<sup>9</sup>/l]</b>	Medijana	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
	Opseg	0,0-0,0100	0,0050-0,0100	0,0100-0,0400	0,0050-0,0150
	% u odnosu na kontrolu		0,000	0,000	0,000
<b>Bazofili aps. [10<sup>9</sup>/l]</b>	Srednja vrednost	0,1698	0,3242	0,4892	0,3820
	SD	0,08878	0,1401	0,2163	0,1053
	% u odnosu na kontrolu		90,931	188,104	124,971
<b>Eritrociti aps. (RBC) [10<sup>12</sup>/l]</b>	Srednja vrednost	10,83	7,104*	16,44**####	14,34*###
	SD	0,7027	1,597	3,633	2,700
	% u odnosu na kontrolu		-34,404	51,801	32,410
<b>Hemoglobin (Hb) [g/l]</b>	Srednja vrednost	224,8	122,4***	276,0####	244,0###
	SD	9,121	27,25	57,43	48,31
	% u		-45,552	22,776	8,541

	odnosu na kontrolu				
<b>Hematokrit (HCT) [l/l]</b>	Srednja vrednost	0,6636	0,3512***	0,8236####	0,7240###
	SD	0,03005	0,08281	0,1801	0,1424
	% u odnosu na kontrolu		-47,077	24,111	9,102
<b>MCV [fl]</b>	Medijana	61,20	48,80**	50,00	49,70
	Opseg	58,60-64,40	48,20-50,75	49,00-51,25	48,80-52,35
	% u odnosu na kontrolu		-20,261	-18,301	-18,791
<b>MCH [pg]</b>	Medijana	20,90	17,10	16,80*	16,60*
	Opseg	19,70-21,85	16,75-17,85	16,20-17,45	16,40-17,75
	% u odnosu na kontrolu		-18,182	-19,617	-20,574
<b>MCHC [g/dl]</b>	Srednja vrednost	338,6	349,8**	335,8####	337,2##
	SD	3,435	7,050	5,215	3,564
	% u odnosu na kontrolu		3,308	-0,827	-0,413
<b>Trombociti [10<sup>9</sup>/l]</b>	Srednja vrednost	475,6	772,8**	520,0 <sup>#</sup>	656,6
	SD	115,7	121,4	184,5	128,6
	% u odnosu na kontrolu		62,489	9,336	38,057

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii*). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001 (u poređenju sa kontrolom); <sup>#</sup>p < 0.05, <sup>##</sup>p < 0.01, <sup>###</sup>p < 0.001, <sup>####</sup>p < 0.0001 (u poređenju sa MIX 5); <sup>++</sup>p < 0.01, <sup>+++</sup>p < 0.001 (u poređenju sa MIX 5 + P).

#### 4.2.2.5. Biohemijski parametri

Biohemijski parametri izmereni kod eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su u Tabeli 62.

Uočeno je blago povećanje nivoa CRP u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, dok su grupe MIX 5 + P i MIX 5 + SB smanjile ovaj nivo čak ispod vrednosti kontrolne grupe, pri čemu je efekat bio izraženiji u MIX 5 + P grupi.

Sličan scenario uočen je i pri praćenju promena u vrednostima glukoze, gde je povećanje nivoa uočeno u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, dok su grupe MIX 5 + P i MIX 5 + SB smanjile ovaj nivo, MIX 5 + P čak ispod vrednosti kontrolne grupe.

Nivo ukupnog holesterola i HDL značajno je bio smanjen u MIX 5 + P grupi u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe.

Nivo LDL blago je bio povišen u MIX 5 grupi, dok je MIX 5 + P bio bliži kontrolnim vrednostima, a MIX 5 + SB čak ispod kontrolnih vrednosti.

Nivo triglicerida bio je značajno smanjen u svim tretiranim grupama, sa najizraženijim efektom u MIX 5 grupi, dok je nivo MIX 5 + SB bio bliži kontrolnim vrednostima u poređenju sa MIX 5 + P.

Nivo uree bio je značajno smanjen u MIX 5 grupi, dok je u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi bio sličan kontrolnim vrednostima.

Uočeno je značajno povećanje nivoa direktnog bilirubina u MIX 5 grupi koji je u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi bio u nivou kontrolnih vrednosti.

U poređenju sa kontrolnom grupom, uočeno je smanjenje nivoa AST u svim tretiranim grupama bez statističke značajnosti, dok su MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupe imale vrednosti bliže kontrolnim, sa izraženijim efektom MIX 5 + P.

Nivoi ALP bili su značajno smanjeni u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe dok su MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupe imale vrednosti bliže kontrolnim, sa izraženijim efektom MIX 5 + SB.

Interesantno, serumsko gvožđe bilo je smanjeno u svim tretiranim grupama sa najizraženijim smanjenjem u MIX 5 + SB.

Nivo  $PO_4^{3-}$  bio je značajno smanjen u MIX 5 + SB grupi u poređenju sa kontrolnim vrednostima.

**Tabela 62.** Biohemijski parametri kod pacova nakon subakutnog (28-dnevnog) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

Parametar	Prikaz rezultata	Kontrola	MIX 5	MIX 5+P	MIX 5+ SB
<b>CRP (mg/L)</b>	Medijana	0,0700	0,0800	0,0300	0,0500
	Opseg	0,0250-0,1950	0,0700-0,1100	0,0300-0,0800	0,0450-0,0800
	% u odnosu na kontrolu		14,286	-57,143	-28,571
<b>Glukoza (mmol/L)</b>	Medijana	9,000	12,30	7,000	9,100

	Opseg	7,800-20,95	9,200-20,65	6,400-8,100	7,800-9,500
	% u odnosu na kontrolu		36,667	-22,222	1,111
<b>Ukupni holesterol (mmol/L)</b>	Srednja vrednost	1,452	1,394	1,160*	1,274
	SD	0,09121	0,2372	0,1562	0,1802
	% u odnosu na kontrolu		-3,994	-20,110	-12,259
<b>HDL (mmol/L)</b>	Srednja vrednost	1,102	0,8700	0,6900**	0,8660
	SD	0,1008	0,2442	0,1908	0,1889
	% u odnosu na kontrolu		-21,053	-37,387	-21,416
<b>LDL (mmol/L)</b>	Srednja vrednost	0,196	0,336	0,2533	0,12 <sup>#</sup>
	SD	0,05595	0,1399	0,294	0,121
	% u odnosu na kontrolu		71,429	29,235	-38,776
<b>Trigliceridi (mmol/L)</b>	Srednja vrednost	1,078	0,49***	0,6533**	0,732*
	SD	0,1386	0,1823	0,08737	0,2523
	% u odnosu na kontrolu		-54,545	-39,397	-32,096
<b>Urea (mmol/L)</b>	Srednja vrednost	9,74	8,06*	8,6	8,78
	SD	0,4827	1,454	0,4	0,7396
	% u odnosu na kontrolu		-17,248	-11,704	-9,856
<b>Kreatinin (μmol/L)</b>	Srednja vrednost	39,2	40,8	38,33	33,2 <sup>#</sup>
	SD	3,701	5,404	8,505	3,114

	% u odnosu na kontrolu		4,082	-2,219	-15,306
<b>Mokraćna kiselina (μmol/L)</b>	Srednja vrednost	202,	266,8	161,7	173
	SD	96,53	133,7	67	66,81
	% u odnosu na kontrolu		32,079	-19,950	-14,356
<b>Ukupni proteini (g/L)</b>	Srednja vrednost	64,2	62,4	61,33	64,4
	SD	3,271	1,817	2,887	6,025
	% u odnosu na kontrolu		-2,804	-4,470	0,312
<b>Albumin (g/L)</b>	Medijana	44	39	40	43
	Opseg	43-45,5	39-40,5	31-44	37,5-45,5
	% u odnosu na kontrolu		-11,364	-9,091	-2,273
<b>Ukupni bilirubin (μmol/L)</b>	Medijana	1	1,2	0,9	0,8
	Opseg	0,95-1,3	0,95-1,65	0,6-12,9	0,5-0,95
	% u odnosu na kontrolu		20,000	-10,000	-20,000
<b>Direktni bilirubin (μmol/L)</b>	Medijana	0,2	0,6*	0,2	0,3
	Opseg	0,1-0,45	0,35-0,7	0,1-8,4	0,15-0,5
	% u odnosu na kontrolu		200,000	0,000	50,000
<b>AST (U/L)</b>	Medijana	235	147	195	174
	Opseg	146-424,5	136,5-171	150-266	151,5-209,5
	% u odnosu na kontrolu		-37,447	-17,021	-25,957
<b>ALT (U/L)</b>	Medijana	60	51	72	78

	Opseg	53,5-115,5	45-69	68-86	69,5-90,5
	% u odnosu na kontrolu		-15,000	20,000	30,000
<b>ALP (U/L)</b>	Srednja vrednost	236,8	131,2***	157,7**	184,8*#
	SD	13,29	32,88	50,24	41
	% u odnosu na kontrolu		-44,595	-33,404	-21,959
<b>Kreatin kinaza (U/L)</b>	Medijana	1161	1706	924	875
	Opseg	888,5-7008	621-2558	455-1008	399,5-1417
	% u odnosu na kontrolu		46,942	-20,413	-24,634
<b>Homocistein (μmol/L)</b>	Srednja vrednost	9,236	8,982	10,26	7,432
	SD	3,25	1,733	1,091	1,745
	% u odnosu na kontrolu		-2,750	11,087	-19,532
<b>Serumsko gvožđe (μmol/L)</b>	Srednja vrednost	57,92	38,46	20,83**	19,2***
	SD	16	18,6	5,901**	11,35***
	% u odnosu na kontrolu		-33,598	-64,037	-66,851
<b>Na<sup>+</sup> (mmol/L)</b>	Medijana	153	147	703	149
	Opseg	150-154	145-150	147-1574	147,5-566,5
	% u odnosu na kontrolu		-3,922	359,477	-2,614
<b>K<sup>+</sup> (mmol/L)</b>	Medijana	6,5	7,2	6,4	6,5
	Opseg	5,55-7,25	6-8,1	5,8-25,4	5,95-10,25
	% u odnosu na kontrolu		10,769	-1,538	0,000

Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	Medijana	103	102	744	103
	Opseg	102,5-105	101,5-105	102-1817	101-616,5
	% u odnosu na kontrolu		-0,971	622,330	0,000
Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	Srednja vrednost	3,23	3,43	2,88 <sup>#</sup>	3,062
	SD	0,1235	0,3269	0,3208	0,3552
	% u odnosu na kontrolu		6,192	-10,836	-5,201
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mmol/L)	Srednja vrednost	3,652	3,22	3,163	2,642 <sup>***</sup>
	SD	0,4289	0,472	0,3166	0,3266
	% u odnosu na kontrolu		-11,829	-13,390	-27,656
Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	Medijana	1,46	1,61	1,27	1,26
	Opseg	1,305-1,905	1,235-1,975	1,12-1,41	1,14-1,36
	% u odnosu na kontrolu		10,274	-13,014	-13,699

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik (8,78 \* 10<sup>8</sup> CFU/kg/dan: *Saccharomysces cerevisiae* var. *bouardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac (5.16 \* 10<sup>8</sup> CFU/kg/dan *Saccharomysces cerevisiae* var. *bouardii*). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 (u poređenju sa kontrolom); <sup>#</sup>p < 0.05 (u poređenju sa MIX 5).

#### 4.2.2.6. Nivoi hormona

Hormoni izmereni kod eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su na Slici 29.

Uočeno je smanjenje nivoa fT3 i T3 u grupi MIX 5, dok su se nivoi ovih hormona približili vrednostima kontrole u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi. Uočeno je i izraženije smanjenje nivoa fT4 i T4 u MIX 5 + P grupi i u odnosu na kontrolnu grupu i u odnosu na MIX 5 grupu, dok su vrednosti ovih hormona u MIX 5 + SB grupi bili bliži vrednostima kontrole.

Nije bilo statistički značajnih razlika u nivou testosterona, međutim u grupi MIX 5 uočeno je blago povećanje ovog hormona u odnosu na kontrolnu grupu koje je “anulirano” u grupi MIX 5 + P. Sa

druge strane, povećanje nivoa aldosterona uočeno je u grupi MIX 5 + SB u odnosu na sve ostale grupe.

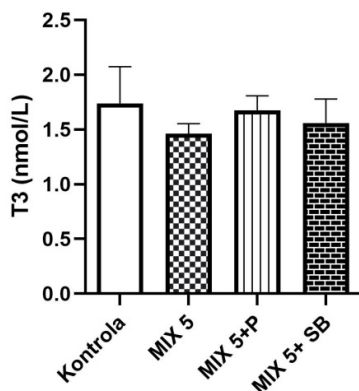
Ni pri promenama nivoa kortizola nisu uočene značajne razlike, ali je nivo kortizola bio smanjen u svim tretiranim grupama, sa najizraženijim efektom u MIX 5 + P grupi.

Nivo testosterona bio je blago smanjen u MIX 5 grupi, dok je u grupama MIX 5 + P i MIX 5 + SB nivo testosterona bio veći i od kontrolne grupe, sa izraženijim efektom u grupi MIX 5 + SB.

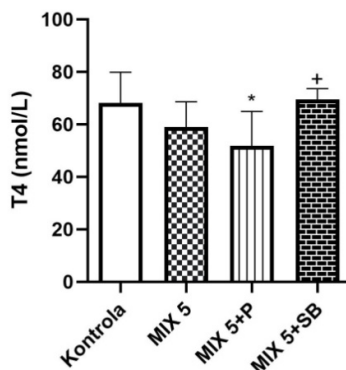
Sličan scenario uočava se i u slučaju renina, sa izraženijim efektom MIX 5 + P.

Nivo aldosterona bio je blago povećan u MIX 5 grupi, dok je u grupama MIX 5 + P i MIX 5 + SB nivo aldosterona bio manji čak i od kontrolnih vrednosti.

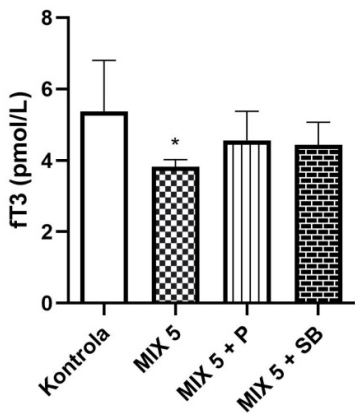
**A**



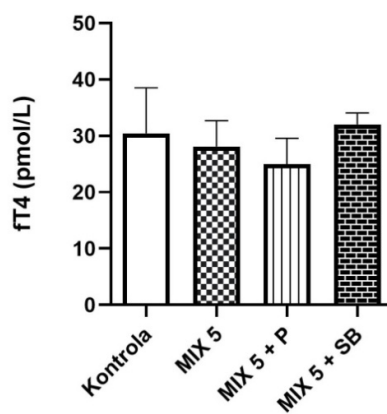
**B**



**C**



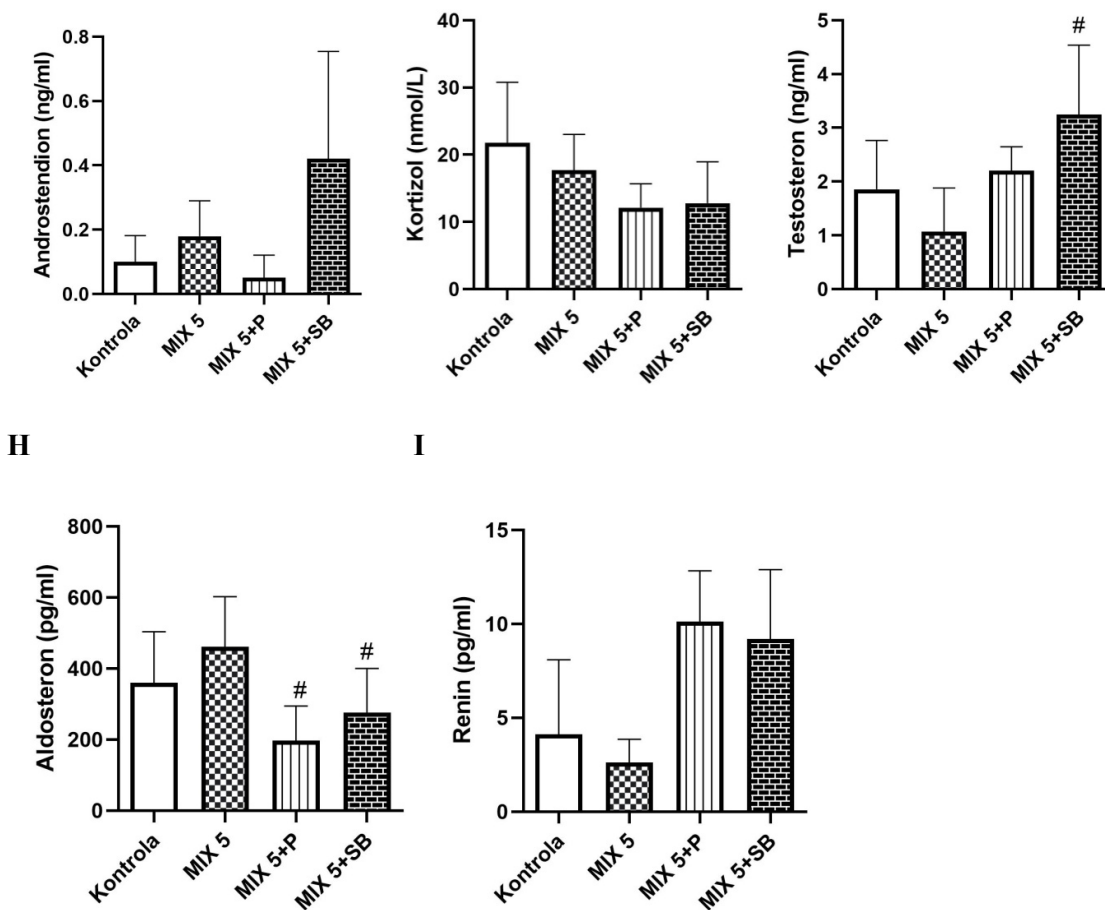
**D**



**E**

**F**

**G**



**Slika 29. Hormoni u krvi pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*). T3: trijodtironin, T4: tiroksin, FT3: slobodni trijodtironin, FT4: slobodni tiroksin. \* $p < 0.05$  (u poređenju sa kontrolom); # $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 5);  $^+p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 5 + P).

#### 4.2.2.7. Parametri redoks statusa u krvi

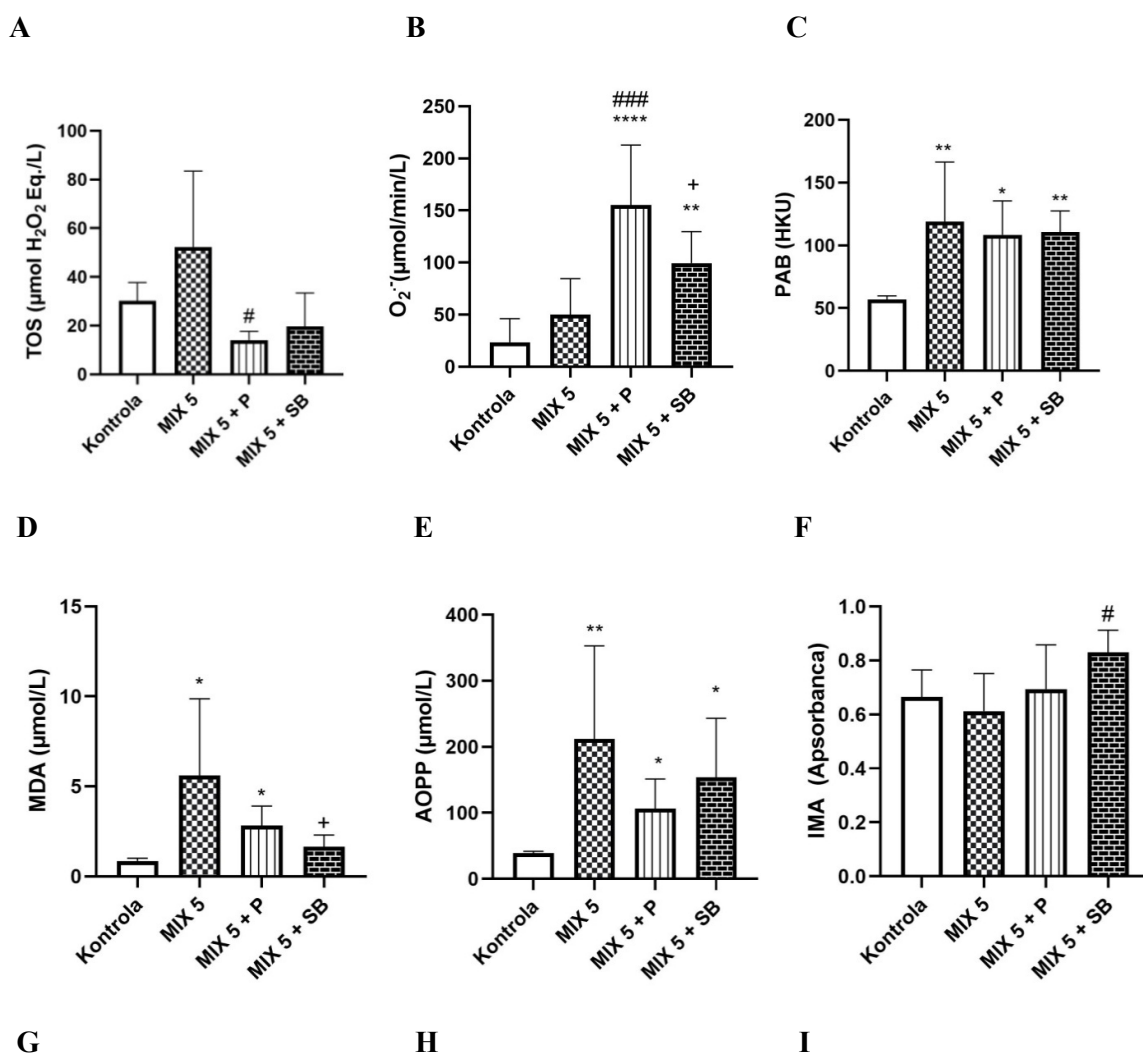
Parametri redoks statusa izmereni plazmi eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su na Slici 30.

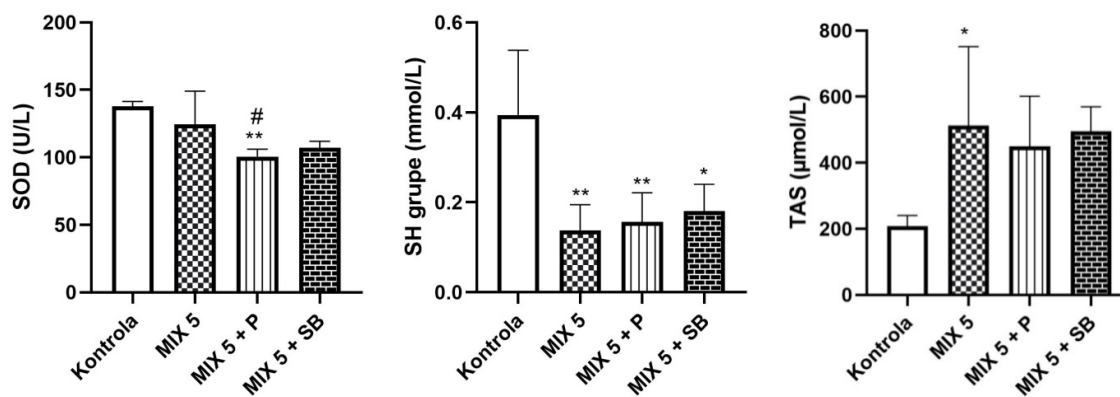
Uočeno je blago smanjenje većine prooksidativnih parametara (TOS, PAB, MDA, AOPP) u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi u odnosu na MIX 5 grupu, osim u nivou  $O_2^-$  gde je uočeno povećanje nivoa u navedenim grupama u poređenju sa MIX 5 grupom.

Interesantno, nivo SOD bio je značajno smanjen u MIX 5 + P grupi u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe. Uočeno je i da je nivo SH grupa bio značajno smanjen u svim tretiranim grupama, dok je nivo TAS značajno bio povećan u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom.

Takođe, uočeno je i povećanje antioksidativnih parametara u MIX 5 + SB – nivoa SH grupa i GSH u poređenju sa MIX 5 grupom, a SOD i u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe.

Nije bilo značajnih promena u indeksu oksidativnog stresa, skoru oksidativnog oštećenja i skoru antioksidativne zaštite pri poređenju grupa. Skor oksidativne ravnoteže značajno se razlikovao u MIX 5, MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi u poređenju sa kontrolnom grupom (Prilog 1 Tabela 13 i Tabela 14).





**Slika 30. Parametri redoks statusa izmerenim u krvi pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomiscus cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomiscus cerevisiae* var. *boulardii*). TOS: totalni oksidativni status,  $O_2^-$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijski modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, TAS: totalni antioksidativni status. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (u poređenju sa kontrolom); # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$  (u poređenju sa MIX 5); + $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 5 + P).

#### 4.2.2.8. Nivoi bioelemedenata u krvi i tkivima

Nivoi ispitivanih bioelemedenata u krvi i tkivima eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i višekomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su u Tabeli 63.

Nivoi bioelemedenata u krvi pacova nisu se značajno razlikovali pri poređenju grupa. Uočeno je blago smanjenje u nivoima Fe u krvi u MIX 5 grupi u poređenju sa vrednostima kontrole, koje je anulirano u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi.

Nivo Zn bio je značajno povećan u tkivu jetre u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolom, dok je taj efekat anuliran u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi. Nivo Cu bio je značajno smanjen u tkivu jetre u MIX 5 + SB grupi u poređenju sa vrednostima kontrole. Takođe, i nivo Fe bio je smanjen u tkivu jetre u svim tretiranim grupama, sa statističkom značajnošću u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi.

Nivo Fe bio je smanjen u tkivu bubrega u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolom, ali je to smanjenje bilo značajno u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi.

U poređenju sa kontrolom, nivo Cu bio je značajno smanjen u tkivu mozga u svim tretiranim grupama, dok je nivo Zn bio značajno smanjen u MIX 5 + P grupi. Nivo Fe bio je smanjen u tkivu mozga u svim grupama u poređenju sa kontrolom, sa statističkom značajnošću u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi. Nivo Mn bio je značajno povećan u tkivu mozga u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolom, dok je u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi bio značajno smanjen.

Nivoi svih ispitivanih bioelemedenata u tkivu srca bili su ispod limita kvantifikacije u MIX 5 + SB grupi, dok među ostalim grupama nije bilo statistički značajne razlike u nivoima bioelemedenata.

Nivoi Cu bili su značajno smanjeni u tkivu pluća u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrole, dok je nivo Fe isto bio smanjen u svim tretiranim grupama, ali sa statističkom značajnošću u MIX 5 + SB grupi.

Nivoi bioelemenata nisu se značajno razlikovali u tkivu pankreasa pri poređenju grupa, osim u nivoima Fe koji su bili značajno smanjeni u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom.

Nivoi Fe bili su smanjeni u tkivu slezine u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrole, sa statističkom značajnošću u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi.

Nivo Fe bio je smanjen u tkivu testisa u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolom, a značajno smanjenje uočeno je u MIX 5 + SB grupi.

Nivoi Zn i Mn značajno su bili smanjeni u tkivu femura u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe. Nivoi Fe su takođe bili smanjeni u tkivu femura u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom, sa statističkom značajnošću u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi.

**Tabela 63.** Nivoi ispitivanih bioelemenata u krvi i tkivima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

Izmereni bioelementa (µg/mL)		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
<b>Krv</b>					
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	1,249	1,330	1,064	1,174
	SD	0,2259	0,2608	0,2440	0,7145
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	7,381	5,187	7,212	7,166
	SD	1,728	1,331	1,195	3,334
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	736,7	539,1	603,2	587,8
	SD	295,7	197,4	98,32	307,7
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	0,2888	0,2155	0,2883	0,2286
	SD	0,08198	0,04800	0,1204	0,1122
Koncentracija bioelementa (µg/g)		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
<b>Jetra</b>					
<b>Cu</b>	Medijana	5,404	4,849	3,981	3,254 <sup>###</sup>
	Opseg	(3,678-7,601)	(4,009-5,559)	(3,665-4,546)	(3,144-3,735)
<b>Zn</b>	Medijana	22,01	30,96 <sup>**</sup>	24,37	23,26
	Opseg	(19,58-22,52)	(29,61-33,21)	(22,47-29,14)	(22,65-28,4)
<b>Fe</b>	Medijana	101,7	50,17	39,27 <sup>**</sup>	37,64 <sup>**</sup>
	Opseg	(90,3-117,2)	(41,94-52,7)	(35,46-48,27)	(29,2-41,26)

<b>Mn</b>	Srednja vrednost	3,440	3,373	3,187	3,083
	SD	0,1991	0,3003	0,5376	0,2080
<b>Bubrezi</b>					
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	6,688	6,066	7,063	6,659
	SD	1,052	0,7881	1,457	1,420
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	15,05	15,19	14,31	14,03
	SD	0,3860	1,797	0,5032	2,067
<b>Fe</b>	Medijana	73,46	49,15	43,19**	41,85**
	Opseg	(59,19-82,29)	(42,18-55,09)	(38,95-47,68)	(35,42-46,51)
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	1,059	1,031	1,022	1,043
	SD	0,04186	0,1335	0,1106	0,1167
<b>Mozak</b>					
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	2,920	2,287**	2,225**	2,166**
	SD	0,2003	0,4433	0,1298	0,1518
<b>Zn</b>	Medijana	11,52	11,14	10,39*	11,21
	Opseg	(11,13-11,57)	(9,183-12,09)	(9,889-10,69)	(11,02-11,55)
<b>Fe</b>	Medijana	22,50	17,75	16,80	16,05
	Opseg	(20,23-26,99)	(15,2-20,01)	(15,39-17,03)	(15,23-17,42)
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	0,02332	0,08032**	0,01883**	0,02211**
	SD	0,01043	0,03592	0,008423	0,009888
<b>Srce</b>					
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	5,961	6,010	5,708	NA
	SD	0,5738	1,732	0,3642	NA
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	26,75	24,23	25,06	NA
	SD	2,508	4,789	1,475	NA
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	70,29	55,92	60,73	NA
	SD	6,994	12,57	11,70	NA
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	0,4107	0,2712	0,2591	NA
	SD	0,05833	0,1815	0,07942	NA
<b>Pluća</b>					
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	1,775	0,9838***	0,9661***	0,9215***
	SD	0,3155	0,2491	0,1528	0,2538
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	24,24	22,20	22,75	22,33

	SD	1,621	1,557	0,4666	2,085
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	115,3	72,08	77,78	58,99**
	SD	28,03	28,52	23,51	14,03
<b>Mn</b>	Medijana	0,2660	0,2340	0,1911	0,1616
	Opseg	(0,238-0,4381)	(0,1479-0,2623)	(0,1428-0,23)	(0,1273-0,245)
<b>Pankreas</b>					
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	1,188	0,5713	0,3442	1,557 <sup>+</sup>
	SD	0,8846	0,07941	0,3571	0,1306
<b>Zn</b>	Medijana	24,72	14,08	13,81	23,63
	Opseg	(20,88-29,36)	(6,819-31,32)	(10,78-39,89)	(17,89-27,08)
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	19,47	7,736 <sup>*</sup>	14,23	14,66
	SD	2,694	4,266	8,564	3,519
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	1,348	0,7934	0,9698	1,214
	SD	0,3518	0,8823	0,7932	0,4068
<b>Slezina</b>					
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	0,5606	0,3960	0,5185	0,5415
	SD	0,1403	0,1791	0,2535	0,2302
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	18,90	19,37	18,66	18,31
	SD	2,719	4,600	3,233	3,771
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	190,9	142,8	92,22**	96,78**
	SD	43,37	42,17	13,43	36,88
<b>Testisi</b>					
<b>Cu</b>	Medijana	1,898	2,110	1,688	1,625
	Opseg	(1,478-2,549)	(1,819-3,457)	(1,437-2,262)	(1,5-1,869)
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	34,85	35,84	33,20	34,38
	SD	8,856	5,174	7,801	4,401
<b>Fe</b>	Medijana	18,62	7,285	7,903	6,100 <sup>*</sup>
	Opseg	(13,34-30,49)	(6,07-9,423)	(4,17-11,88)	(4,27-8,238)
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	0,1204	NA	NA	NA
	SD	0,05660	NA	NA	NA
<b>Femur</b>					
<b>Cu</b>	Medijana	0,7063	0,7907	0,7388	0,9166
	Opseg	(0,6749-0,7529)	(0,6733-0,7979)	(0,7198-0,7891)	(0,6874-0,9699)

<b>Zn</b>	Srednja vrednost	101,1	87,46 <sup>**</sup>	89,41 <sup>**</sup>	86,75 <sup>**</sup>
	SD	5,484	2,282	6,177	8,510
<b>Fe</b>	Medijana	28,62	20,95	19,10 <sup>**</sup>	17,04 <sup>***</sup>
	Opseg	(25,32-51,69)	(18,75-21,92)	(13,36-22)	(15,62-19,07)
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	0,4113	0,3030 <sup>***</sup>	0,3454 <sup>*</sup>	0,3299 <sup>**</sup>
	SD	0,04162	0,03210	0,04246	0,04200

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii*). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (u poređenju sa kontrolom); # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  (u poređenju sa MIX 5); + $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 5 + P). NA- ispod limita kvantifikacije (LOQ: 0,00002  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 4.2.2.9. Nivoi elemenata u fecesu

Nivoi ispitivanih metal(oid)a u fecesu eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku nakon 14 i 28 dana prikazani su Tabeli 64.

Nakon 14 dana, uočeni su povećani nivoi Pb i Cd u fecesu pacova u MIX 5 i MIX 5 + SB grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, dok su ta povećanja anulirana u MIX 5+ P grupi. Nivoi Hg i As u fecesu pacova bili su ispod limita kvantifikacije u kontrolnoj grupi. U poređenju sa MIX 5 grupom nivo Hg u fecesu pacova blago je smanjen u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi, dok je nivo As blago smanjen u MIX 5 + SB grupi.

Nakon 28 dana, nivoi Pb i Cd u fecesu pacova bili su značajno povećani u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, dok su ta povećanja bila anulirana u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi. Nivo Hg u fecesu pacova bio je blago povećan u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolom.

**Tabela 64.** Nivoi ispitivanih metal(oid)a u fecesu pacova nakon dva vremenska perioda (14. i 28. dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

Izmereni metal(oid)i ( $\mu\text{g/g}$ )		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
<b>Feces (14. dan)</b>					
<b>Pb</b>	Medijana	1,861	16,48*	6,947	11,03*
	Opseg	(1,151-2,261)	(7,035-21,17)	(5,013-18,84)	(7,115-27,38)
<b>Cd</b>	Medijana	0,5371	65,91**	19,20	23,90*
	Opseg	(0,1465-0,6479)	(27,44-74,09)	(14,71-26,68)	(18,27-114,5)
<b>Hg</b>	Medijana	NA	0,07035	0,03261	0,05654
	Opseg	NA	(0,06741-0,139)	(0,0315-0,03372)	(0,03398-0,1986)

<b>As</b>	Medijana	NA	0,2704	0,3476	1,540
	Opseg	NA	(0,1763-0,3401)	(0,2858-0,4095)	(0,2233-4,934)
<b>Feces (28. dan)</b>					
<b>Pb</b>	Medijana	0,7776	61,92***	32,57	33,21
	Opseg	(0,5771-1,023)	(45,13-131,9)	(21,07-59,51)	(24,09-38,48)
<b>Cd</b>	Medijana	0,4964	232,6**	119,7	132,6
	Opseg	(0,2765-1,573)	(174,5-480,4)	(93,52-231)	(100,6-166,7)
<b>Hg</b>	Srednja vrednost	0,04429	0,6270	0,4808	0,7765
	SD	0,03762	0,3831	0,3108	0,4288
<b>As</b>	Srednja vrednost	0,4424	0,3619	0,2587	0,2123
	SD	0,2354	0,2604	0,1922	0,1206

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal-Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomysces cerevisiae* var. *bouardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomysces cerevisiae* var. *bouardii*). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (u poređenju sa kontrolom). NA- ispod limita kvantifikacije (LOQ: 0,00002  $\mu$ g/mL).

Nivoi ispitivanih bioelemenata u fecesu eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku nakon 14 i 28 dana prikazani su Tabeli 65.

Nisu uočene promene u nivoima bioelemenata u fecesu pacova, ni nakon 14 dana, ni nakon 28 dana tretmana. U oba vremenska perioda uočeno je blago povećanje nivoa ispitivanih bioelemenata u fecesu pacova u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, bez statističke značajnosti.

**Tabela 65.** Nivoi ispitivanih bioelemenata u fecesu pacova nakon dva vremenska perioda (14. i 28. dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

Koncentracija bioelemenata ( $\mu$ g/g)		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
<b>Feces (14. dan)</b>					
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	44,54	55,57	44,34	37,16
	SD	9,977	7,898	10,43	15,75
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	365,1	438,5	362,9	290,2
	SD	85,24	57,20	81,88	113,0
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	508,1	639,3	504,2	427,3
	SD	99,90	100,9	122,9	188,0
<b>Mn</b>	Medijana	381,6	399,5	328,7	228,2

	Opseg	(247,6-395,6)	(365,7-470,7)	(259,8-408,2)	(218,1-348,4)
<b>Feces (28. dan)</b>					
<b>Cu</b>	Srednja vrednost	46,60	55,44	50,64	48,61
	SD	13,26	9,076	10,98	7,418
<b>Zn</b>	Srednja vrednost	337,9	436,2	373,0	361,1
	SD	98,44	82,48	77,64	43,11
<b>Fe</b>	Srednja vrednost	437,0	594,9	464,4	413,1
	SD	119,5	125,5	119,8	88,32
<b>Mn</b>	Srednja vrednost	289,5	351,9	324,7	308,6
	SD	68,16	60,60	77,39	43,59

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomiscus cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomiscus cerevisiae* var. *boulardii*).

#### 4.2.2.10. Parametri redoks statusa u tkivima

##### Jetra

Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva jetre kod eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su na Slici 31.

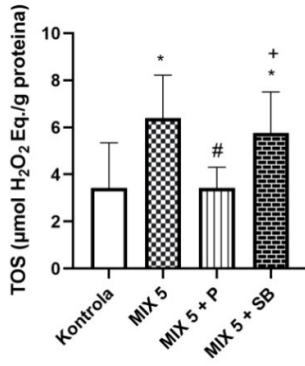
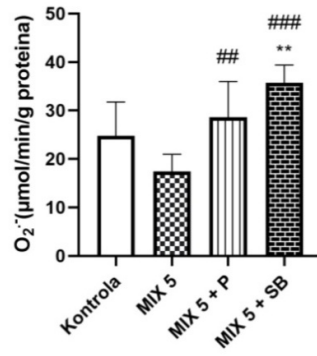
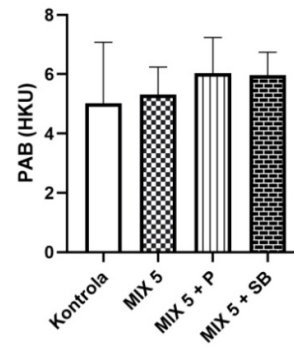
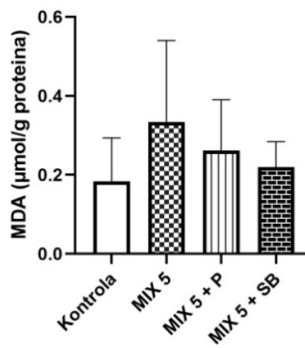
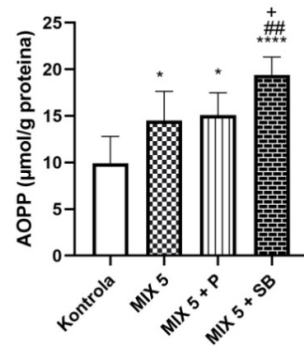
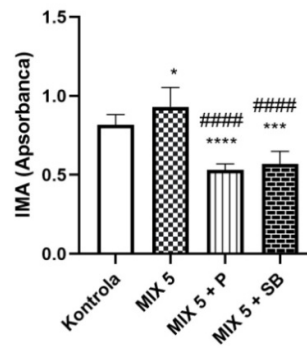
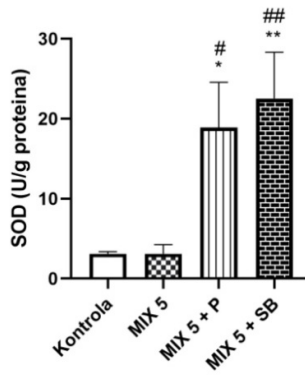
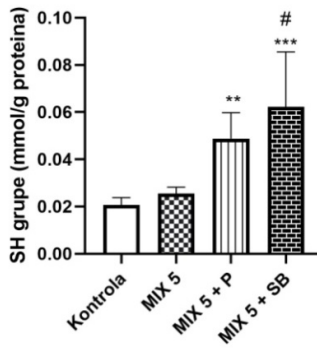
Uočen je povećan nivo TOS u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom koji je anuliran u MIX 5 + P grupi, ali ne i u MIX 5 + SB grupi. IMA nivo je bio značajno povećan u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolom, dok je nivo u MIX 5 + P i MIX 5 + SB bio čak niži od nivoa kontrolne grupe. MDA nivo bio je blago povećan u MIX 5 grupi, dok je u MIX 5 +P i MIX + SB grupama taj nivo bio bliži kontrolnoj vrednosti. Interesantno, najznačajnije povećanje nivoa  $O_2^-$  i AOPP uočeno je u MIX 5 + SB grupi.

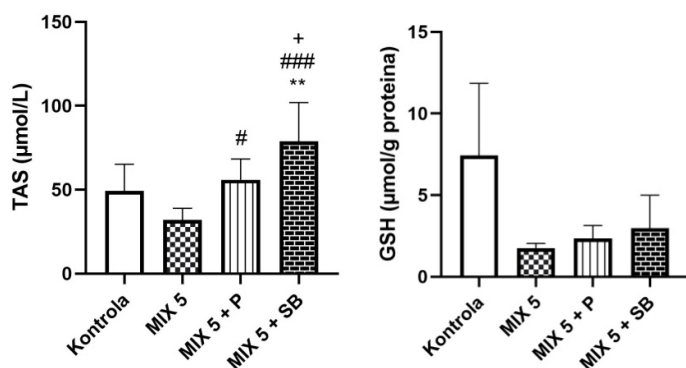
Nivoi SOD i SH grupa bili su značajno povećani u poređenju sa kontrolnom grupom u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi, dok je nivo TAS bio značajno povećan jedino MIX 5 + SB grupi. Nivo GSH bio je blago smanjen u svim tretiranim grupama.

Takođe, uočene su značajne promene u vrednostima indeksa oksidativnog stresa u MIX 5 grupi u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe, dok je u MIX 5 +P i MIX 5 + SB grupi taj efekat anuliran (Prilog 1 Tabela 15).

U MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi vrednosti skora antioksidativne zaštite bile su značajno različite i u poređenju sa MIX 5 grupom i u poređenju s kontrolnim vrednostima (Prilog 1 Tabela 16).

Finalno, vrednosti skora oksidativne ravnoteže značajno su se razlikovale od kontrolne grupe u svim tretiranim grupama, dok su se MIX 5 + P i MIX 5 + SB značajno razlikovale i od MIX 5 grupe (Prilog 1 Tabela 16).

**A****B****C****D****E****F****G****H****I****J**



**Slika 31. Parametri redoks statusa izmereni u tkivu jetre pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*). TOS: totalni oksidativni status,  $O_2^{\cdot-}$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijom modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, TAS: totalni antioksidativni status, GSH: glutation. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (u poređenju sa kontrolom); # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , #### $p < 0.0001$  (u poređenju sa MIX 5); † $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 5 + P).

## Bubreg

Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva bubrega kod eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su na Slici 32.

Uočeno je blago smanjenje većine prooksidativnih parametara (TOS,  $O_2^{\cdot-}$ , PAB, AOPP) u MIX 5 + P grupi, dok je u MIX 5 + SB grupi uočeno značajno povećanje tih parametara u odnosu na MIX 5 grupu.

Interesantno, nivo MDA bio je značajno smanjen u svim tretiranim grupama, sa značajnim smanjenjem u MIX 5 grupi, dok je nivo IMA bio povećan u svim tretiranim grupama sa značajnim povećanjem u MIX 5 + P grupi.

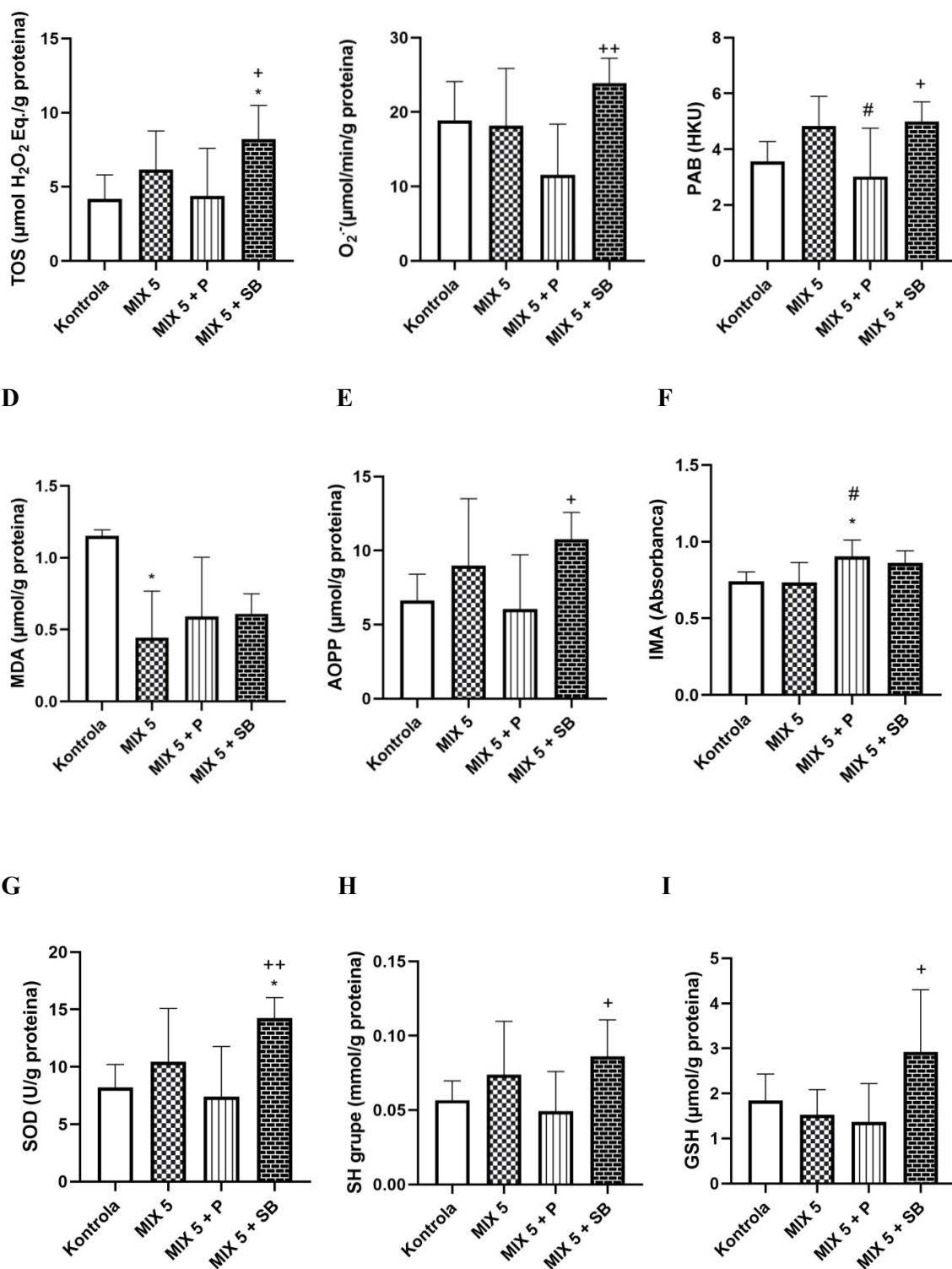
Takođe, uočeno je i povećanje antioksidativnih parametara u MIX 5 + SB – nivoa SH grupa i GSH u poređenju sa MIX 5 grupom, a SOD i u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe.

Nije bilo značajnih promena u skor antioksidativne zaštite i skor oksidativnog oštećenja pri poređenju grupa. Skor oksidativne ravnoteže značajno se razlikovao u MIX 5 + SB grupi u poređenju sa MIX 5 grupom (Prilog 1 Tabela 17).

A

B

C



**Slika 32. Parametri redoks statusa izmerenim u tkivu bubrega pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomices cerevisiae* var. *boulandii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomices cerevisiae* var. *boulandii*). TOS: totalni

oksidativni status,  $O_2^{\cdot-}$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijski modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, GSH: glutation. \* $p < 0.05$  (u poređenju sa kontrolom); # $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 5); † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  (u poređenju sa MIX 5 + P).

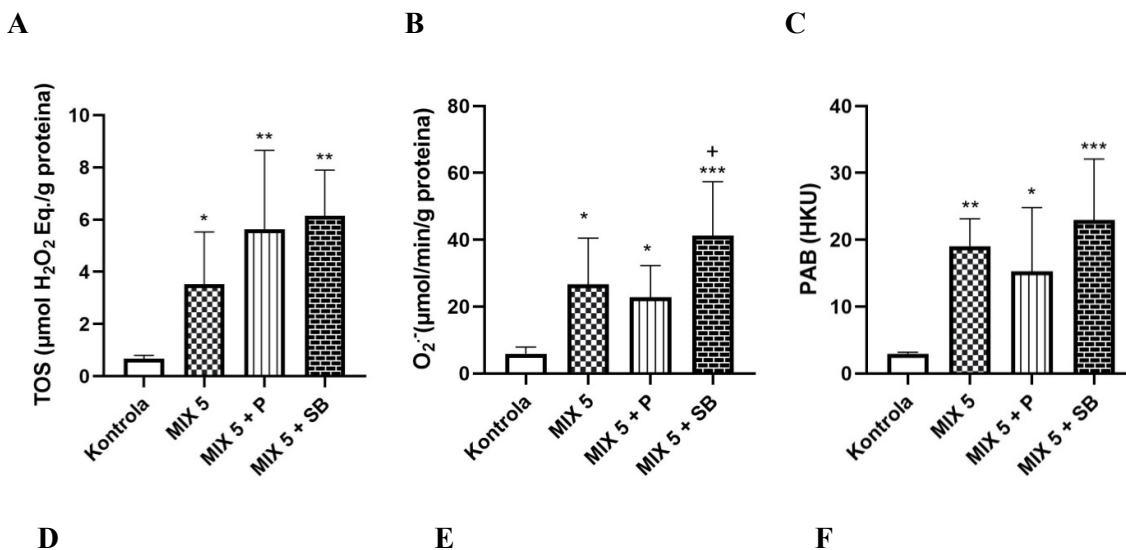
## Mozak

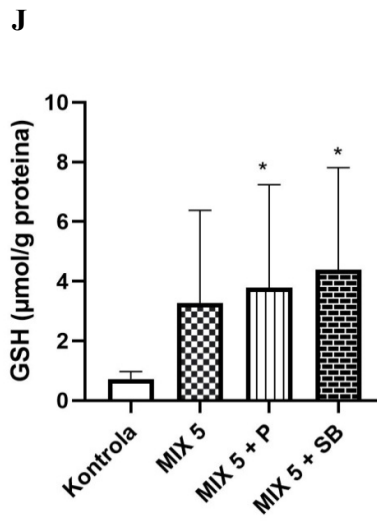
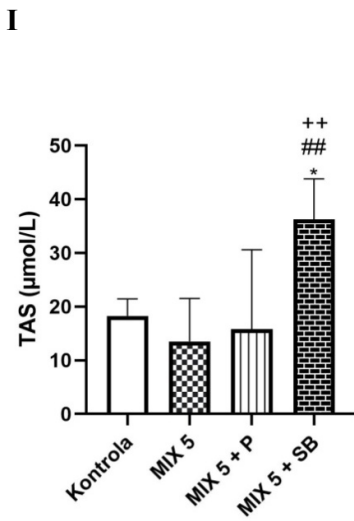
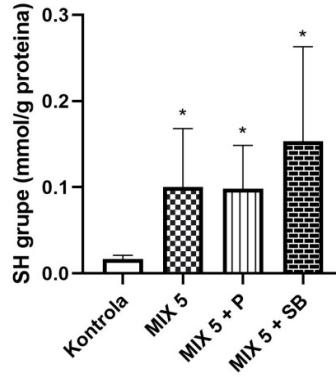
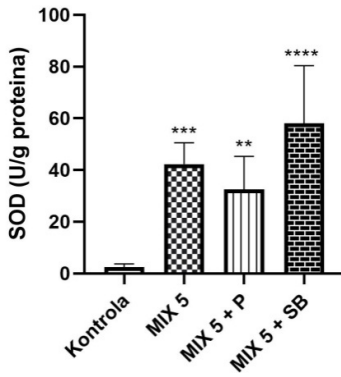
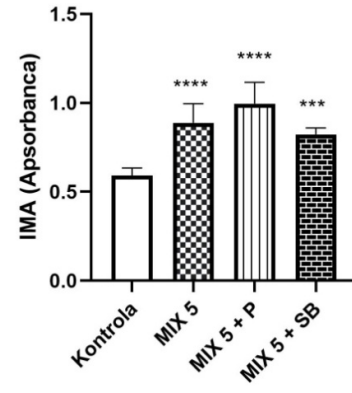
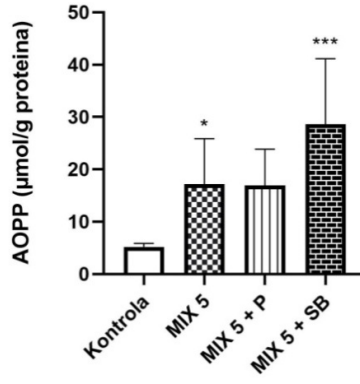
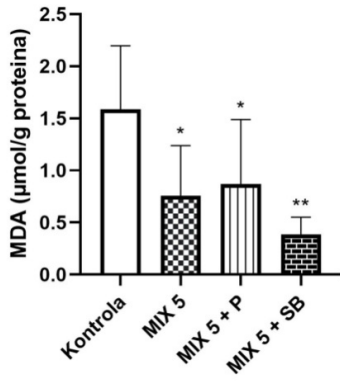
Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva mozga kod eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su na Slici 33.

Uočeno je povećanje u svim tretiranim grupama kod većine parametara redoks statusa (kod prooksidativnih parametara: TOS,  $O_2^{\cdot-}$ , PAB, AOPP, IMA, i kod antioksidativnih parametara: SOD, SH grupa, GSH).

Interesantno, nivo MDA bio je značajno smanjen u svim tretiranim grupama, dok je nivo TAS bio povećan u MIX 5 + SB grupi u poređenju sa vrednostima kontrole.

Značajne razlike uočene su u vrednostima indeksa oksidativnog stresa u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi u poređenju sa vrednostima kontrole (Prilog 1 Tabela 18). Dodatno, vrednosti skora oksidativnog oštećenja značajno su se razlikovale u MIX 5 + SB grupi, a vrednosti skora antioksidativne zaštite u MIX 5 i MIX 5 + SB u poređenju sa vrednostima kontrole. Nije bilo značajnih razlika među grupama pri poređenju vrednosti skora oksidativne ravnoteže (Prilog 1 Tabela 19).





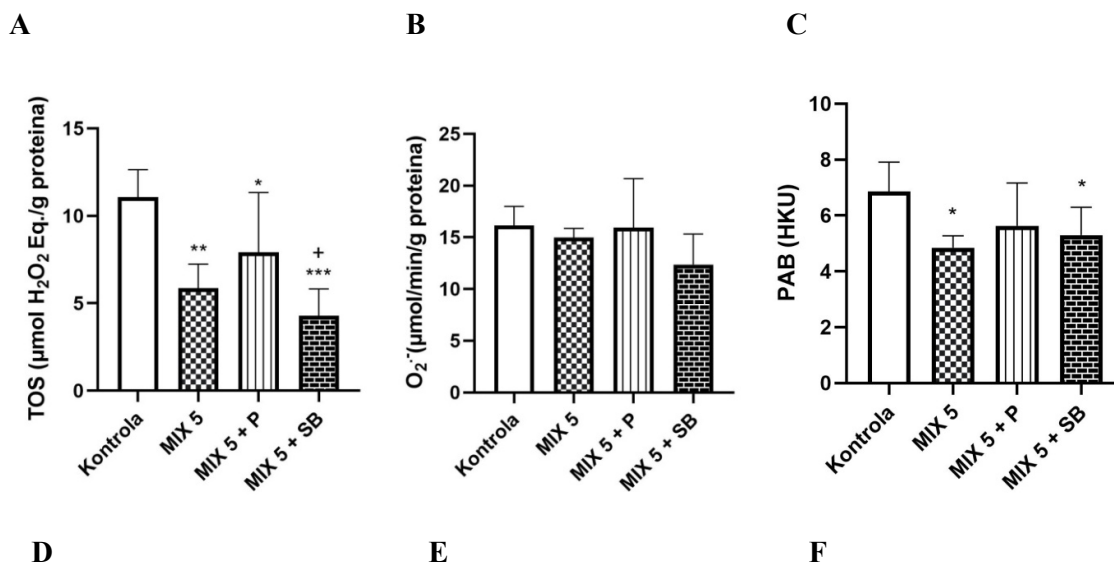
**Slika 33. Parametri redoks statusa izmerenim u tkivu mozga pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomisces cerevisiae* var. *bouardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomisces cerevisiae* var. *bouardii*). TOS: totalni oksidativni status,  $O_2^{\cdot-}$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijski modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, GSH: glutation. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001 (u poređenju sa kontrolom); ##p < 0.01 (u poređenju sa MIX 5); +p < 0.05, \*\*p < 0.01 (u poređenju sa MIX 5 + P).

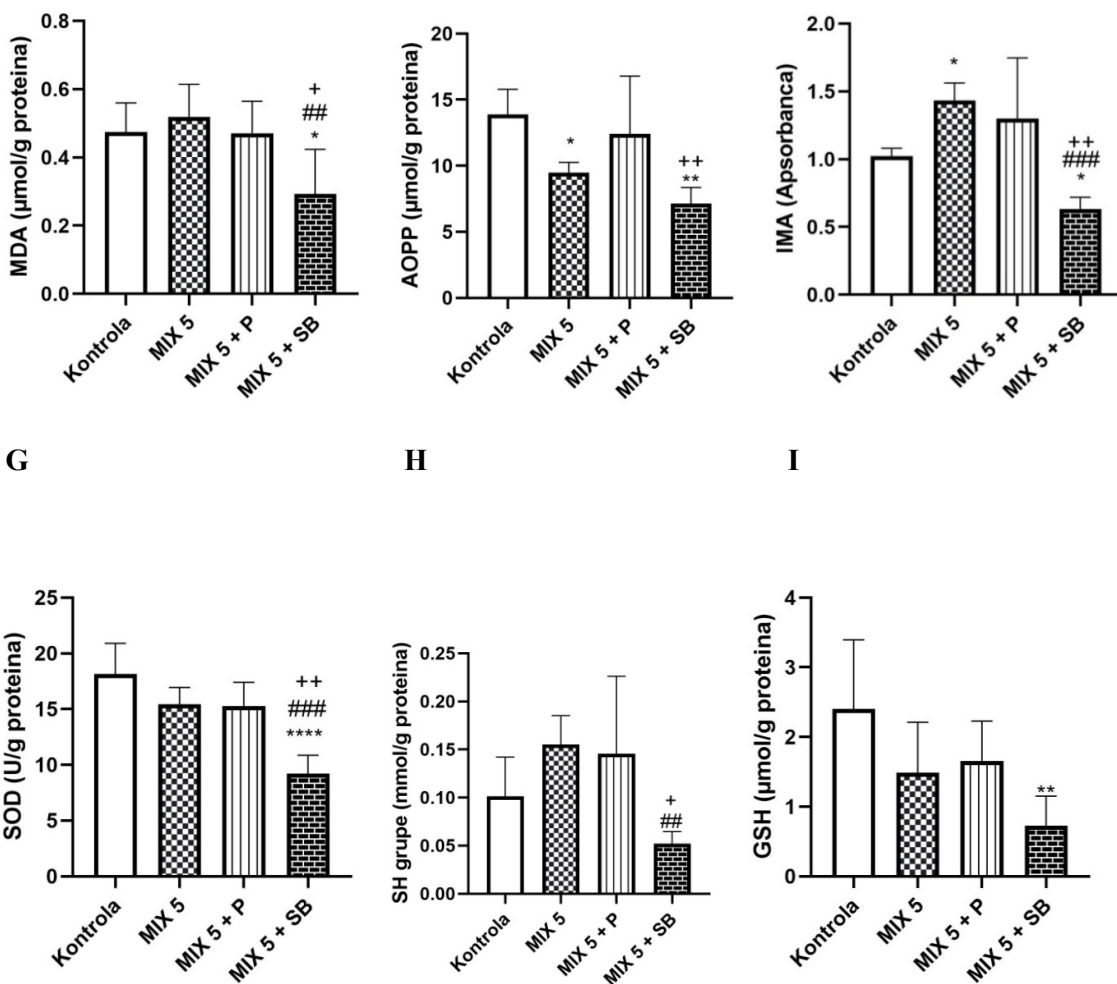
## Pluća

Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva pluća kod eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su na Slici 34.

Uočeno je smanjenje nivoa TOS, PAB i AOPP u svim tretiranim grupama u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe. U MIX 5 + SB grupi uočeno je smanjenje nivoa MDA i povećanje nivoa IMA u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe. Parametri antioksidativne zaštite bili su smanjeni u MIX 5 + SB grupi u poređenju sa vrednostima kontrole.

Dodatno, značajne razlike u vrednostima D skora uočene su u MIX 5 + SB grupi u poređenju sa kontrolom (Prilog 1 Tabela 20).





**Slika 34. Parametri redoks statusa izmerenim u tkivu pluća pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomices cerevisiae* var. *bouardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomices cerevisiae* var. *bouardii*). TOS: totalni oksidativni status,  $O_2^-$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijski modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, GSH: glutation. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (u poređenju sa kontrolom); ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  (u poređenju sa MIX 5); +  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$  (u poređenju sa MIX 5 + P).

## Pankreas

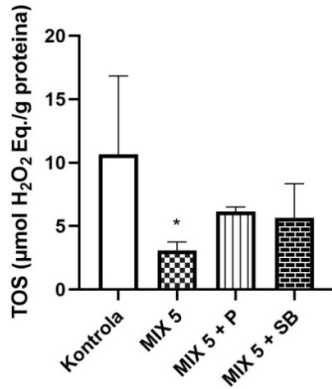
Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva pankreasa kod eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su na Slici 35.

Uočeno je značajno smanjenje nivoa TOS i povećanje nivoa  $O_2^-$  u MIX 5 grupi pri poređenju sa kontrolom. Takođe, uočeno je značajno smanjenje nivoa MDA u MIX 5 + P grupi pri poređenju sa

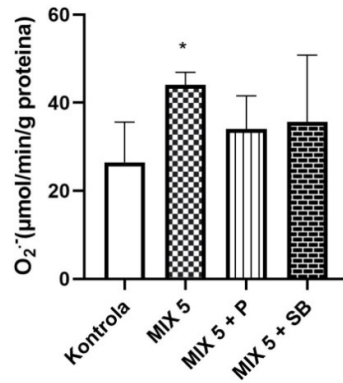
kontrolom. Nivo TAS bio je značajno smanjen u MIX 5 grupi, dok je u MIX 5 + P grupi bio značajno povećan u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe.

U ostalim parametrima redoks statusa, kao i u vrednostima indeksa oksidativnog stresa, skora antioksidativne zaštite, skora oksidativnog oštećenja i skora oksidativne ravnoteže nije bilo značajnih razlika pri poređenju sa vrednostima kontrolne grupe (Prilog 1 Tabela 21 i Tabela 22).

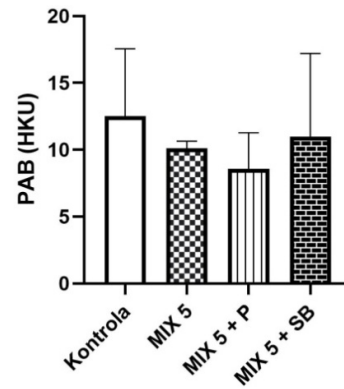
**A**



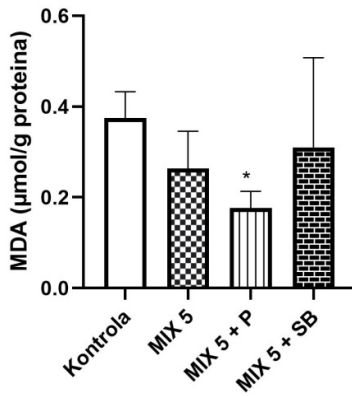
**B**



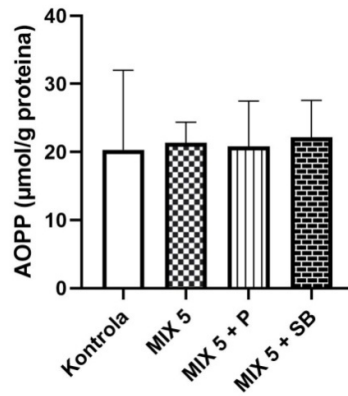
**C**



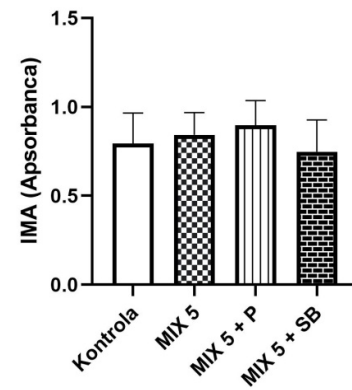
**D**



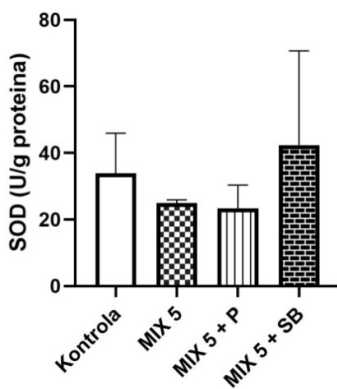
**E**



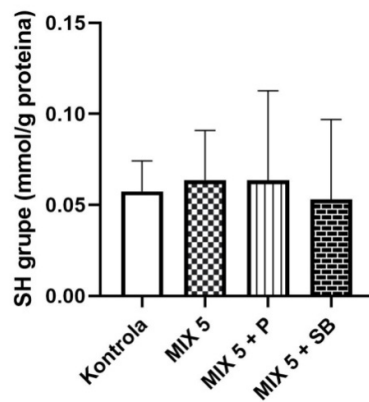
**F**



**G**

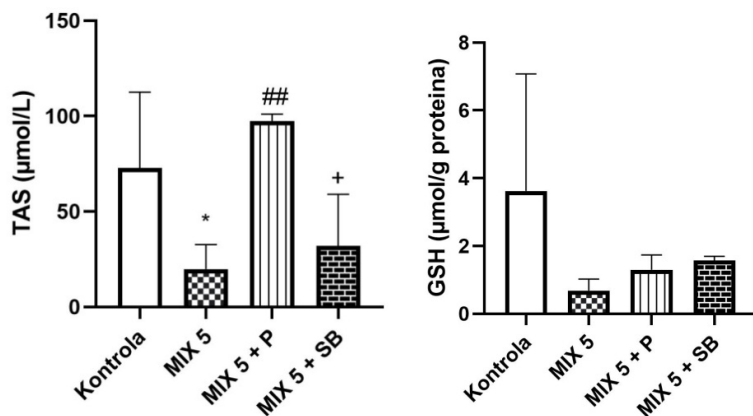


**H**



**I**

**J**



**Slika 35. Parametri redoks statusa izmerenim u tkivu pankreasa pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulevardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulevardii*). TOS: totalni oksidativni status,  $O_2^-$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijom modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, GSH: glutation. \* $p < 0.05$  (u poređenju sa kontrolom); ## $p < 0.01$  (u poređenju sa MIX 5); + $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 5 + P).

## Testisi

Parametri redoks statusa izmereni u homogenatima tkiva testisa kod eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su na Slici 36.

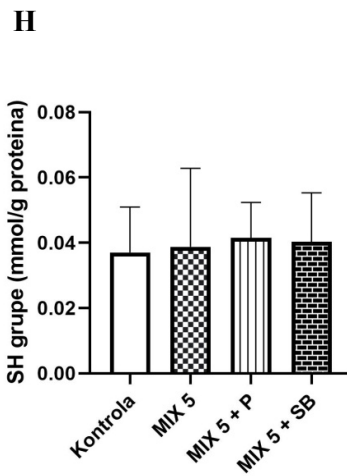
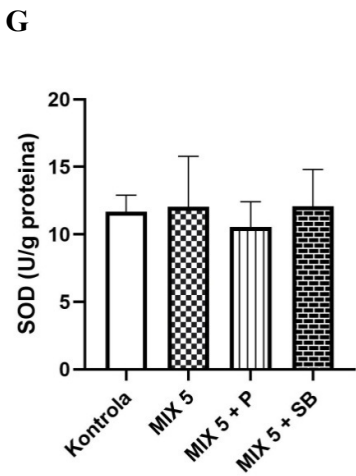
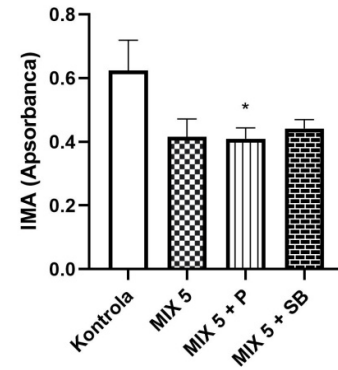
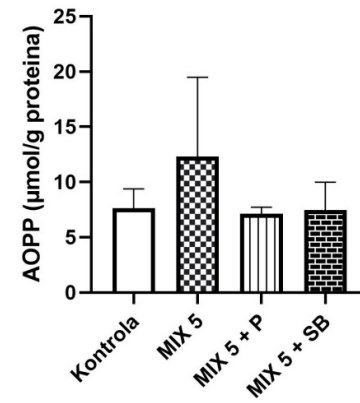
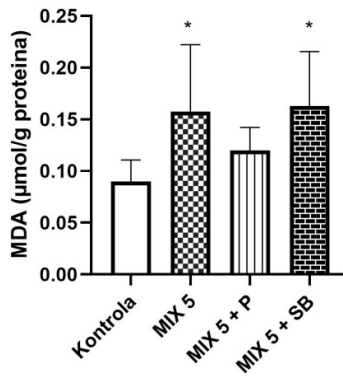
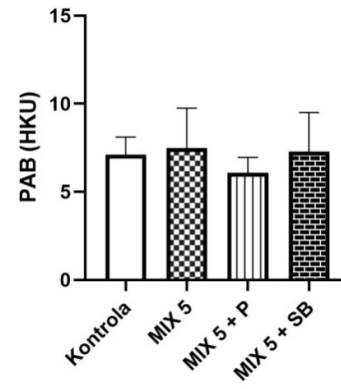
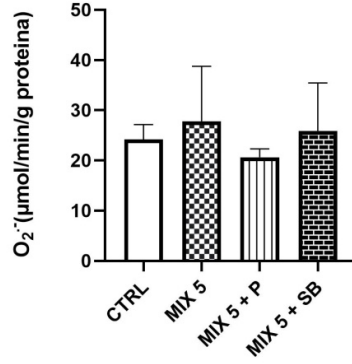
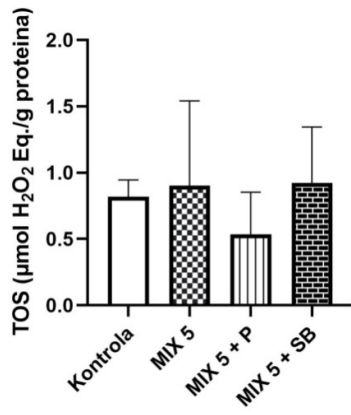
Nisu uočene značajne promene u nivoima većine parametara redoks statusa, osim u nivou MDA koji je bio značajno povišen u MIX 5 i MIX 5 + SB grupi u poređenju sa kontrolom, dok je u MIX 5 + P taj efekat anuliran. Takođe, smanjen nivo IMA uočen je u MIX 5 + P grupi u poređenju sa vrednostima kontrole.

Nisu uočene značajne promene u vrednostima indeksa oksidativnog stresa, skora antioksidativne zaštite, skora oksidativnog oštećenja i skora oksidativne ravnoteže pri poređenju grupa (Prilog 1 Tabela 23 i Tabela 24).

A

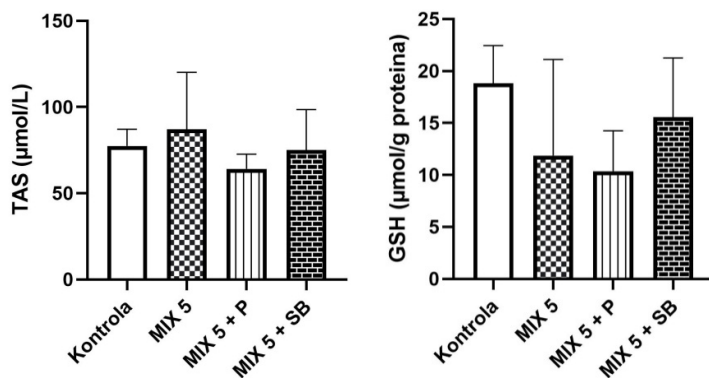
B

C



**I**

**J**

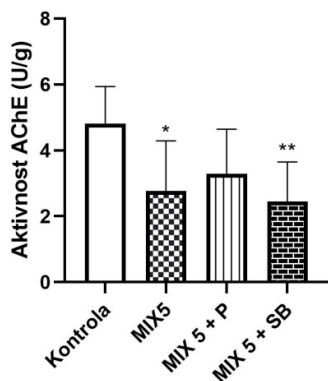


**Slika 36. Parametri redoks statusa izmerenim u tkivu testisa pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomices cerevisiae* var. *bouardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomices cerevisiae* var. *bouardii*). TOS: totalni oksidativni status,  $O_2^{\cdot-}$ : superoksidni anjon radikal, PAB: prooksidativno-antioksidativni balans, MDA: malondialdehid, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina, IMA: ishemijski modifikovan albumin, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe, GSH: glutation. \* $p < 0.05$  (u poređenju sa kontrolom).

#### 4.2.2.11. Aktivnost acetilholinesteraze

Aktivnost acetilholin esteraze u mozgu eksperimentalnih životinja izloženih smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As), smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i multikomponentnom probiotiku i smeši najviših ispitivanih doza metal(oid)a (Pb, Cd, Hg, As) i monokomponentnom probiotiku prikazani su na Slici 37.

U poređenju sa vrednostima kontrole, najviša doza smeše ispitivanih metal(oid)a, MIX5, značajno je smanjila aktivnost enzima AChE u poređenju sa kontrolnom grupom. Taj efekat je anuliran u MIX 5 + P grupi, dok je u MIX 5 + SB grupi efekat na aktivnost enzima AChE bio sličan efektu MIX 5.



**Slika 37. Aktivnost enzima acetilholinesteraze u mozgu kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB).** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis

test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 * 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 * 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii*). AChE: acetilholinesteraza. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (u poređenju sa kontrolom).

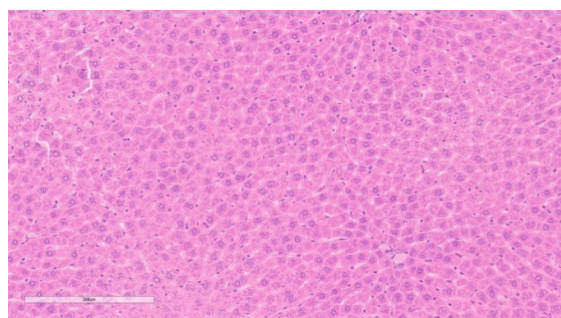
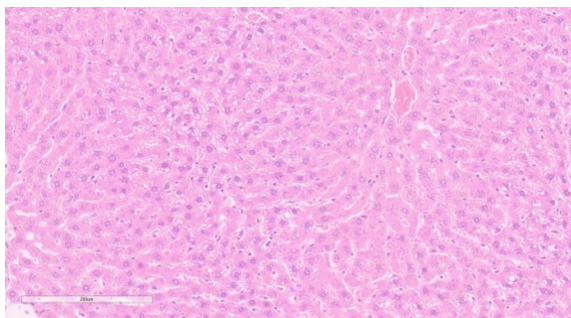
#### 4.2.2.12. Promena strukture očuvanosti tkiva

##### Jetra

Mikroskopskom analizom tkiva jetre uočena je laka hiperemija, laka kariomegalija pojedinih hepatocita i eozinofilna granuliranost citoplazme pojedinih hepatocita u kontrolnoj grupi, bez značajnijih morfoloških promena. U poređenju sa kontrolnom grupom u MIX 5 grupi uočene su izraženija hiperemija i kariomegalija hepatocita, kao i pojedini binuklearni hepatociti. Dodatno, uočena je i eozinofilna granuliranost citoplazme pojedinih hepatocita, nekroza pojedinačnih hepatocita, sitnokapljičasta masna promena hepatocita umerenog stepena, kao i sitni fokusi mononuklearnih inflamatornih ćelija. Slične promene uočene su i u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi, ali bez pojave sitnokapljičaste masne promene hepatocita. Preseci tkiva jetre prikazani su na Slici 38.

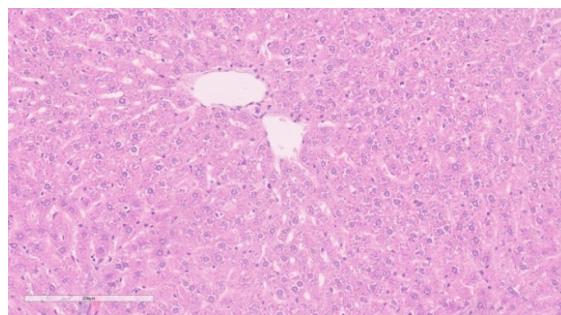
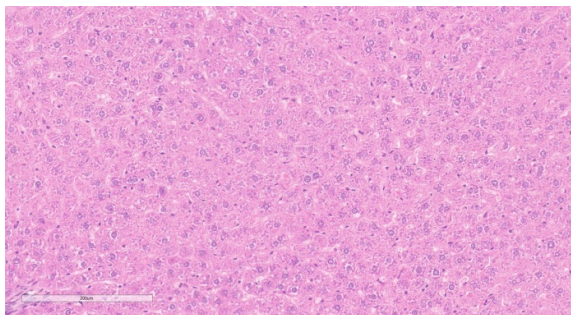
A

B



C

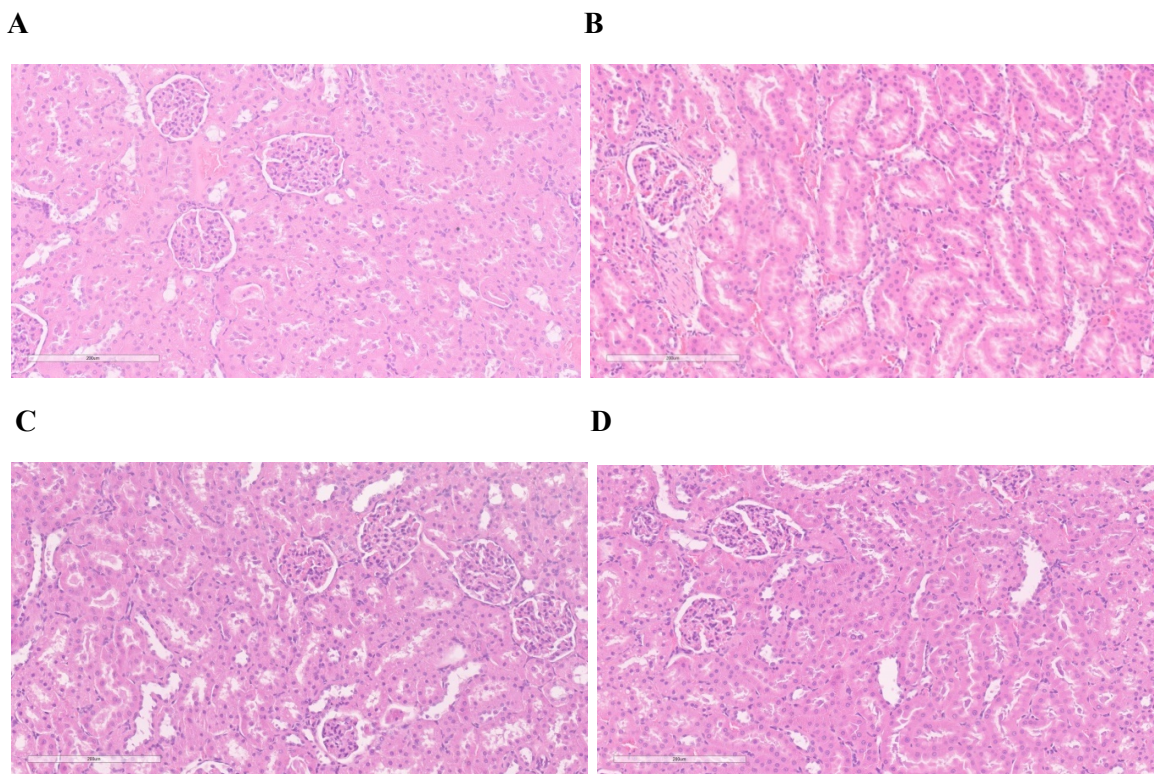
D



**Slika 38. Histološki prikaz jetre u (A) kontrolnoj, (B) MIX 5, (C) MIX 5 + P, (D) MIX 5 + SB grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja.** MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 * 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 * 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii*).

##### Bubreg

Mikroskopskom analizom tkiva bubrega uočena je laka hiperemija i utvrđeno je da kontrolna grupa nije imala značajnih morfoloških promena. U MIX 5, MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi uočena je izraženija hiperemija, degeneracija većeg broja tubulocita uz dilataciju kanalića i prisustvo hijalinih cilindara u pojedinim lumenima. Dodatno, u MIX 5 grupi uočeni su i fokusi infiltrata od mononuklearnih inflamatornih ćelija, dok su u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi uočeni fokusi infiltrata od mononuklearnih inflamatornih ćelija bili retki i diskretni. Preseci tkiva bubrega prikazani su na Slici 39.

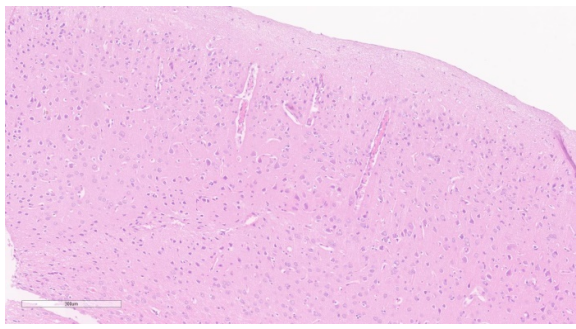


**Slika 39. Histološki prikaz bubrega u (A) kontrolnoj, (B) MIX 5, (C) MIX 5 + P, (D) MIX 5 + SB grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja.** MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii*).

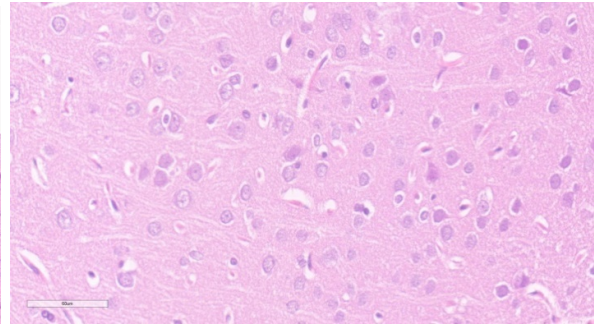
### Mozak

Histopatološkom analizom utvrđeno je da su, u poređenju sa kontrolnom grupom, u kojoj je uočena blaga hiperemija, edem i degeneracija pojedinih neurona, u MIX 5 grupi izraženija hiperemija, izraženiji edem, acidofilna degeneracija neurona, lakostepena glijoza i satelitoza. Slične promene kao i u MIX 5 grupi uočene su i u MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi, ali je edem bio lakšeg stepena. Preseci tkiva mozga prikazani su na Slici 40.

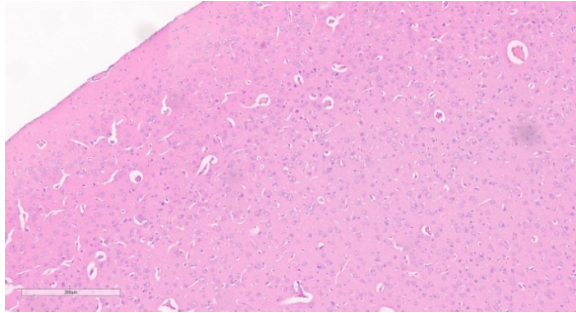




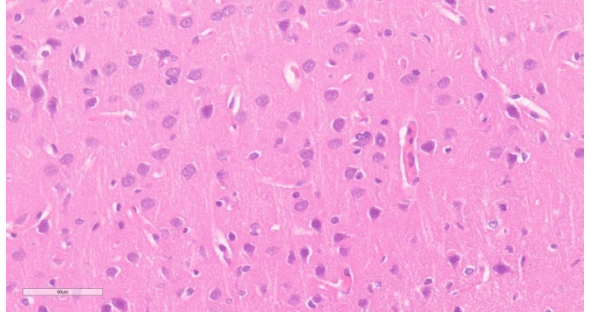
**C**



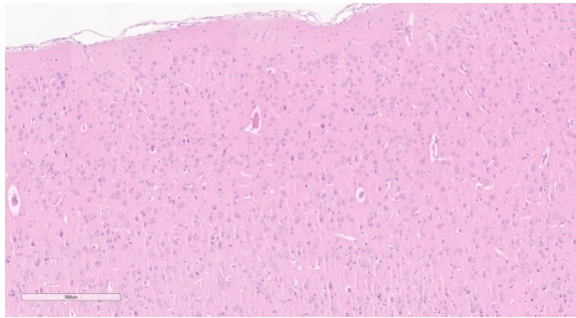
**D**



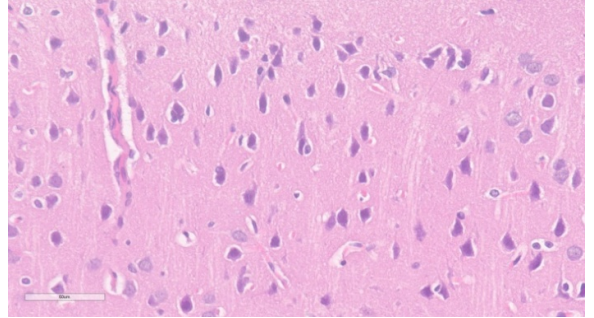
**E**



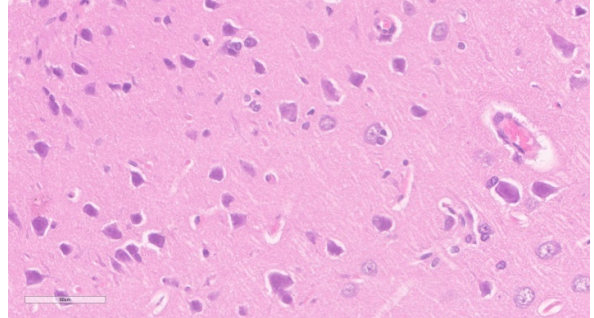
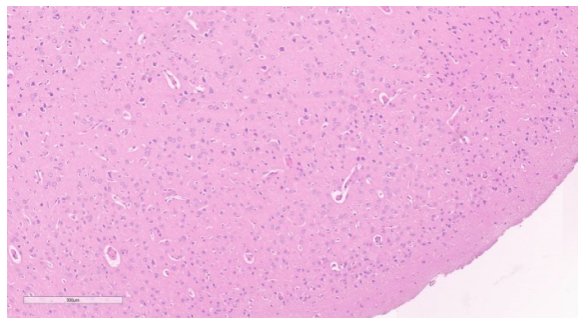
**F**



**G**



**H**

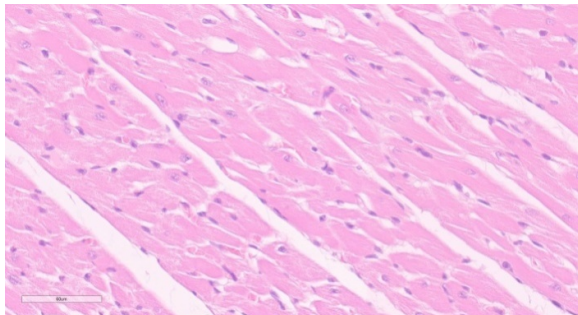


**Slika 40. Histološki prikaz jetre u (A, B) kontrolnoj, (C, D) MIX 5, (E, F) MIX 5 + P, (G, H) MIX 5 + SB grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*).**

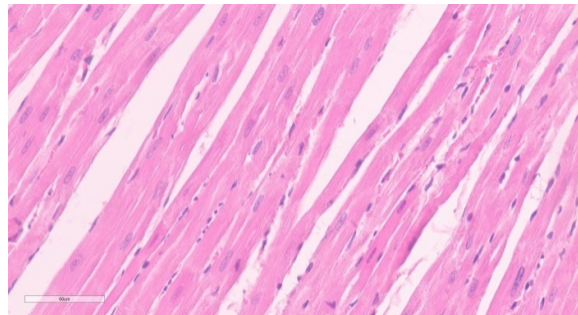
## Srce

Mikroskopskom analizom tkiva srca utvrđeno je da je kontrolna grupa bez značajnih promena. U miokardu svih životinja u MIX 5 grupi uočena je hiperemija, edem i leukostaza uz nekrozu pojedinačnih kardiomiocita. U MIX 5 + P grupi uočena je hiperemija, hipereozinofilija (degeneracija) pojedinačnih kardiomiocita i leukostaza, dok je u MIX 5 + SB osim hiperemije i leukostaze uz eozinofiliju, uočen i edem i nekroza pojedinačnih kardiomiocita. Preseci tkiva srca prikazani su na Slici 41.

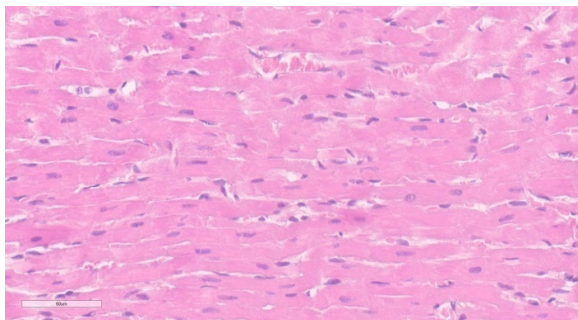
A



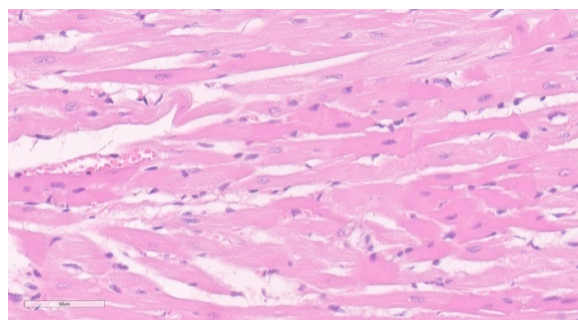
B



C



D

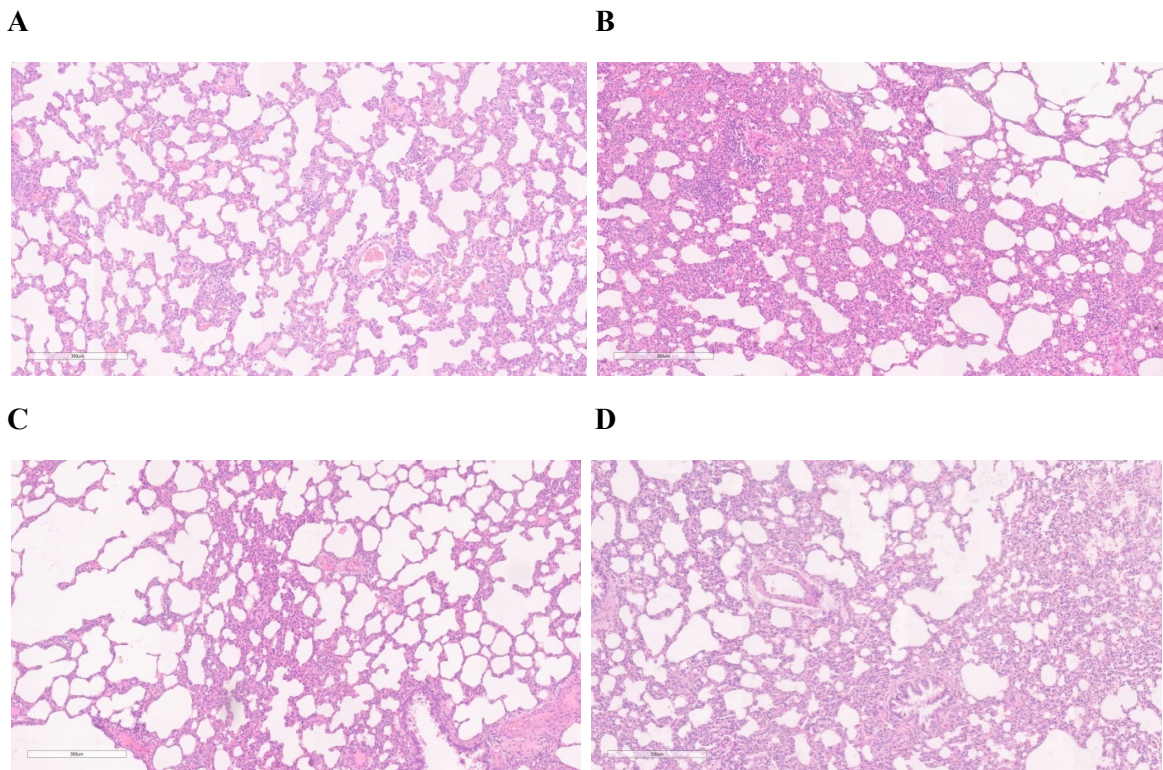


**Slika 41. Histološki prikaz srca u (A) kontrolnoj, (B) MIX 5, (C) MIX 5 + P, (D) MIX 5 + SB grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii*).**

## Pluća

Mikroskopskom analizom tkiva pluća utvrđeno je da je tkivo pluća kontrolne grupe regularne morfologije, bez fokalnih promena i značajne inflamacije. U poređenju sa kontrolnom grupom, uočeno je da u plućima svih životinja u MIX 5 grupi postoje veći fokusi zapaljenja. Takođe, uočeno je zadebljanje pojedinih alveolarnih septi zbog edema i inflamacije, uz lakostepeni inflamatorni eksudat u pojedinim alveolama, kolaps pojedinih alveola, spajanje pojedinih alveola u veće vazdušne prostore i veći broj limfocitnih agregata. U MIX 5 + P i MIX 5 + SB grupi uočeno je da su u plućima svih životinja manje izraženi fokusi zapaljenja i da je zapaljenje manje intenzivno nego u MIX 5 grupi. Dodatno, u MIX 5 +P i MIX 5 + SB grupi uočeno je zadebljanje pojedinih

alveolarnih septi zbog edema i inflamacije uz lakostepeni inflamatorni eksudat u pojedinim alveolama, kolaps pojedinih alveola, spajanje pojedinih alveola u veće vazdušne prostore i veći broj limfocitnih agregata. Preseci tkiva pluća prikazani su na Slici 42.



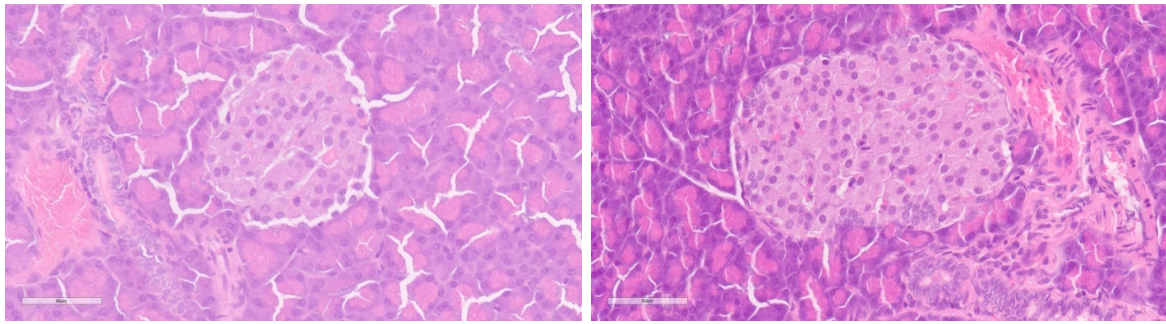
**Slika 42. Histološki prikaz pluća u (A) kontrolnoj, (B) MIX 5, (C) MIX 5 + P, (D) MIX 5 + SB grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*).**

## Pankreas

Mikroskopskom analizom tkiva pankreasa utvrđeno je da nije bilo značajnih promena u kontrolnoj. U MIX 5 grupi uočeno je da pojedine ćelije Langerhansovih ostrvaca imaju izratito eozinofilnu citoplazmu, kao i da su im jedra smanjena, kondenzovana i hiperhromatična. Promene koje su se javile u MIX 5 grupi anulirane su u MIX 5 +P i MIX 5 + SB grupi. Preseci tkiva pankreasa prikazani su na Slici 43.

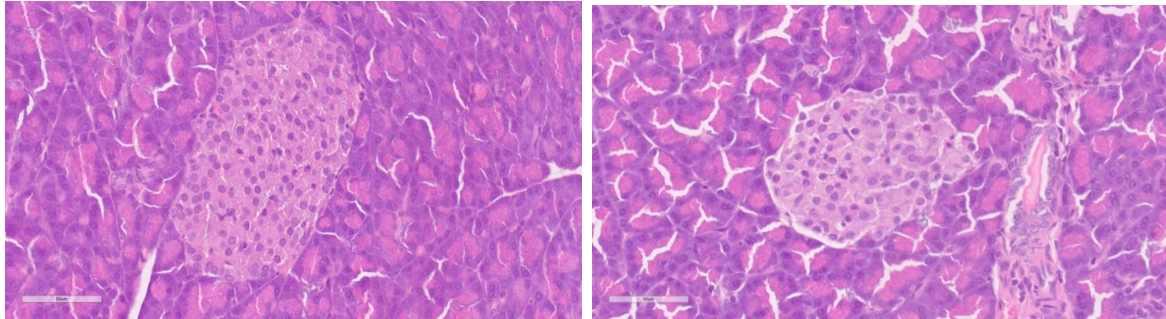
A

B



C

D



**Slika 43. Histološki prikaz pankreasa u (A) kontrolnoj, (B) MIX 5, (C) MIX 5 + P, (D) MIX 5 + SB grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*).**

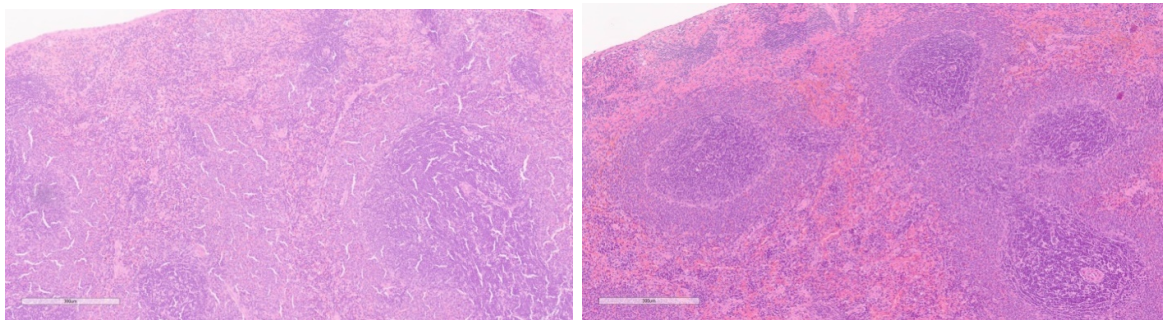
### Slezina

Mikroskopskom analizom tkiva slezine utvrđeno je da u svim analiziranim uzorcima postoji pasivna hiperemija i ekstramedularna hematopoeza.

Takođe, utvrđeno je da je tkivo slezine odgovarajuće građe odnosno regularne morfologije crvene i bele pulpe i u uzorcima kontrole i u uzorcima tretiranih grupa. Preseci tkiva slezine prikazani su na Slici 44.

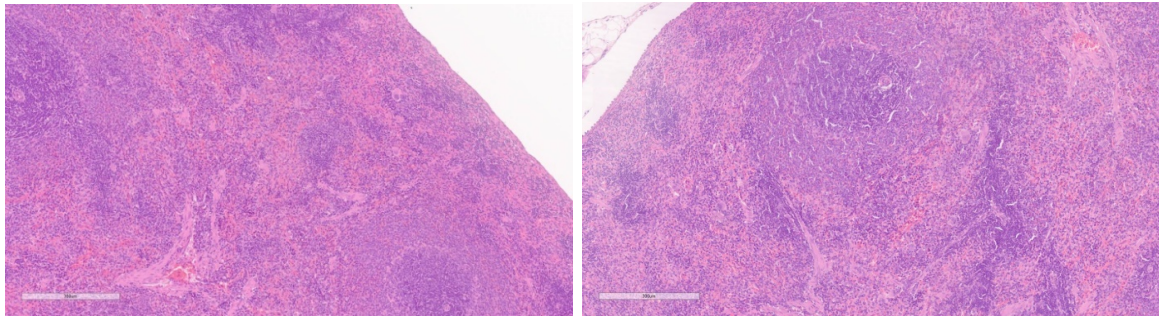
A

B



C

D



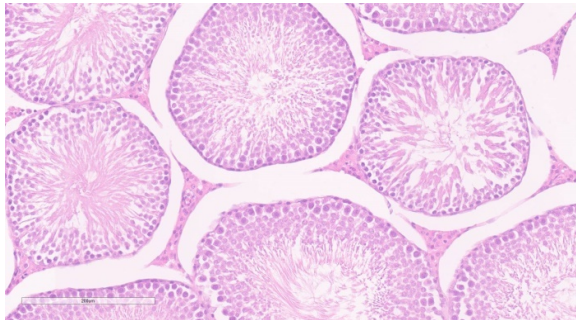
**Slika 44. Histološki prikaz slezine u (A) kontrolnoj, (B) MIX 5, (C) MIX 5 + P, (D) MIX 5 + SB grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja.** MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomysces cerevisiae* var. *boulardii*).

### Testisi

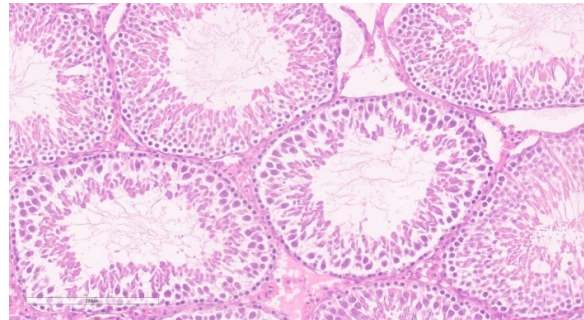
Mikroskopskom analizom tkiva testisa utvrđeno je da su u kontrolnoj grupi seminiferne tubule uobičajene veličine i oblika, obložene germinativnim epitelom i da su Leydigove ćelije odgovarajuće morfologije.

U MIX 5 grupi uočen je veći broj seminiferne tubule sa znacima atrofije, redukcija debljine germinativnog epitela i dilatacija lumena. U lumenu pojedinih seminiferne tubule tkiva iz MIX 5 grupe nalaze se deskvamovane ćelije germinativnog epitela (eksfolijacija), veći broj seminiferne tubule pokazuje znake atrofije, redukciju debljine germinativnog epitela, dilataciju lumena i narušen kontinuitet spermatogeneze (gubitak spermata), dok su Leydigove ćelije očuvane morfologije. Slične promene uočene su i u MIX 5 + P i u MIX 5 + SB grupi. Preseci tkiva testisa prikazani su na Slici 45.

**A**

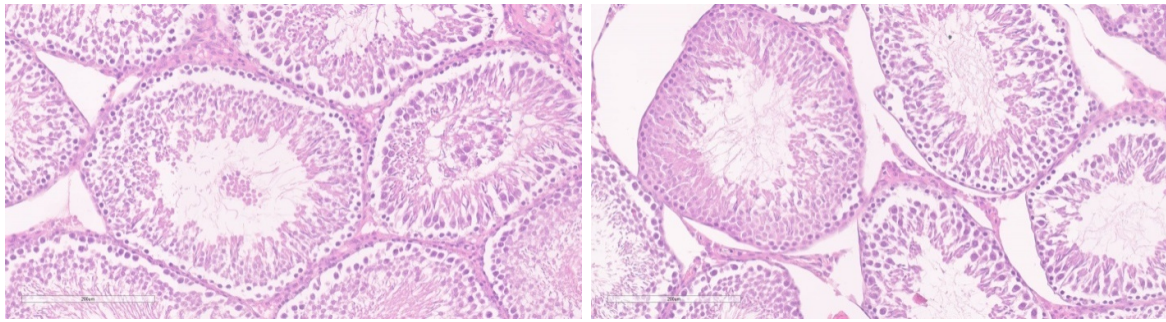


**B**



**C**

**D**

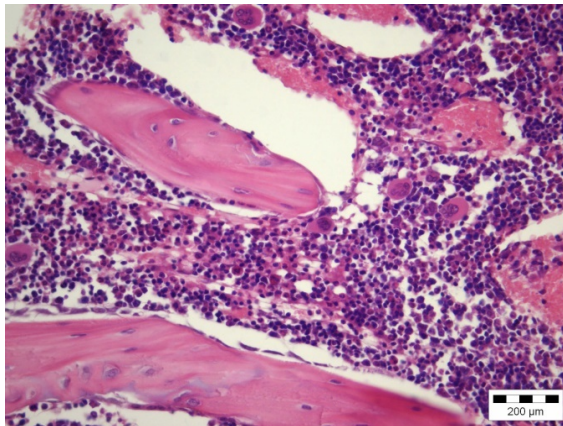


**Slika 45. Histološki prikaz testisa u (A) kontrolnoj, (B) MIX 5, (C) MIX 5 + P, (D) MIX 5 + SB grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomiscus cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomiscus cerevisiae* var. *boulardii*).**

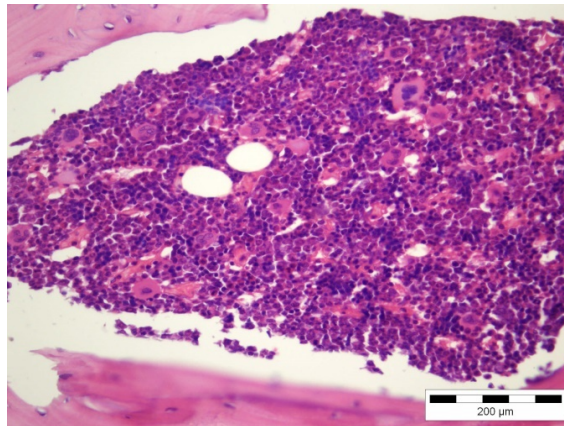
### Femur

Mikroskopskom analizom tkiva femura nisu uočene značajne morfološke promene ni u kontrolnoj ni u tretiranim grupama. Preseci tkiva femura prikazani su na Slici 46.

**A**

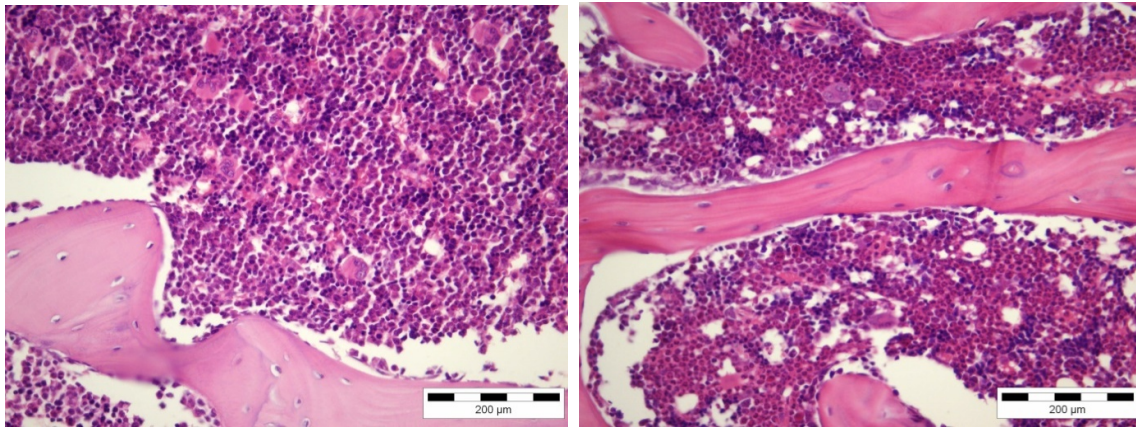


**B**



**C**

**D**



**Slika 46. Histološki prikaz femura u (A) kontrolnoj, (B) MIX 5, (C) MIX 5 + P, (D) MIX 5 + SB grupi kod pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB), dobijenih uz upotrebu Haematoxylin-Eosin bojenja. MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomiscles cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5,16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomiscles cerevisiae* var. *boulardii*).**

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Toksičnost smeše olova, kadmijuma, žive i arsena

#### 5.1.1. Subakutna toksičnost kod pacova

##### 5.1.1.1. Toksični efekti na parametre u krvi

Epidemiološki dokazi ukazuju da je istovremena izloženost toksičnim metalima povezana sa oksidativnim stresom, kao i sa promenama u hematološkim i biohemijskim parametrima (150,151). Dodatno, eksperimentalne studije na pacovima su ukazale da povećano oksidativno oštećenje uzrokovano toksičnim metalima može da utiče na razvoj štetnih efekata i hematološke parametre (152,153). Pb se ističe kao metal koji ispoljava štetne efekte na krv izazivajući oksidativni stres, ali i tako što pokreće brojne druge mehanizme toksičnosti poput inhibicije enzima, izmena u jonskoj homeostazi, epigenetske promene, indukciju inflamacije (154).

U istraživanju u okviru ove doktorske disertacije, većina pro-oksidativnih parametara je bila povećana u poređenju sa kontrolom, što se ogleda i u skorosti oksidativnog oštećenja koji je bio značajno različit od kontrolne vrednosti u svim grupama tretiranim smešom metala. Međutim, ukupni oksidativni balans značajno je narušen u MIX 1, MIX 2 i MIX 5, ukazujući da određeni dozni nivoi mogu imati veći uticaj na oksidativni stres u krvi pacova nakon subakutne izloženosti smeši Pb, Cd, Hg i As.

Profesionalna izloženost radnika u topionici metala pokazala je da kombinacija Pb i Cd narušava redoks status krvi, što se manifestuje promenama nivoa MDA, GSH, GST i 8-hidroksi-2'-deoksiguanozina, pri čemu su ove promene bile u korelaciji sa koncentracijama Pb i Cd u krvi (155). Dodatno, u studiji koju su sprovedeli Conterato i saradnici ispitivana je korelacija između oksidativnog stresa kod radnika u proizvodnji baterija i molera iz automobilske industrije, i nivoa Pb i Cd u krvi (156). Kod radnika je uočena povišena aktivnost GST koja je bila u korelaciji sa povećanjem nivoa Pb i Cd u krvi, a analiza korelacije ukazuje na sličan doprinos Pb i Cd povećanju aktivnosti ovog enzima (156). Promene u ostalim parametrima redoks statusa u krvi su se specifično menjale samo u odnosu na pojedinačne metale: povećane aktivnosti GPx i SOD bile su u korelaciji sa povećanim nivoom Pb, dok je povećanje aktivnosti CAT bilo u obrnutoj korelaciji sa porastom nivoa Cd u krvi. Ovi rezultati ukazuju da različiti odgovori organizma i tip interakcije između metala mogu zavisiti od specifičnih okolnosti profesionalne izloženosti radnika (npr. vrsta industrije i put izloženosti), što može uticati i na ispoljavanje toksičnih efekata (156).

Rezultati studije sprovedene na dve kohorte, koja je ispitivala povezanost između izloženosti metalima iz životne sredine, parametara oksidativnog stresa u krvi i raka prostate, pokazali su da pacijenti oboleli od raka prostate imaju povišene nivoe Hg u krvi (157). U istoj studiji primećeno je da pacijenti oboleli od raka prostate imaju povišene nivoe GPx i SOD i smanjen nivo SH grupa u krvi (157). Na osnovu ovih rezultata postoji pretpostavka da nivo Hg u krvi može imati uticaj na izmenjene oksidativne parametre u krvi pacijenata obolelih od raka prostate.

U istraživanju (158) je primećeno da su nivoi Pb i Cd u krvi mladunaca pacova tretiranih pojedinačnim metalima bili viši u poređenju sa grupom koja je primala njihovu smešu. Iako autori nisu analizirali promene oksidativnih parametara u krvi pacova, pretpostavlja se da ovi metali, kada se unesu putem gastrointestinalnog trakta, mogu međusobno interagovati zbog različitih afiniteta prema proteinskim transporterima (80). Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije ukazuju da su najviše koncentracije metala detektovane u MIX 5 grupi pri poređenju sa drugim doznim nivoima.

Interesantno je da je u studiji (154) uočeno smanjenje nivoa  $O_2^-$  i SOD u svim grupama tretiranim niskim dozama Pb. Različit odgovor u parametrima redoks statusa u krvi uočen je i u studiji (159) gde je u krvi pacova izloženih pojedinačnoj dozi Cd uočeno smanjenje nivoa AOPP, dok je u grupi tretiranoj smešom Pb i Cd uočeno značajno povećanje nivoa istog parametra. Različiti odgovori mogu se pripisati razlikama u dozi, sastavu smeše metala, dužini izloženosti ili interindividualnim razlikama.

Endokrini sistem ima ključnu ulogu u regulaciji metaboličkih procesa, održavanju homeostaze i prilagođavanju funkcija organizma različitim uslovima (160). Posebno je značajna njegova uloga u kontroli rasta, razvoja i reproduktivnih funkcija. Međutim, prisustvo endokrinih disruptora, uključujući toksične metal(oid)e, može narušiti hormonsku ravnotežu i dovesti do različitih zdravstvenih problema (5).

Štitasta žlezda, kao najveća endokrina žlezda sa bogatom vaskularizacijom, igra ključnu ulogu u regulaciji rasta i metabolizma. Tiroidni hormoni često se analiziraju u istraživanjima o uticaju toksičnih metala, ali dosadašnji rezultati pokazuju određena neslaganja – kako među različitim metalima, tako i pri izloženosti istim elementima. Stoga je neophodno sprovesti detaljnu analizu odnosa doze i odgovora kako bi se dobili precizniji zaključci (5).

U ovom istraživanju primećeno je blago povećanje nivoa tiroidnih hormona u grupama MIX 2, MIX 3 i MIX 4, dok je u grupi MIX 5 zabeleženo blago smanjenje. Značajnije povećanje nivoa fT4 uočeno je u grupama MIX 2 i MIX 4.

U studiji na životinjama, koju su sproveli Marić i saradnici ispitivani su efekti izloženosti smeši Cd, Pb, As, Hg, Cr i Ni tokom 28 i 90 dana kod mužjaka i ženki pacova. Rezultati su ukazali na veću osetljivost ženki, pri čemu su značajni efekti uočeni i pri nižim dozama. Subakutna izloženost dovela je do povećanja nivoa TSH, fT3 i T3 kod ženki, dok je subhronična izloženost kod mužjaka uzrokovala smanjenje TSH i fT3, uz istovremeni porast fT4. Promene su bile prisutne čak i pri dozama koje se smatraju bezbednim, što ukazuje na potencijalne zdravstvene rizike povezane s izloženošću ovim metalima (99).

U epidemiološkoj studiji kod radnika izloženih manganu ispitana je povezanost koncentracija različitih metala u krvi sa funkcijom štitne žlezde (161). Utvrđena je pozitivna korelacija između nivoa gvožđa i fT4, dok su promene u tiroidnim hormonima povezane sa mogućim oštećenjem dejodinaza – enzima ključnih za konverziju T4 u aktivni T3 (161). Takođe, autori su ukazali na mogućnost da poremećaji u transportu joda i interakcije metala sa tiroidnim receptorima mogu doprineti hormonskom disbalansu (161). Trebalo bi napomenuti da je u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije, u grupi izloženoj najvišoj dozi smeše metal(oid)a, primećeno smanjenje nivoa gvožđa, praćeno blagim smanjenjem tiroidnih hormona. Ova rezultati mogu ukazivati na potencijalnu ulogu gvožđa u metabolizmu tiroidnih hormona, bilo kroz njegovu ulogu u enzimskim procesima koji učestvuju u sintezi hormona, bilo kroz uticaj na aktivnost dejodinaza – enzima koji regulišu konverziju tiroksina (T4) u aktivni hormon trijodtironin (T3).

Takođe, prospektivna kohortna studija pokazala je da izloženost različitim metalima može značajno narušiti funkciju štitaste žlezde, od strukturnih promena u njenom parenhimu do hormonskog disbalansa (162). Kod radnika zaposlenih u industriji snabdevanja električnom energijom u gradu Baoding, Kina, utvrđena je negativna korelacija između nivoa As u krvi i ukupnog tiroksina (TT4) kao i aktivnosti perifernih dejodinaza (GT), što sugeriše moguću inhibiciju konverzije T4 u biološki aktivni T3 (162). Takođe, primećena je i negativna korelacija smeša metala sa ukupnim T4, što ukazuje na složene interakcije između metala i tiroidne homeostaze (162).

Dodatno, u epidemiološkoj studiji zasnovanoj na podacima iz Nacionalnog istraživanja o zdravlju i ishrani (*engl. National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES*) 2007–2012 utvrđena je negativna korelacija između nivoa As u krvi i nivoima T3 i T4, što je u skladu sa prethodnim

istraživanjima koja sugerišu da može delovati kao endokrini disruptor, potencijalno inhibirajući vezivanje T3 na nuklearne receptore i transkripciju gena (163). Kadmijum je uticao na povećanje nivoa T4, ali je istovremeno bio povezan sa smanjenjem T3 i odnosa T3/T4, naročito kod žena, što ukazuje na moguće ometanje konverzije T4 u aktivni T3 (163). Olovo je pokazalo pozitivnu povezanost sa nivoom T3 kod oba pola, kao i sa T4 kod žena (163). S druge strane, smeša svih metala (As, barijum, kobalt, cezijum, molibden, antimon, talijum, volfram i uranijum iz urina; Cd, Pb i Hg iz krvi) negativno je korelisala sa nivoima T3 i T4, što sugerise na složene interakcije između ovih metala (163). Nije utvrđena korelacija između smeše metala i nivoa fT3 i fT4.

U ovoj studiji primećeno je blago smanjenje testosterona u grupi MIX 5, dok je androstendion bio značajno povećan u MIX 1 grupi i blago povećan u MIX 2, MIX 3 i MIX 5 grupi. Slični rezultati su zabeleženi i kod *Wistar* pacova koji su tokom 90 dana bili oralno izloženi smeši niskih doza teških metala (PbCl<sub>2</sub>, 20 mg/kg; CdCl<sub>2</sub>, 1,61 mg/kg; HgCl<sub>2</sub>, 0,40 mg/kg), dok su za vreme trajanja eksperimenta hranjeni standardnom laboratorijskom hranom. Izloženost ovoj smeši izazvala je histopatološke promene u testisima i smanjenje nivoa testosterona u serumu pacova (164). Oštećenje Lejdigovih ćelija dovelo je i do smanjenja nivoa reproduktivnih hormona, uključujući testosteron, u krvi pacova koji su tokom 60 dana oralno izlagani smeši PbCl<sub>2</sub> (20 mg/kg), CdCl<sub>2</sub> (1,61 mg/kg), HgCl<sub>2</sub> (0,40 mg/kg) i Na<sub>2</sub>AsO<sub>3</sub> (10 mg/kg), pri čemu su pacovi tokom trajanja eksperimenta hranjeni standardnom laboratorijskom hranom (165). U NHANES studiji, visoki nivoi Pb u krvi i urinu dečaka uzrasta 12–19 godina, uz istovremeno niže koncentracije drugih metala, pokazali su značajnu povezanost sa smanjenim nivoima testosterona u krvi. S druge strane, kod devojčica iste starosne grupe, visoki nivoi Cd u krvi i urinu bili su povezani sa povišenim nivoom estradiola i smanjenim indeksom testosteron/estradiol (166). Ti rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja ukazuju na supresiju sinteze testosterona i poremećaj signalizacije između hipotalamusa i hipofize usled izloženosti olovu (166). Za razliku od Pb, veza između izloženosti Cd i polnih hormona kod dece nije sa sigurnošću potvrđena u postojećoj literaturi (166). Iako razlozi za ove razlike ostaju nejasni, moguće je da su delimično posledica varijacija u periodima izloženosti, kako u pogledu trajanja, tako i životne faze u kojoj je došlo do izloženosti kadmijumu, kao i potencijalnih polno specifičnih uticaja (166).

U opservacionoj studiji koja se bazirala na podacima iz NHANES anketa iz perioda 2013–2016. godine i obuhvatila 2728 odraslih osoba utvrđeno je da kombinovana izloženost metalima značajno narušava homeostazu hormona, pri čemu su industrijski zagađivači, poput Pb i Cd, negativno korelisali sa ukupnim nivoom testosterona i u studiji (167), dok su metali prisutni u vodi, poput barijuma (Ba) i talijuma (Tl), dodatno doprineli smanjenju globulina koji vezuje polne hormone, što može posredno smanjiti biodostupnost testosterona (167).

Analiza podataka iz studije kod ljudi pokazala je da su četiri metala (Cd, Hg, Cr, Ni) i metaloid As povezani sa povećanim rizikom od značajnih promena nivoa reproduktivnih hormona, uključujući testosteron, LH i FSH, kod muškaraca. Ustanovljen je odnos doza-odgovor između nivoa svih ispitivanih metala i hormona, pri čemu je najuži BMDI dobijen za odnose Cd-testosteron i Hg-LH, što ukazuje na visoku pouzdanost podataka (95). Takođe, utvrđeno je da Cd, As, Hg, Cr i Ni utiču na promene nivoa testosterona i kod žena. Iako je potvrđena povezanost svih metala sa hormonskim promenama, najuži BMDI pronađen je za odnose As-testosteron i Hg-testosteron (98).

Postoji ograničen broj studija koje su ispitivale uticaj metala na nivo androstendiona. *In vitro* istraživanje na ćelijama humanog H295R adrenokortikalnog karcinoma pokazalo je da metil-živa ne utiče na nivo testosterona i androstendiona. Međutim, utvrđeno je da smeša perzistentnih organskih zagađivača može delovati na steroidogenezu putem različitih mehanizama (168).

Povišen nivo androstendiona u grupama sa blagim smanjenjem testosterona uočen u ovoj studiji može ukazivati na poremećaj konverzije androstendiona u testosteron posredstvom 17β-hidroksisteroid dehidrogenaze ili na pojačanu konverziju testosterona u estrogen posredstvom aromataze, što dovodi do disbalansa u hormonskoj ravnoteži (169).

Pored androstendiona, koji se luči iz retikularnog sloja kore nadbubrežne žlezde, još dva hormona nadbubrežne kore pokazala su specifičan odgovor na tretman smešom metaloida. Aldosteron, koji se sintetise u glomeruloznom sloju kore nadbubrežne žlezde i igra ključnu ulogu u regulaciji ravnoteže natrijuma i kalijuma, kao i u održavanju krvnog pritiska. Kortizol, koji se luči iz fascikularnog sloja kore nadbubrežne žlezde i pripada glukokortikoidima, ima centralnu ulogu u odgovoru na stres, regulaciji metabolizma ugljenih hidrata, proteina i masti, kao i u modulaciji imunskog sistema (170).

U ovoj studiji uočeno je značajno smanjenje nivoa aldosterona u grupama MIX 3 i MIX 4, dok je nivo kortizola bio značajno snižen u grupi MIX 4.

Suprotan efekat metala uočen je u studiji sprovedenoj kod radnika u ciglanama u Pakistanu gde je značajno povećanje koncentracije kortizola zabeleženo kod ispitanika izloženih visokim nivoima Cd, Cr i Ni. Kao potencijalni mehanizmi delovanja, predloženo je da povećanje oksidativnog stresa i narušavanje funkcije antioksidativnih enzima doprinosi disregulaciji hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne ose, što može dovesti do poremećaja hormonske homeostaze i povećanja nivoa kortizola (171).

Epidemiološka studija sprovedena među stanovnicima severozapadne Kine pokazala je da su pojedinačni metali i smeše metala (Al, Cr, Cu, Zn, As, Se, Cd i Pb) povezani s disbalansom jona u serumu. Utvrđeno je da su nivoi aldosterona i deoksikortikosterona sniženi kod ispitanika izloženih ovim metalima, pri čemu su selen, olovo i arsen imali najveći uticaj. Negativna korelacija između nivoa ovih metala i deoksikortikosterona sugerise da mineralokortikoidi delimično posreduju u povezanosti između izloženosti metalima i poremećaja u homeostazi jona u serumu (172). Mogući mehanizmi ovog efekta uključuju kompetitivno vezivanje za mineralokortikoidne receptore, inhibiciju njihove transaktivacije, ometanje sinteze i regulacije kortikosteroida, kao i indukciju mitohondrijske disfunkcije, oksidativnog stresa i apoptoze (172). Iako su i u okviru istraživanja koje je obuhvatila ova doktorska disertacija, u pojedinim tretiranim grupama zabeležena sniženja nivoa aldosterona i kortizola, osim smanjenja koncentracije  $\text{Na}^+$  u grupi MIX 1 i  $\text{Fe}^{3+}$  u svim tretiranim grupama, nije utvrđen disbalans ostalih jona u serumu.

U ovoj doktorskoj disertaciji uočeno je da su svi dozni nivoi smeše metal(oid)a doveli do smanjenja nivoa renina u serumu pacova, dok su prethodna istraživanja pokazala da pojedinačni metali različito utiču na renin-angiotenzin sistem, što ukazuje na specifičan efekat metal(oid)ne smeše na ovaj sistem i krvni pritisak (173). Studija humanog biomonitoringa sprovedena u Kini otkrila je pozitivnu korelaciju između koncentracija smeše metala u krvi i pojave hipertenzije, pri čemu su Pb i As identifikovani kao ključni faktori rizika. Jedan od predloženih mehanizama delovanja olova na razvoj hipertenzije jeste povećanje nivoa renina u serumu (174).

#### 5.1.1.2. Toksični efekti na jetru

Jetra je ključni organ za metabolizam i akumulaciju metala (175,176). Poremećaji u funkciji jetre predstavljaju značajan faktor rizika za razvoj bolesti poput ciroze, masne jetre i hepatocelularnog karcinoma, što rezultira sa približno dva miliona smrtnih slučajeva godišnje (176,177). U kliničkoj praksi, enzimi i proteini u krvi poput AST, ALT, direktnog bilirubina, ukupnog bilirubina, indirektnog bilirubina,  $\gamma$ -glutamil transpeptidaze (GGT) i albumina služe kao specifični i osetljivi biomarkeri za procenu oštećenja jetre (178–180). Sve veći broj dokaza iz epidemioloških studija i studija na životinjama povezuje izloženost metalima s disfunkcijom jetre, što potencijalno doprinosi akutnoj ili hroničnoj insuficijenciji jetre (ALF) (181–183).

Rezultati studije sprovedene sa odraslim ispitanicima iz Korejske Nacionalne Ankete o Ekološkom Zdravlju (KoNEHS) pokazali su da su povišeni nivoi Pb i Hg u krvi i Cd u urinu značajno povezani s povećanim vrednostima jetrenih enzima AST, ALT i GGT, što ukazuje na oštećenje hepatocita

(184). Nacionalno istraživanje o zdravlju i ishrani pokazalo je pozitivnu korelaciju između nivoa kadmijuma u urinu i poremećene funkcije jetre koja se manifestovala povišenim vrednostima AST i ALT. Tokom programa kineskog mapiranja izloženosti i odgovora (*engl. Chinese Exposure and Response Mapping Program, CERMP*) uočena je povezanost između nivoa talijuma u urinu i disfunkcije jetre, koja se ogleda u poremećaju koncentracija jetrenih enzima i proteina (185). Istraživanje Wang i saradnika (2021) utvrdilo je vezu između koncentracija vanadijuma i bakra u urinu i oštećenja jetre koje se ogledalo u povišenim nivoima ALT. Dodatno, istraživanja na životinjama ukazala su na toksične efekte metala na jetru u vidu razvoja akutne insuficijencije jetre, poremećaja biohemijskih ili histoloških parametara (181). Međutim, istraživanja su se uglavnom bavila uticajem pojedinačnih metala, iako je populacija svakodnevno izložena širokom spektru smeša metala. Istovremeni efekti smeša metala na funkciju jetre i dalje nisu dovoljno istraženi.

Porast direktnog bilirubina, kao i smanjenje ALP u svim grupama koje su tretirane smešom metal(oid)a, ukazuju na štetan efekat smeše metala na jetru i potencijalni uticaj na žučne puteve (186). Smanjenje nivoa ALP na modelu mužjaka pacova potvrđeno je i u studiji koju su sproveli Zhu i sar. (2014), gde je ispitivan uticaj smeše Pb, Cd, Hg, As i Cr nakon 90 dana izloženosti. Svi dozni nivoi smeše metala doveli su do smanjenja nivoa ALP kod mužjaka pacova, međutim taj efekat nije uočen i kod ženki (187).

U studiji koju su sproveli (188) na modelu pacova uočen je porast ALP nakon izloženosti smeši As, Cd, Pb, Hg, Cr, Ni, Mn i Fe u trajanju od 60 i 90 dana. Uticaj dužine ekspozicije na promene u nivou ALP potvrđen je u istraživanju koje su sproveli Cobbina i saradnici (2015), gde su miševi koji su bili izloženi Pb, Hg i As pojedinačno, kao i smeši Pb+Hg+As i smeši Pb+Hg+Cd imali povišene vrednosti ALP nakon izloženosti od 30 dana. Međutim, u grupama tretiranim As, kao i smeši Pb+Hg+As, smeši Pb+Hg+Cd i smeši Pb+Hg+Cd+As nakon izloženosti od 90 dana, uočeno je smanjenje ovog parametra (189).

U istraživanju koje su sproveli Zhu i sar. (2014) ukupni bilirubin bio je smanjen i kod mužjaka i kod ženki (187). Nasuprot tome, ukupni bilirubin u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije nije bio značajno izmenjen, ali porast direktnog bilirubina u grupama tretiranim smešom metala ukazuje na defekt klirensa žuči ili nemogućnost žuči da dospe do tankog creva kroz žučne kanale (186). Uzrok tome može biti lezija jetre praćena smanjenjem broja ćelija hepatocita i može poremetiti preuzimanje indirektnog bilirubina iz plazme i smanjiti direktan transport i klirens bilirubina kroz žučne kanale (186).

Dodatno, u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije uočen je i smanjen nivo albumina u grupi tretiranoj najvišim nivoom doze smeše metal(oid)a. Ovaj efekat može biti indirektni pokazatelj oštećenja hepatocita, što je potvrđeno histopatološkom analizom i u skladu je sa rezultatima istraživanja drugih autora (93,187,188).

U ovom istraživanju uočene su najznačajnije promene u nivou Cd u jetri, koji je bio značajno povećan nakon tretmana višim doznim nivoima smeše ispitivanih metal(oid)a. Istraživanja sprovedena na različitim životinjskim modelima (zec, miš, pacov), uz primenu različitih doza Cd i različitih puteva izloženosti, pružaju dokaze koji ukazuju da je jetra primarni ciljani organ akutne izloženosti Cd (190). Dodatno, ove studije potvrđuju da je oksidativni stres ključni mehanizam toksičnog delovanja Cd u jetri (190). Dodatno, utvrđeno je da produžena istovremena izloženost toksičnim metalima oštećuje funkciju jetre indukcijom oksidativnog stresa (152).

Rezultati ovog istraživanja su ukazali da, iako su različiti dozni nivoi smeše metala doveli do varijabilnih efekata na parametre redoks statusa, indeks oksidativnog stresa bio je značajno različit u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolom, ukazujući na aditivan ili sinergistički uticaj metala na oksidativni balans u jetri. Dodatno, OXY skor bio je značajno različit u MIX 3 i MIX 4 grupi u poređenju sa kontrolom ukazujući na opseg doza smeše koji ima najveći uticaj na poremećaj oksidativnog balansa u tkivu jetre.

Sličan efekat ispitivanih metala na redoks status jetre potvrđuje studija autora Cobbina i saradnika. (2015), koja je na modelu miša pratila promene ovih parametara tokom 30, 60, 90 i 120 dana izloženosti, kako pojedinačnim metalima tako i njihovim kombinacijama (189). Najizraženije smanjenje aktivnosti SOD bilo je izraženo nakon 30 dana u svim tretiranim grupama, dok je smanjenje nivoa GSH uočeno u svim tretiranim grupama nakon 120 dana (189). Takođe, uočeno je marginalno povećanje MDA u svim tretiranim grupama nakon 60, 90 i 120 dana izloženosti (189).

Nasuprot tome, studija koju su sproveli (191) ispitivala je hronične efekte pojedinačne i kombinovane izloženosti pacova Pb, Cd i Mn i pokazala drugačije rezultate. Naime, nakon 9 meseci izloženosti, aktivnost SOD bila je značajno veća u Pb, Cd i Cd + Mn grupi u poređenju sa kontrolnim vrednostima, dok vrednosti GPx nisu bile značajno različite (191). Ove razlike mogu biti objašnjenje različitim sastavom smeše, dužinom izloženosti i primenjenim dozama. Dodatno, rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije ukazuju na kompleksne efekte smeše metala na parametre redoks statusa u jetri, imajući u vidu uočen antagonizam između dejstva Pb i Cd koji je nezavisan od puta izlaganja (80).

Neočekivan rezultat je da je nivo  $O_2^-$  bio smanjen u poređenju sa kontrolom u pojedinim grupama tretiranim smešom metala (MIX 2, MIX 3 i MIX 5). Pri izloženosti smeši metala, ovaj rezultat se može objasniti povećanjem nivoa SH grupa koje predstavljaju moćan mehanizam antioksidativne zaštite (192). U slučaju MIX 5 grupe, ovaj efekat može se pripisati sinergističkom dejstvu zaštite posredovane SH grupama i aktivnošću antioksidativnog enzima SOD, koji brzo uklanja kiseonične radikale ( $O_2^-$ ) kroz cikluse oksidacije i redukcije (193). Ovaj proces se odvija na aktivnom mestu enzima, gde prisustvo jona prelaznih metala omogućava katalitičku dismutaciju superoksidnog anjona u vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ), uz oslobađanje molekularnog kiseonika ( $O_2$ ) (193). U procesu eliminacije slobodnih radikala, SOD koristi esencijalne kofaktore poput Fe, Mn, Cu ili Zn za postizanje maksimalne katalitičke aktivnosti tokom metabolizma toksičnih intermedijera. Ovi kofaktori omogućavaju enzimima da efikasno prenesu elektrone na superoksidni anjon ( $O_2^-$ ) i regenerišu se u okviru katalitičkog ciklusa (194). Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije može se pretpostaviti da su Cu i Mn imali ključnu ulogu u održavanju homeostaze funkcije SOD, imajući u vidu da je u tkivu jetre u grupi MIX 4 i MIX 5 zabeležen povišen nivo Zn, dok je koncentracija Fe bila smanjena.

Varijabilni efekti različitih doza ispitivane smeše metala na parametre redoks statusa u jetri u ovom istraživanju, poput aktivnosti SOD, mogu se objasniti nemonotonim doznim odgovorom koji je primećen i u proceni efekata smeša drugih hemikalija na jetru (195). S obzirom na to da nelinearni doza-odgovor nastaje kao posledica modulacije različitih bioloških mehanizama, ovaj efekat je ključan za razumevanje uticaja produžene izloženosti smeši metala na parametre relevantne za funkciju jetre (195). Rezultati ovog istraživanja posebno ističu oksidativni stres i aktivnost SOD, koji predstavljaju specifične indikatore ovog tipa odgovora.

U ovom istraživanju su uočene izraženije histopatološke promene sa povećanjem doze smeše metala kojoj su pacovi bili izloženi. To je u skladu sa istraživanjem koje su sproveli (188) u kome je zaključeno da su histomorfološke promene u jetri pacova uočene uglavnom u grupi koja je 90 dana primala najvišu dozu smeše As, Cd, Pb, Hg, Cr, Ni, Mn i Fe. Međutim, u studiji koja je istraživala pojedinačne i kombinovane efekte Cd i As uočeno je da je As imao štetniji efekat na jetru od Cd ili njihove smeše. Nakon jednog meseca izloženosti As je uzrokovao svetlu, penastu i "vakuolisiranu" citoplazmu, dok su nakon 3 meseca izloženosti As uočene praznine tipa vakuola u citoplazmi i Kupferove ćelije u zidu sinusoida (196). Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da su i najviše doze pojedinačnih metala dovele do histopatoloških promena u jetri, ali da su se izraženije promene javile u njihovoj smeši. Značajno smanjenje relativne mase jetre u MIX 2, MIX 3, MIX 4 i MIX 5 grupi, ali u svim grupama tretiranim pojedinačnim metalima potvrđuje štetan efekat metala na jetru.

Pored toga, dislipidemija, koja uzrokuje nakupljanje masti u hepatocitima i remeti metabolizam i sekreciju lipida, prepoznata je kao značajan faktor u razvoju akutne disfunkcije jetre, ali i drugih poremećaja ovog organa (197). Sve više dokaza ukazuje na to da izloženost metalima može doprineti promjenama u lipidnom profilu i razvoju dislipidemije (183,198–200). U ovom istraživanju uočeno je smanjenje nivoa Tg u grupama tretiranim Cd, Hg i As, ali i u MIX 1, MIX 3, MIX 4 i MIX 5. Ovi rezultati su podržani rezultatima studije na modelu pacova u kojoj je zaključeno da je izloženost Mn i smeši Pb, Cd i Mn tokom 15 nedelja dovela do smanjenja nivoa triglicerida za 27,4%, odnosno 31%. Pretpostavlja se da uzrok smanjenja Tg nakon izloženosti metalima uključuje i mehanizme oksidativnog stresa (153). Takođe, u studiji koja je istraživala efekte niskih, srednjih i visokih doza smeše Pb, Cd, Hg, As i Cr na modelu pacova, uočeno smanjenje nivoa triglicerida pri izloženosti najvišoj dozi smeše kod mužjaka, dok je kod ženki značajno smanjenje u nivou ovog parametra uočeno u niskoj i visokoj dozi ispitivane smeše (187). U istraživanju u okviru ove doktorske disertacije smanjenje Tg može se povezati sa smanjenim nivoima  $O_2^-$  i povećanim nivoima SH grupa. Povećanje ukupnog holesterola u grupama tretiranim Pb i Hg je u skladu sa rezultatima studije (153), i može se pripisati sinergističkim promjenama u parametrima redoks statusa, poput povećanja nivoa TOS, MDA, AOPP i IMA, kao i smanjenju nivoa SH grupa i TAS. U istraživanju u okviru ove doktorske disertacije uočeno je i smanjenje HDL u MIX 5 grupi, kao i povećanje nivoa LDL u MIX 5 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom pri analizi sa grupama tretiranim pojedinačnim metalima. Imajući u vidu da je HDL anti-aterogeni lipoprotein i da ima sposobnost da pokreće proces obrnutog transporta holesterola, koji teži da “izvuče” višak holesterola deponovanog u ćelijama krvnih sudova putem razmene uz pomoć ATP-vezujućih transportera i vrati ga u jetru, visok nivo HDL se povezuje sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih oboljenja (153). Na osnovu rezultata istraživanja u okviru ove doktorske disertacije zaključuje se da najviša doza smeše metala poseduje pro-aterogena svojstva.

#### 5.1.1.3. Toksični efekti na bubrege

Bubreg je ciljni organ toksičnog dejstva metala zbog sposobnosti filtriranja, reapsorpcije i koncentrisanja dvovalentnih jona (201). Dodatno, jedan od glavnih puteva eliminacije je putem urina, a proksimalni tubuli su posebno osetljivi zbog visoke reapsorpcione aktivnosti (202).

Podaci iz Nacionalne ankete o zdravlju i ishrani (engl. National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES) ukazuju da su zajednička izloženost visokim nivoima Pb i bilo kog nivoa Cd i ukupe Hg negativno utiče na zdravlje bubrega (203). Međutim, u istoj studiji pokazano je da visoka izloženost Hg samostalno nije povezana sa oštećenjem bubrežne funkcije, definisane smanjenjem glomerularne filtracije ( $eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ ) ili povišenim albumin/kreatinin odnosom ( $ACR \geq 30 \text{ mg/g}$ ). Značajan negativan efekat uočen je tek kada je Hg prisutna zajedno sa visokim nivoima Cd i Pb, što ukazuje na mogućnost sinergističkog dejstva ova tri metala u narušavanju funkcije bubrega (203). Dodatno, utvrđena je povezanost između nivoa As, Cd, Pb i Hgu urinu i krvi, i verovatnoće nastanka bubrežnih kamenaca (204). Takođe, pokazano je i da se urinarna ekskrecija metala (Cd, Pb, Hg, As, dimetilarskanske kiseline, Sb, Ba, Be, Cs, Co, Mo, Pt, Tl, Tu, U) smanjuje sa opadanjem funkcije bubrega (205).

Obim i vrsta oštećenja bubrega zavise od samog metala, forme u kojoj se metal nalazi, primenjene doze, trajanja izloženosti, kao i od toga da li je organizam izložen pojedinačnom metalu ili kombinaciji metala (201,202). Nekoliko istraživanja je ukazalo na razlike u efektima na bubrege u zavisnosti od toga da li je organizam izložen pojedinačnim metalima ili njihovim smešama (202). Naime interakcije između metala mogu značajno uticati na efekte koje ostvaruje smeša metala na različite organe, pa i na bubreg (202). Na primer, istovremena primena Cd je umanjila štetne efekte Pb na bubreg pacova, što se manifestovalo smanjenjem intranuklearnih inkluzija u bubregu u poređenju sa grupom koja je bila tretirana samo Pb. Taj efekat je objašnjen *in vitro* rezultatima koji

ukazuju da je Cd konkurent Pb za vezivanje za proteine poput  $\alpha_2$ -mikroglobulina (202). Takođe, studije ukazuju da se u bubrezima može javiti kompeticija između proteina koji vezuju Pb i metalotioneina, pri čemu oba proteina imaju sposobnost da vezuju jone Cd i Zn, što može uticati na distribuciju i toksičnost ovih metala u ćelijama bubrega (206). Redosled izloženosti takođe može imati uticaj na interakcije među metalima (202). Na primer, predtretman As može delovati protektivno na toksične efekte izazvane Cd, dok obrnut scenario nije imao zaštitnog efekta (207). Pretpostavlja se da je uzrok ovog efekta interakcija Cd i As sa metalotioneinima i GSH (207). S druge strane, utvrđeno je da As i Cd deluju sinergistički, pojačavajući toksične efekte na bubrege kod ljudi (208). Dodatno, u istraživanju (209) primećeno je da zajednička izloženost Cd i Pb dovodi do povećanja nivoa urinarnih porfirina u odnosu na pojedinačnu izloženost Pb.

Međutim, interakcije metala na nivou bubrega nisu dovoljno istražene i postoji potreba za istraživanjem efekata nižih doza smeša metala koje simuliraju realnu izloženost ljudi.

Rezultati su pokazali da je nivo uree bio blago povišen u svim grupama tretiranim smešom metala, sa statističkom značajnošću u MIX 2 doznom nivou. Nivo mokraćne kiseline bio je blago povećan (bez statističke značajnosti) u svim tretiranim grupama, sa najizraženijim efektom u MIX 1 doznom nivou.

Cobbina i saradnici (2015) su došli do sličnih zaključaka u studiji na miševima, gde je nakon 30 dana izloženosti Pb uočeno smanjenje nivoa uree, dok je nakon 90 dana izloženosti smanjenje uree bilo evidentno i u grupi tretiranoj Cd i u grupama koje su tretirane smešama ispitivanih metala. U istoj studiji uočeno je povećanje nivoa kreatinina u grupama tretiranim i pojedinačnim metalima i njihovom smešom nakon 30 dana izloženosti, što je osetljiviji parameter oštećenja bubrega nego nivo uree (189). Interesantno je da je u istoj studiji primećeno da je vremenom (120 dana izloženosti) nivo kreatinina u krvi životinja opao, što se pripisuje razvoju odbrambenih sistema u organizmu (189). Studije na pacovima su pokazale različite rezultate u vrednostima parametara koji opisuju stanje bubrega. Naime, Jadhav i sar. (2007a) su nakon 90 dana uočili povećanje nivoa uree i kreatinina u višim doznim nivoima smeše metala As, Cd, Pb, Hg, Cr, Ni, Mn i Fe, dok su Zhu i sar. (2014) uočili razlike u odgovoru mužjaka i ženki pacova nakon 90 dana izloženosti smeši Pb, Cd, Hg, As i Cr. Kod mužjaka je uočen povišen nivo uree u najvišem doznom nivou smeše, dok je u srednjem doznom nivou smeše uočeno smanjenje nivoa kreatinina (187). Kod ženki je uočen povišen nivo uree u srednjoj i najvišoj dozi smeše, nivo kreatinina bio povećan u srednjem doznom nivou smeše (187). Dodatno, razlike u nivou uree i kreatinina pri tretiranju mužjaka i ženki pacova različitim doznim nivoima kompleksnije smeše Cd, Pb, Hg, Cu, Zn, Mn, Cr, Ni nisu uočene u poređenju sa kontrolnom vrednošću. Međutim, kod ženki pacova je uočeno značajno smanjenje nivoa uree u grupi koja je primala najvišu dozu smeše u poređenju sa niskom i srednjom dozom smeše (93). Može se pretpostaviti da su razlike u odgovoru uzrokovane razlikom u ispitivanom organizmu, sastavu smeše, dužinom ekspozicije i polnim razlikama.

Imajući u vidu da je oksidativni stres važan mehanizam toksičnosti gotovo svih toksičnih metala, važno je razumeti njegovu ulogu u oštećenju bubrega izazvanu smešom Pb, Cd, Hg i As (210). U istraživanju u okviru ove doktorske disertacije primećen je povećan nivo TOS i AOPP u MIX 3 i MIX 4 grupi, dok je nivo PAB bio povećan u MIX 4 grupi, a nivo IMA u MIX 3 grupi. Nivo MDA bio je smanjen u MIX 3, MIX 4 i MIX 5 grupi, što se može povezati sa smanjenim nivoom Fe u tkivu bubrega. Interesantno je i da je većina pro-oksidativnih parametara imala sličan tip odgovora, odnosno smanjenje u MIX 1 grupi, povećanje u MIX 2, MIX 3 i MIX 4 grupi, a zatim ponovo smanjenje u MIX 5 grupi. Ovakav tip odgovora se može pripisati NMDR. U studiji Vukelić i sar. (2024) koja je ispitivala uticaj Cd, Pb, Ni, Cr, As i Hg na bubrege, uočeno je da nema značajnih promena u nivou SOD, što je u skladu sa rezultatima istraživanja u okviru ove doktorske disertacije. Nasuprot tome, u studiji (210), uočeno je povećanje nivoa MDA i kod mužjaka i kod ženki, dok je nivo GSH bio smanjen samo kod mužjaka. Ovakav rezultat autori objašnjavaju smanjenom aktivacijom Nrf2 signalnog puta, što je dovelo do slabije antioksidativne zaštite kod mužjaka u

poređenju sa ženka (210). Cobbina i sar. (2015) su uočili da je nivo MDA bio značajno povećan u grupi miševa tretiranih Hg nakon izloženosti u trajanju od 30 dana i u grupi miševa tretiranih smešom Pb i As nakon izloženosti u trajanju od 90 dana (189). U istoj studiji uočeno je i smanjenje nivoa SOD u grupama tretiranim pojedinačnim dozama Pb, Hg i As, smeše Pb i Hg, ali i smeše Pb, Cd, Hg i As. Dodatno, Cobbina i saradnici su utvrdili da je nivo GPx bio marginalno smanjen u većini tretiranih grupa (189).

U istraživanju u okviru ove doktorske disertacije najizraženije histopatološke promene uočene su u MIX 3, MIX 4 i MIX 5 doznom nivou. Ovi rezultati bili su u skladu sa drugim istraživanjima (187,188,211).

U ovom istraživanju najizraženije histopatološke promene javile su se u grupama gde su detektovane i najviše koncentracije ispitivanih metal(oid)a u tkivu bubrega, što ukazuje na njihovo sinergističko dejstvo.

Imajući u vidu da su bubrezi kritični organi kod produžene izloženosti Cd (190),, važno je napomenuti da se nakon produžene izloženosti Cd u trajanju od 85 dana javilo povećanje nivoa Zn i smanjenje nivoa Fe u bubrezima, dok nivo Cu nije bio izmenjen (212). Slični rezultati dobijeni su i u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije u MIX 5 grupi. Interesantno je da su niske doze smeše (MIX 1 i MIX 2) uzrokovale smanjenje nivoa Cu, dok je u višim doznim nivoima (MIX 3, MIX 4 i MIX 5) uočeno smanjenje nivoa Fe. Može se pretpostaviti da je disbalans u nivou Cu u grupama tretiranim nižim doznim nivoima smeše povezan sa promenama u nivou uree i mokraćne kiseline, dok je disbalans u nivou Fe u grupama tretiranim višim doznim nivoima smeše povezan sa promenama u pojedinim pro-oksidativnim parametrima, kao i histopatološkim promenama u bubregu.

#### 5.1.1.4. Toksični efekti na mozak

Toksični metali u smeši mogu međusobno interagovati, izazivajući sinergističke ili antagonističke efekte, što je predmet istraživanja pojedinih studija, posebno u kontekstu nervnog sistema (213). Dosadašnje studije na životinjama ispitivale su kombinovani uticaj metala, ali su koristile više dozne nivoe i manje složene smeše, često uključujući izlaganje u ranoj fazi razvoja (214–219). Većina istraživanja fokusirala se na neurobihevioralne efekte, dok ovo istraživanje obuhvata širi spektar mehanističkih parametara (214–217,219). Iako postoje podaci o BMD za pojedinačne metale, nedostaju podaci za njihovu smešu (137,220). Referentne doze su izvedene za kognitivne smetnje kod dece izložene Pb (0,54 µg/kg t.m./dan), As (1,3 µg/kg t.m./dan) i Hg (0,1 µg/kg t.m./dan) (221), dok je sprovedena i procena rizika kombinovane izloženosti Pb, Cd i Hg kod starijih osoba u Kini (222).

Međutim, i dalje postoje ključna pitanja u proceni rizika smeša metala, kao što su određivanje praga za određene krajnje tačke neurotoksičnosti i određivanju osetljivih markera inicijalnog oštećenja. Ova studija je procenila neurotoksične efekte izazvane smešom Pb, Cd, Hg i As u različitim rasponima niskih doza kroz sveobuhvatnu analizu promena u ponašanju, relativne težine mozga, parametara redoks statusa u moždanom tkivu, strukture moždanog tkiva i aktivnosti AChE. Takođe, profilisanjem odnosa doza-odgovor kroz određivanje sigurnosnih intervala BMD za dozu metala u vezi sa ispitivanim parametrima, ustanovljeni su osetljivi markeri za različite neurotoksične efekte.

Dobro je poznato da toksični metali mogu uticati na neurobihevioralne promene (223,224). Međutim, smeše metala mogu izazvati složen odgovor usled istovremenog izlaganja različitim komponentama (225). Na primer, izlaganje smeši Pb, Cd i Hg tokom rane faze razvoja rezultiralo je izmenjenom motoričkom aktivnošću kod *Sprague-Dawley* pacova, što se manifestovalo ubrzanom

tempom kretanja, povećanim ukupnim pređenim putem i dužim vremenom provedenim u centralnoj zoni (215). S druge strane, izloženost zrelog mozga pomenutoj smeši nije uticala na kognitivne funkcije (215). Ovi rezultati su ukazali na uticaj izlaganja metalima na kognitivne performanse tokom ključnih faza razvoja mozga. Pored toga, ista grupa istraživača je na modelu pacova pokazala da je izlaganje istoj smeši metala dovelo do dozno-zavisnog oštećenja sposobnosti učenja, pamćenja i radne memorije (219). Dodatni rezultati su pokazali da istovremeno izlaganje niskim dozama Pb, Cd i Hg može uticati na oštećenje pamćenja remećenjem dinamike dendritske kičme putem signalnih puteva vezanih za orezivanje dendritične kičme (219). Pored toga, subakutna koizloženost ovoj ternarnoj smeši metala uzrokovala je značajno smanjenu motoričku koordinaciju i poremećaje sposobnosti učenja i pamćenja kod miševa ometanjem dopaminergičke i serotoninergičke neurotransmisije u strijatumu (216). Dodatno, Rai et al. (2010) su otkrili da istovremena izloženost Pb, Cd i As tokom razvoja mozga izaziva hiperlokomociju zavisnu od doze i smanjene funkcije pamćenja učenja kod pacova (226). Pored toga, mužjaci pacova su imali oštećenu retencionu memoriju kada su istovremeno bili izloženi Pb, Cd, Hg i As, pokazujući značajno manji period latencije bekstva u grupi izloženoj metalima u poređenju sa kontrolom (227). Andrade i saradnici (2014) su primetili smanjenu motoričku aktivnost (hodanje i uspinjanje) u grupi koja je istovremeno bila izložena As, Mn i Pb u poređenju sa kontrolom (82,228). Nasuprot tome, Cobbina i saradnici (2015) nisu pronašli statistički značajne varijacije u latencijama bekstva i brzini plivanja koje su povezane sa izlaganjem kvaternarnoj smeši Pb, Cd, Hg i As na prostorno učenje i pamćenje kod miševa tokom Morisovog testa vodenog lavirinta. Međutim, miševi izloženi ternarnoj smeši Pb, Hg, Cd tokom 30-dnevnog perioda bili su izuzetak u odnosu na ostale tretirane grupe, što se vidi po njihovoj umereno visokoj latenciji bekstva i maloj brzini plivanja (189). Istraživanje u okviru ove doktorske disertacije nije pokazalo značajnu varijabilnost među grupama u pogledu spontane lokomotorne aktivnosti, a najznačajniji efekat je primećen kod najvećeg doznog nivoa. U poređenju sa rezultatima ovog istraživanja, u većini prethodnih studija primećene su značajne promene u lokomotornoj aktivnosti i pamćenju, koje se potencijalno mogu pripisati znatno višim primenjenim dozama. Razmatrajući vreme istraživanja novog objekta, u grupi MIX 5 su primećene najznačajnije promene u zaboravljanju poznatih objekata. Pozitivni DI ukazuje da su pacovi iz grupe MIX 1 istraživali novi objekat značajno duže od poznatog, što se može pripisati hormetičkom efektu doza-odgovor, gde produženo izlaganje niskim dozama potencijalno štetnih supstanci može stimulisati organizam, dok veće doze mogu delovati suprotno ili umanjiti ove stimulatívne efekte (229). Ovo sugeríše da proučavani metali mogu da modulišu specifične karakteristike ponašanja, u zavisnosti od nivoa izloženosti. Aktivacija gena uključenih u fiziološku adaptaciju može dovesti do kompenzatorne reakcije, obezbeđujući zaštitu od unutrašnjih i spoljašnjih stresora, potencijalno objašnjavajući mehanizam za efekte veoma niskih doza (229). U skladu sa navedenim, prethodna istraživanja su pokazala da izloženost veoma niskim nivoima smeša hemikalija (znatno ispod doza koje proizvode toksične efekte) ima stimulatívni efekat zavisan od doze na nervni sistem, a pre nego njegovu supresiju (230–232).

U ovom istraživanju, relativna težina mozga je značajno povećana u grupama MIX 1 i MIX 4 u poređenju sa kontrolnom grupom. Ovo povećanje se može tumačiti kao odbrambeni mehanizam povezan sa ovim doznim nivoima ili kao posledica histopatoloških promena. Slično, srednji i viši dozni nivoi složene smeše metala koje se sastoje od As, Cd, Pb, Hg, Cr, Mn, Fe i Ni uzrokovali su značajno veću težinu mozga subhronično izloženih pacova putem vode za piće (188). Zanimljivo je da je u studiji u kojoj je ispitivano subhronično izlaganje smeši metala koja se sastoji od As, Cd, Pb, Hg, Cr primećeno značajno povećanje relativne težine mozga samo kod mužjaka pacova tretiranih najvećom dozom, dok ženke pacova nisu pokazale razlike među grupama (187). Ovi rezultati impliciraju da je subhronična istovremena izloženost As, Cd, Pb, Cr i Hg imala izraženiji uticaj na mužjake pacova u poređenju sa ženkama pacova (187). Međutim, istovremena izloženost Pb, Cd, Hg i As nije uticala na težinu malog mozga u studiji (227).

Kao zajednički mehanizam neurotoksičnosti za različite metale, oksidativni stres ima poseban značaj kao mehanizam toksičnosti smeše metala (233). Oksidativni stres može se definisati kao

neravnoteža između stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta i mehanizama antioksidativne odbrane (234). Povećani nivoi reaktivnih kiseoničnih vrsta narušavaju signalnu transdukciju i izazivaju oksidativna oštećenja makromolekula. Pošto su parametri oksidativnog stresa pokazali osetljivost u proceni efekata i visokih i niskih doza, oni predstavljaju značajne krajnje tačke u proceni toksičnosti smeša metala pri niskim dozama (235).

Povišeni oksidativni stres karakterisan pojačanom peroksidacijom lipida primećen je u različitim delovima mozga kod pacova izloženih ternarnoj smeši As, Cd i Pb od 5. dana gestacije do 180. postnatalnog dana (236). Slični rezultati su dobijeni kod odraslih mužjaka pacova izloženih kvaternarnoj mešavini Pb, Cd, Hg i As tokom perioda od 60 dana, pri čemu su zabeleženi povišeni nivoi malondialdehida (MDA) i azot oksida (NO) u moždanoj kori i malom mozgu u poređenju sa kontrolnom grupom (227). Pored toga, ova studija je otkrila značajno smanjenje nivoa SOD, katalaze (CAT) i GSH u istim delovima mozga (227). Zanimljivo je da je u studiji na miševima subhronično izloženim binarnim, ternarnim i kvaternarnim mešavinama Pb, Cd, Hg i As zabeležen značajan pad aktivnosti parametara antioksidativne zaštite u mozgu (SOD, CAT, ukupni antioksidativni kapaciteti (TAOC) i blagi porast MDA nakon 30- i 60-dnevnog perioda izlaganja (189). Značajno smanjenje nivoa SOD zabeleženo je kod grupe Pb + Hg + Cd nakon 90- i 120-dnevnog izlaganja, dok je nivo MDA bio povećan nakon 90 dana. Ovi rezultati sugerišu da interakcije metala i dužina trajanja izloženosti mogu imati ključni uticaj na promene u parametrima oksidativnog stresa (189). Ovi rezultati takođe opisuju početne faze oksidativnog stresa u mozgu miševa i u skladu su sa rezultatima istraživanja Zhanga i saradnika (2009), u kome su zabeleženi smanjeni antioksidativni parametri (SOD, TAS i glutation peroksidaza (GPx)) nakon izlaganja binarnoj smeši Pb i Cd (237). U modelu neurodegeneracije izazvane metalom, 90-dnevno izlaganje smeši aluminijuma (Al), Cd i fluora (F) značajno je izazvalo prooksidativne parametre (supstance reaktivne sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS) i nivoa NO) u uzorcima hipokampusu i smanjenje nivoa parametara antioksidativne odbrane (GST, GPx, SOD i GSH) u poređenju sa kontrolnom grupom (238). Iako model akutne izloženosti nije najsveobuhvatniji za procenu neurotoksičnosti zbog hronične izloženosti ovim mešama u scenarijima iz stvarnog života, on može dati osnovu za dalje modele izloženosti (subakutni ili subhronični). Na primer, akutna izloženost smeši Pb i Cd izazvala je povećanje prooksidativnog parametra MDA u moždanom tkivu pacova (239), dok promene u AOPP,  $O_2^-$ , SOD, SH i TOS nisu primećene. Sa druge strane, povećanje TAS-a u grupi tretiranoj mešom Pb i Cd implicira povećanje kompenzacionih mehanizama. Ovo sugerišu da su ovi metali možda uzrokovali povećanje proizvodnje ili preraspodele antioksidanata, na kraju vraćajući ravnotežu između oksidanata i antioksidanata na normalne nivoa (240). Za razliku od akutnog izlaganja, produžena izloženosti mešama metala može umanjiti zaštitu antioksidativnih enzima i usmeriti homeostazu ka stanju oksidativnog stresa (241,242). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su prooksidativni parametri povećani u većini tretiranih grupa, dok se primetno povećanje antioksidativnih parametara prvenstveno javilo u višim doznim nivoima. Ove promene su uticale na vrednosti OXY skora ukazujući na doze MIX 1 i MIX 2 kao ključne za promene u oksidativnom balansu. Značajno povišene vrednosti OSI skora primećene su u grupama MIX 2 i MIX 4, pri čemu su se najuočljivije promene desile u grupi MIX 4, što se pripisuje smanjenom TAS. Zanimljivo je da je u nižim dozama (MIX 1, MIX 2) zabeležen povećan nivo MDA i smanjen nivo GSH, dok je u većim dozama (MIX 3, MIX 4, MIX 5) zabeležen smanjen nivo MDA i povećan nivo GSH, što sugerišu potencijalni nemonotoni odgovor na dozu (NMDR). Ovi rezultati ukazuju na opsege doza smeše metala koje su pokazale uticaj na oksidativnu homeostazu u mozgu. Važno je istaći da je tretman mešom metala doveo do povišenih nivoa u većini ispitivanih prooksidativnih parametara (TOS, PAB,  $O_2^-$ , IMA, AOPP), prevazilazeći efekat pojedinačnih metala. Radi poređenja, uočene promene u prooksidativnim parametrima bile su ili manje značajne ili nisu postojale u grupama izloženim pojedinačnim metalima, dodatno naglašavajući efekte smeše. Ovo naglašava složenost i potencijalno aditivne ili sinergističke prooksidativne efekte izazvane istovremenim izlaganjem Pb, Cd, Hg i As.

Histopatološka analiza u ovom istraživanju ukazala je na sledeće specifične promene: satelitozu, degeneraciju neurona i fokalnu gliozu. Ove promene su bile najizraženije u MIX 2 grupi; edem i hiperemija su bili najuočljiviji u grupi MIX 5; vazokongestija i krvarenje su bili najznačajniji u grupi MIX 3. Rezultati ove studije su pokazali da su primećene različite promene u odnosu na dozni nivo. Edem mozga može objasniti povećanu težinu organa u grupi MIX 5 (188). Ovi rezultati su bili u skladu sa prethodnim studijama koje su imale za cilj da procene uticaj izloženosti smeši metala na histopatološke promene u mozgu. Izloženost Pb, Cd i Hg izazvala je edem moždanog tkiva, izazivajući apoptozu nervnih ćelija, oksidativni stres i preopterećenje kalcijumom kod pacova (218). Ikpeama et al. (2023) su uočili hipertrofiju ćelija i pojavu vakuola, kao i blagi gubitak ćelija u srednjim i granularnim slojevima nakon izlaganja smeši Pb, Cd, Hg i As (227). Pored toga, srednje i veće doze složene smeše Pb, Cd, Hg, As, Cr, Mn, Fe i Ni izazvale su značajne promene u kongestiji, sporadičnim hemoragijama i satelitozi u moždanoj kori (188). Pored toga, nekoliko studija je otkrilo fokalnu gliozu oko degenerišućih neurona kao odgovor centralnog nervnog sistema na oštećenja povezana sa izlaganjem smešama metala (188,243). S druge strane, u studiji u kojoj su ispitani štetni efekti različitih nivoa doziranja smeša metala nisu pronađene značajne histopatološke abnormalnosti u mozgu ni za jedan određeni nivo doze u poređenju sa kontrolnom grupom (187).

Eksperimentalni rezultati ove doktorske disertacije pokazali su dozno-zavisno smanjenje aktivnosti enzima AChE. Uočene su značajne promene u višim doznim nivoima primenjene smeše metala (MIX 3, MIX 4 i MIX 5). Zanimljivo je da su pojedinačni metali u dozama MIX 5 opsega pokazali značajno smanjenje enzima AChE u mozgu. Štaviše, primena pojedinačnih doza Pb ekvivalentnih onima prisutnim u MIX 3, MIX 4 i MIX 5 dovela je do smanjene aktivnosti AChE, sugerišući da ovaj metal u navedenim dozama učestvuje u izazivanju holinergičkih promena (137). Međutim, postoje i kontradiktorni rezultati iz studije Ikpeama i saradnika (2023), koja pripisuje povećanu aktivnost AChE izloženosti istoj smeši metala nakon 60 dana izlaganja (227). Razlike između ovih i eksperimentalnih rezultata istraživanja u okviru ove doktorske disertacije mogu se pripisati produženom izlaganju znatno višim dozama Pb, Hg i As u smeši i razlikama u vrstama upotrebljenih metalnih soli. Pored toga, u studiji (244) primećena je povećana aktivnost AChE u cerebrumu odraslih mužjaka *Wistar* pacova nakon intraperitonealne injekcije kompleksne smeše metala koja se sastojala od Cu, Zn, Pb, Cd, Mn, Co, Cr, Fe i Ni tokom 14 dana. U studiji u kojoj su pacovi bili izloženi Pb, As i Hg, bilo pojedinačno, bilo u binarnim ili ternarnim kombinacijama tokom perioda od 6 meseci (245), primećeno je umereno povećanje aktivnosti AChE kod životinja izloženih smeši Pb i As (po 15 ppm). Autori su ovu promenu pripisali vezivanju metala za acetilholinske (ACh) receptore, poremećajima njihove efikasnosti vezivanja i povišenoj proizvodnji AChE (245). U studiji Agrawal i saradnika (2015) primećeno je da pri istovremenom izlaganju Pb, Hg i As, Hg može maskirati štetni uticaj Pb i As na AChE bez promene aktivnosti enzima (245). S druge strane, oponašanje realnog izlaganja u životnoj sredini tj. složenoj smeši metal(oida) Hg, Cr, Cd, Pb, Ni i As nije uticalo na aktivnost AChE u mozgu pacova (246). Zanimljivo je da su niski nivoi pojedinačno primenjenih mangana, Pb i Hg smanjili aktivnost AChE kod glodara, pri čemu je primećena varijabilnost u odgovoru u zavisnosti od pojedinačne/kombinovane ekspozicije, kao i specifičnosti izloženog metal(oida) (247–249). Prethodna istraživanja ukazuju na to da metali mogu smanjiti aktivnost AChE vezivanjem za funkcionalne proteinske grupe (250) ili indukcijom denaturacije proteina kada metal dođe u direktan kontakt sa enzimom (251).

#### 5.1.1.5. Toksični efekti na srce

Brojni epidemiološki dokazi ukazuju na povezanost izloženosti metal(oid)ima i kardiovaskularnih bolesti (252–254). Dodatno, studije sprovedene na modelima glodara pokazale su da izloženost određenim metal(oid)ima, kao što su As, Cd, Cr i Pb, može dovesti do srčane disfunkcije i hipertenzije (255,256). Međutim, prethodne studije su uglavnom istraživale uticaj pojedinačnih metala na kardiovaskularni sistem (257).

Mehanizmi kojima metal(oid)i ostvaruju štetne efekte na kardiovaskularni sistem su brojni i uključuju oksidativni stres, izmene u koncentraciji esencijalnih metala, izmenjenu regulaciju renalnog, neuro-endokrinog i endotelno-vaskularnog sistema, ali i epigenetske promene (257,258).

U ovoj studiji pokazano je da smeša Pb, Cd, Hg i As dovodi do smanjenja koncentracija Fe i Mn u srcu pacova tretiranim višim doznim nivoima. U tim grupama uočene su i najizraženije histopatološke promene poput nekroze pojedinačnih kardiomiocita, hipereozinofilije pojedinih kardiomiocita, hiperemije i leukostaze.

Imajući u vidu da je u MIX 5 grupi primećena značajno viša koncentracija Cd u tkivu srca u poređenju sa kontrolom, promene u bioelementima sa mogu pripisati dominantno uticaju ovog metala.

Istraživanja su pokazala da izloženost Cd putem hrane smanjuje nivoe Fe u plazmi i u različitim tkivima. Ovo smanjenje dostupnosti Fe može poremetiti normalne funkcije ćelije i doprineti nekrozi pojedinih kardiomiocita usled poremećenih metaboličkih procesa (259). Pored toga, izloženost Cd je povezana sa promenama u signalizaciji Ca, što može dodatno doprineti poremećaju kontraktilnosti srca i dovesti do smrti kardiomiocita (260).

Studije pokazuju da su As i Pb mogu uzrokovati kardiotoksične efekte (261), izazvati apoptozu u kardiomiocitima, što može dalje dovesti do strukturnih promena u srcu i potencijalne nekroze. Pro-apoptotski efekti As manifestuju se kroz aktivaciju enzima kaspaze-3 (262) i ekspresiju pro-apoptotskih gena, poput BAX i PUMA, dok Pb izaziva apoptozu kardiomiocita kod pacova (H9c2 ćelije) (263).

Niske koncentracije određenih bioelemenata, poput Mn, mogu narušiti ćelijske antioksidativne mehanizme, s obzirom na to da je Mn ključni kofaktor mitohondrijalnog antioksidativnog enzima MnSOD (261,264). Ovaj enzim ima značajnu ulogu u očuvanju mitohondrijalnih i metaboličkih funkcija srca smanjujući oksidativni stres u mitohondrijama (264).

Dodatno, Javorac i saradnici (2022) su pokazali da Pb u tkivu srca indukuje stvaranje superoksidnog anjonskog radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ) i dovodi do povećanja nivoa malondialdehida (MDA) (265), doprinoseći oksidativnom oštećenju. Studija koja je istraživala toksične efekte As i Cd na srčano tkivo pacova, pokazala je da ovi metali dovode do povećanih markera oksidativnog stresa, kao što je peroksidacija lipida, što može doprineti nekrozi kardiomiocita (266). Istovremeno je zabeležen porast nivoa glutationa, koji može predstavljati potencijalni zaštitni mehanizam (266). Ista studija pokazala je da pacovi tretirani smešom As i Cd imaju viši nivo As u tkivu srca od pacova tretiranih pojedinačnim As, ukazujući na važnost interakcija među metalima (266). Uočeno je da se metali poput Pb, Cd i Hg akumuliraju u srčanom tkivu pacova nakon hronične oralne izloženosti (jednom nedeljno tokom šest meseci) kompleksnoj smeši metala (Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg i Pb) (267). Međutim, u istoj studiji nisu primećene značajnije histopatološke promene u tkivu srca (267). Histopatološke promene nisu primećene ni u tkivu srca pacova nakon subhronične oralne izloženosti (tokom 90 dana) smeši As, Cd, Pb, Cr i Hg (187), kao ni As, Cd, Pb, Hg, Cr, Ni, Mn i Fe (188). Ovi rezultati i rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije ukazuju da sastav smeše, režim doziranja, trajanje izloženosti mogu uticati na pojavu histopatoloških promena u tkivu srca.

U studiji koju su sproveli Zhao i saradnici (2020) uočeni su povećani nivoi proinflamatornih citokina (IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ ) u tkivu srca pacova tretiranih As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Hiperemija i hipereozinofilija koje su primećene u okviru ove doktorske disertacije mogu biti posledica inflamacije uzrokovane smešom metala i mogu dodatno pogoršati stanje kardiomiocita i oštetiti srčano tkivo (268,269). Ova stanja su često praćena leukostazom, koja se javlja usled nakupljanja leukocita u krvnim sudovima (270).

Izloženost metalima može dovesti i do povećanog oslobađanja enzima kreatin kinaze iz kardiomiocita (263), ali u ovom istraživanju nije bilo značajnog povećanja ovog markera oštećenja srčanog tkiva.

#### 5.1.1.6. Toksični efekti na pluća

Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer, IARC*) klasifikovala je Cd i jedinjenja Cd kao karcinogene za ljude, pri čemu su epidemiološke studije potvrdile uzročnu povezanost sa razvojem raka pluća (86). Dodatno, izloženost Cd je povezana i sa inhalacionim groznicama, akutnim pneumonitisom, hroničnim bronhitisom, emfizemom, ali i sa plućnom fibrozom (271). Poznato je da izloženost As može doprineti razvoju plućne fibroze, hroničnog bronhitisa, hronične opstruktivne bolesti pluća, bronhiektazije i sekundarne plućne hipertenzije (272). Međutim, prethodne studije su prvenstveno istraživale uticaj pojedinačnih metal(oid)a na funkciju pluća i studije o efektima izloženosti smeši metal(oid)a na pluća su ograničene (273).

Dodatno, interakcije između metal(oid)a mogu pojačati ili umanjiti toksične efekte pojedinačnih metala i uticati na različite organe uključujući i pluća (159,273). U ovoj studiji uočen je povišen nivo Cd i As u tkivu pluća pacova tretiranih najvišom dozom smeše, dok je u MIX 2 grupi primećen smanjen nivo Pb u tkivu pluća u poređenju sa kontrolom. Smanjenje nivoa Pb u MIX 2 grupi se može pripisati interakciji Pb i Cd, imajući u vidu da je u studiji (274) uočeno smanjenje Pb i povećanje Cd u plućima miševa izloženih Pb+Cd (Pb=0,01M; Cd=0,006M) tokom 4 nedelje. Smanjenje Pb u tkivu plućima pripisano je smanjenoj rastvorljivosti u prisustvu Cd, što je dovelo do manjeg raspršivanja, dok je povećanje Cd u plućima pripisano afinitetu Cd afiniteta prema tiolnim (-SH) grupama (274).

Smanjen nivo pro-oksidativnih parametara, poput  $O_2^-$ , TOS, PAB i AOPP, može biti povezan sa nižim koncentracijama Fe i Cu u plućnom tkivu, budući da ovi metali imaju važnu ulogu u oksidativnom oštećenju (275). S obzirom da su Cu, Zn i Mn važni kofaktori za mnoge oksidoredukcione reakcije, ali i za pravilno funkcionisanje SOD, smanjene vrednosti ovog enzima mogu se povezati sa smanjenim nivoima ovih bioelemenata u plućnom tkivu (275).

Oksidativni stres u respiratornom sistemu može da poveća produkciju medijatora inflamacije u plućima Valavanidis et al. 2013). Izlaganje Pb povećalo je endotelin-1 (ET-1), azot oksid (NO) i eozinofil peroksidazu (EPO) u serumu i uzrokovalo patološkim promenama u plućima kod zamorčića (276). U ovom istraživanju inflamacija je zabeležena u svim tretiranim grupama, dok je inflamatorni eksudat prisutan u pojedinim alveolama. Kolaps alveola i njihovo spajanje u šire vazdušne prostore primećeni su u grupama tretiranim višim dozama, gde su oštećenja bila najizraženija. U istraživanju koje je ispitivalo subhroničnu oralnu izloženost (90 dana) različitih doznih nivoa smeše As, Cd, Pb, Hg, Cr, Ni, Mn i Fe, nisu uočene značajne histopatološke promene u tretiranim grupama (188). U studiji Zhu i sradnika (2014), subhronična oralna izloženost smeši metala (As, Cd, Pb, Cr i Hg) tokom perioda od 90 dana dovela je, u grupi koja je primala najvišu dozu smeše, do zadebljanja interalveolarnih septi, edema alveolarnih zidova, kolapsa alveola i njihovog spajanja u proširene vazdušne prostore, kao i do fokalne infiltracije inflamatornih ćelija u intersticijumu (187).

#### 5.1.1.7. Toksični efekti na pankreas

Brojne studije slučaja, ali i *in vitro* istraživanja i istraživanja na životinjama ukazuju na povezanost povećanog rizika od razvoja raka pankreasa i izloženosti Cd (86). Dodatno, pokazan je i direktan citotoksični efekat Cd na  $\beta$  ćelije pankreasa (40). Kadmijum može izazvati oštećenja usled

oksidativnog stresa, što dovodi do smanjene sekrecije insulina i apoptoze  $\beta$ -ćelija pankreasnih ostrvaca (40).

U ovom istraživanju uočeni su povišeni nivoi Cd u tkivu pankreasa u grupi tretiranoj najvišom dozom smeše pri poređenju sa kontrolom. Smanjenje nivoa Fe u tkivu pankreasa, uočeno kod grupe tretirane najvišom dozom smeše, može se pripisati uticaju kadmijuma Cd. Sličan efekat zabeležen je i u studiji (277), u kojoj su ženke Wistar pacova subkutano dobijale 3 mg Cd/kg telesne mase, četiri puta nedeljno tokom perioda od jedne do šest nedelja, pri čemu je takođe primećeno smanjenje nivoa Fe u tkivu pankreasa. Dodatno, uticaju Cd se može pripisati i povećana produkcija  $O_2^-$  i smanjen TAS.

U ovoj studiji u MIX 3 grupi zabeležen je povećan nivo As u tkivu pankreasa u poređenju sa kontrolnom grupom. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjem sprovedenim na ženkama B6C3F1 miševa, gde su nakon 4, 8, 12, 16 i 24 nedelje tretmana smešama As(III), As(V), Cd, Cr, Ni i V u vodi, kao i As, Cd, Cr, Ni, Pb i V u hrani, primećene povišene koncentracije As i Cd u tkivu pankreasa u odnosu na kontrolu (278).

Pokazano je da izloženost Cd iz duvanskog dima može da uzrokuje inflamaciju u tkivu pankreasa (279). Dodatno, u istraživanju (280) je pokazano da izloženost pacova 5 mg Cd/kg telesne mase tokom 4 nedelje rezultira povećanim nivoima proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  i IFN- $\gamma$ ), poremećenim oksidativnim statusom i povećanim nivoima signalnih molekula apoptoze.

U ovom istraživanju uočeno je da pojedine ćelije Langerhansovih ostrvaca imaju izrazito eozinofilnu citoplazmu i smanjena, kondenzovana i hiperhromatična jedra u grupi tretiranoj najvišim doznom nivoom smeše Pb, Cd, Hg i As, što može ukazivati na apoptozu ili nekrozu. Slično, u tkivu pankreasa pacova tretiranih pojedinačnim As, Cd, Mn i Pb, ali i njihovom smešom tokom 30 dana uočena je degeneracija, nekroza, degranulacija i skupljanje Langerhansovih ostrvaca (281).

#### 5.1.1.8. Toksični efekti na slezinu

Kao najveći sekundarni limfoidni organ u organizmu, slezina ima širok spektar imunoloških funkcija, pored svoje uloge u hematopoezi i uklanjanju zastarelih eritrocita iz cirkulacije (282). Slezina predstavlja jedinstveno organizovan organ koji povezuje urođeni i adaptivni imunski sistem, omogućavajući filtraciju patogena i olakšavajući interakcije između antigen-prezentujućih ćelija i odgovarajućih limfocita (283).

Izlaganje Pb, čak i pri srednjim dozama, dovodi do poremećaja ekspresije SOD1, aktivacije kaspaze-3 i proteina p62/SQSTM1, kao i do akumulacije Fe u slezini, što rezultira oksidativnim stresom, apoptozom i poremećenim procesom autofagije u ovom organu (284). Takođe je primećeno da je As narušio homeostazu ključnih bioelemenata, kao što su Ca, Cu, Zn i Fe, u slezini, uzrokujući poremećaj enzimskih odgovora ćelija slezine, što je doprinelo imunodeficijenciji izazvanoj arsenom (285).

U ovoj studiji u tkivu slezine detektovan je samo As u grupama tretiranim sa dva najviša dozna nivoa smeše, dok homeostaza nivoa Cu, Zn i Fe nije narušena ni u jednoj tretiranoj grupi. Mn je bio ispod nivoa detekcije.

Subhronična oralna izloženost smeši metala (As, Cd, Pb, Cr i Hg) tokom perioda od 90 dana nije izazvala značajne histopatološke promene u tkivu slezine (187). Slično, u slezini pacova nakon hronične oralne izloženosti kompleksnoj smeši metala (Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg i Pb) jednom nedeljno tokom šest meseci, nisu uočene značajnije histopatološke promene (267). Izloženost

različitim dozama smeše Pb i Cd tokom 90 dana takođe nije dovela do značajnih histopatoloških promena u slezini ni kod mužjaka ni kod ženki pacova (286).

Međutim, u studiji koja je istraživala efekte Cd, Cr, Hg i njihovih smeša, zabeležene su promene u histološkoj strukturi slezine (287). Nekroza je bila prisutna u svim ispitivanim grupama, dok je fibroza uočena samo u grupama izloženim Cd, Hg i njihovoj smeši (287). Dodatno, u tkivu slezine pacova tretiranih pojedinačnim As, Cd, Mn i Pb, kao i njihovom smešom tokom 30 dana, zabeležena je kongestija, povećanje delova crvene pulpe i nekroza (281). Uvećanje površine crvene pulpe i teška kongestija takođe su zabeleženi u tkivu slezine pacova koji su oralno tretirani smešom Pb, Hg, Cd, Ni i Cr, kao i kod pacova tretiranih pojedinačnim Cr tokom 34 dana (211).

U ovoj studiji utvrđeno je da je tkivo slezine regularne morfologije crvene i bele pulpe, kako u kontrolnim uzorcima, tako i u uzorcima tretiranim grupama. Ekstramedularna hematopoeza, proces proizvodnje krvnih ćelija van koštane srži, može se povezati sa hematološkim efektima ispitivane smeše metala (288), dok se pasivna hiperemija može objasniti kao odgovor na izloženost metalima.

#### 5.1.1.9. Toksični efekti na testise

Tokom poslednjih decenija zabeležen je pad muške plodnosti, pri čemu se faktori iz životne sredine, poput izloženosti toksičnim metalima, smatraju jednim od mogućih uzroka ovog trenda (289). Poznato je da se toksični metali mogu akumulirati u muškom reproduktivnom sistemu, pri čemu je izloženost toksičnim metalima povezana s razvojem različitih reproduktivnih poremećaja (289).

U ovom istraživanju nivoi Pb, Hg i As bili su ispod granice kvantifikacije, dok je prisustvo Cd u tkivu testisa utvrđeno kod grupa tretiranih sa dve najviše doze smeše. Dodatno, uočeno je smanjenje nivoa Fe u tkivu testisa u grupama tretiranim sa dve najviše doze smeše.

U studiji sprovedenoj na pacovima, koji su intraperitonealno primali 1 mg Cd/kg dnevno tokom 1, 3, 10 i 21 dana, zabeležene su promene koncentracija metala u tkivu testis (290). Nakon 10 i 21 dana tretmana, primećeno je povećanje nivoa Fe i Cu, dok je nivo Zn bio smanjen (290). U istoj studiji zabeleženo je smanjenje nivoa ukupne superoksid-dismutaze (SOD) i ukupne glutation S-transferaze (GST) u poređenju sa kontrolnom grupom (290). U ovom istraživanju, nivoi SOD-a i GSH nisu bili značajno izmenjeni, međutim, primena dve najviše doze smeše dovela je do blagog smanjenje nivoa GSH u odnosu na kontrolu. Dodatno, u okviru ovog istraživanja uočeno je blago povećanje nivoa superoksidnog anjona ( $O_2^-$ ) i malondialdehida (MDA) u poređenju sa kontrolom, ali bez statističke značajnosti, što je u skladu sa nalazima Đurić i saradnika (290). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da blage promene u prooksidativnim parametrima u grupama MIX 4 i MIX 5 mogu biti posledica uticaja Cd, ali i da međusobne interakcije među metalima utiču na konačni efekat smeše na redoks status tkiva testisa.

U studiji u kojoj su mužjaci pacova izloženi Pb i Cd, pojedinačno ili u kombinaciji, u dozi od 0,025 mg/kg telesne mase, intraperitonealno tokom 15 dana, zabeleženo je povećanje reaktivnih kiseoničnih vrsta, uz porast nivoa testikularnog MDA i smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima u testisima, uključujući SOD, katalazu, G6PDH i GST u mitohondrijalnim i postmitohondrijalnim frakcijama (241). Takođe, primećeno je značajno smanjenje aktivnosti steroidogenih enzima  $3\beta$ - i  $17\beta$ -HSD, što je dovelo do smanjenja proizvodnje testostosterone (241). Dodatno, izloženi pacovi su imali značajno smanjen broj spermatozoida u testisima i epididimisu, dok su pokretljivost i održivost spermatozoida u epididimisu takođe bili umanjeni (241). Ova studija je pokazala da je izlaganje Cd imalo izraženiji toksični efekat u poređenju sa izlaganjem Pb, dok je izlaganje smeši dovelo do najmanje izraženih toksičnih efekata.

U istraživanju u okviru ove doktorske disertacije uočena je povećana relativna masa testisa u grupi tretiranoj najvišom dozom smeše Pb, Cd, Hg i As, što se možda odražava mogući inflamatorni

edem izazvan u ovom organu (211). Slično, u testisima pacova nakon hronične oralne izloženosti kompleksnoj smeši metala (Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg i Pb) jednom nedeljno tokom šest meseci, uočena je inflamatorna ćelijska infiltracija i histopatološke promene (267). Izloženost različitim dozama smeše Pb i Cd tokom 90 dana izazvala je značajne histopatološke promene u testisima (286). Pri nižim dozama, uočen je smanjen broj spermatida, a spermatogene ćelije sadržale su delimično degenerisane vezikule. Više doze smeše prouzrokovale su oštećenje seminifernih tubula, degradaciju spermatogenih ćelija i nestanak spermatozoida iz seminiferne lumene (286). Subhronična oralna izloženost smeši metala (As, Cd, Pb, Cr i Hg) tokom 90 dana izazvala je značajne histopatološke promene u tkivu testis (187). U grupi sa visokim dozama, epitel seminifernih tubula bio je redukovan, broj spermatozoida u nekim tubulima bio je smanjen, dok su spermatogoni i sekundarni spermatoцитi bili degenerisani (187). Zreli spermatozoidi su pronađeni u epididimisu, ali u manjem broju (187). Morfologija testisa i epididimisa u grupama sa umerenim i niskim dozama bila je slična kontrolnoj grupi. Ovi rezultati su usaglašeni sa promenama uočenim u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije, imajući u vidu da su histopatološke promene bile izraženije u višim doznim nivoima.

#### 5.1.1.10. Toksični efekti na femur

Prethodna istraživanja ukazuju da su kosti jedan od primarnih ciljanih organa toksičnih metala (291). Pokazano je da hronična izloženost, kao i kratkoročna izloženost visokim koncentracijama toksičnih metala narušava ravnotežu procesa remodeliranja kosti, utičući na formiranje i resorpciju, što može doprineti razvoju različitih patologija koštanog sistema (292).

Epidemiološka istraživanja ukazuju na povezanost povišenih nivoa toksičnih metala u krvi sa većom prevalencijom osteoporoze u populaciji srednjih godina, pri čemu se kadmijum ističe kao ključni faktor rizika u ovoj korelaciji (293). Dodatno, utvrđeno je da izloženost Cd povećava rizik od fraktura kostiju, posebno u populaciji profesionalno izloženoj ovom metalu (294). Međutim, čak i pri niskim dozama utvrđeno je da Cd povećava rizik od smanjene gustine kostiju i pojave preloma povezanih sa osteoporozom kod starijih osoba (295). Mogući mehanizmi osteotoksičnog dejstva Cd su direktno dejstvo ovog metala na koštane ćelije i posredni efekat putem indukcije bubrežne insuficijencije, što rezultira povećanim gubitkom Ca i P, smanjenom sintezom vitamina D i, posledično, smanjenom apsorpcijom Ca u digestivnom traktu (292,294,296).

Poznato je da Pb ispoljava štetne efekte na koštano tkivo, prvenstveno zbog sposobnosti da zameni dvovalentne katjone poput  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  i  $Fe^{2+}$  (297). Dodatno, inhibicija enzima 1- $\alpha$ -hidroksilaze u bubrežima, ključnog za sintezu 1,25-dihidroksivitamina D<sub>3</sub>, može uzrokovati hipokalcemiju i hipofosfatemiju smanjenjem apsorpcije kalcijuma i fosfora u crevima, što predstavlja još jedan od mehanizama toksičnog dejstva Pb na kosti (297).

Prethodne studije ukazuju na povezanost niskih nivoa Hg u krvi sa povećanim rizikom od osteoporoze kod muškaraca i smanjenjem mineralne gustine kostiju, dok je uticaj na žene i starije populacije manje jasan (293,298).

Takođe, arsen može zameniti fosfatne grupe u kristalima hidroksiapatita, formirajući apatit arsenat i druge kalcijum arsenatne kristale, što je povezano s Padžetovom bolešću, karakterisanom poremećenim remodeliranjem kostiju, bolom, deformitetima i povećanom učestalošću preloma (299,300).

Iako postoji podaci o efektima pojedinačnih metala na kosti, nema dovoljno informacija o efektima smeše na koštano tkivo (301,302).

U ovom istraživanju utvrđene su povećane koncentracije Pb, Cd i As u grupama tretiranim najvišim dozama smeše u poređenju sa kontrolom, dok je povećana koncentracija Hg zabeležena u grupi

tretiranoj najnižom dozom. Prethodna istraživanja ukazuju na smanjenje Fe u kostima pacova tretiranih Pb, Cd i kompleksnom smešom metala (Pb, Cd, Hg, Cu, Zn, Mn, Cr i Ni), što sugeriše da se niži nivoi Fe u femuru pacova mogu pripisati prvenstveno uticaju Pb i Cd, ali i As (93). S obzirom na to da smeša metala smanjuje nivo Fe u krvi, a olovo i kadmijum ometaju apsorpciju gvožđa u crevima, moguće je da smanjenje Fe u kostima proizlazi iz njihovog zajedničkog efekta (93). Dodatno, poremećaj homeostaze Fe dovodi se u vezu s razvojem degenerativnih bolesti kostiju povezanih s anemijom nakon izloženosti teškim metalima (303).

Izloženost neorganskoj Hg može povisiti nivo Cu u bubrezima, što potvrđuje studija gde su pacovi tretirani 50 ppm Hg pokazali povećanje Cu koncentracije u bubrežnom tkivu sa 11 na 77 µg/g nakon dva meseca (304). Ovo ukazuje na poremećaj metabolizma bakra izazvan Hg, potencijalno doprinosi akumulaciji toksičnosti i u koštanom tkivu. Iako je utvrđeno da Pb povećava Cu u kostima, istraživanje (305) pokazalo je nemonotoni odgovor Cd na Cu u femuru – izloženost srednjim nivoima doze Cd povećava Cu, dok najviše doze smanjuju njegovu koncentraciju, što ukazuje na složenu interakciju metala. Na osnovu ovih rezultata, povećanje Cu u femuru u ovoj studiji može se povezati s efektom Hg.

Izostanak značajnih histopatoloških promena u kontrolnoj i tretiranim grupama ukazuje da smeša Pb, Cd, Hg i As primarno narušava homeostazu Fe i Cu, dok prethodne studije (306) beleže oštećenja mikrostrukture kostiju, uključujući trabekularno tkivo, koštanu srž, kolagena vlakna i osteoblaste, nakon subhronične izloženosti pacova niskim dozama smeše Pb i Cd tokom 90 dana.

#### 5.1.1.11. Kritični toksični efekat

Analiza odnosa doze i odgovora, kao što je *Benchmark Dose* (BMD) modelovanje, nudi naučno napredniju strategiju od tradicionalnog NOAEL pristupa, koji su za regulatorne svrhe preporučili WHO i EFSA (102). Iako su neke studije istraživale BMD modelovanje za pojedinačnu izloženost metalima (307–311), nedostaju podaci o efektima kombinovane izloženosti. Posebno je ograničeno istraživanje u vezi sa uticajem na različite sisteme u organizmu, uključujući hematološke i biohemijske parametre, hormone, kao i parametre oštećenja organa kao što su jetra, bubrezi, mozak, pluća, pankreas i testisi. U prethodnim istraživanjima potvrđeno je prisustvo odnosa doze i odgovora, kao i značajni uticaj na reproduktivnu funkciju kod ženki pacova usled produžene izloženosti smeši toksičnih metala, čak i pri izuzetno niskim dozama (96), što naglašava potrebu za daljim istraživanjem efekata kombinovane izloženosti. Dodatno, prethodna istraživanja utvrdila su da je izloženost teškim metalima (Cd, Hg, Cr, Ni) i metaloidu As povezana sa većim rizikom od hormonskih promena kod populacije u Srbiji. Utvrđena je doza-odgovor veza između svih ispitivanih elemenata i reproduktivnih hormona (testosterona, LH i FSH) kod muškaraca, s najpouzdanijim procenama za Cd-testosteron i Hg-LH (95). Takođe, ovi elementi utiču na nivo insulina, pri čemu je arsen pokazao posebno izražen efekat, ukazujući na njegovu moguću ulogu u metaboličkim poremećajima (97). Kod žena je zabeležen uticaj na testosteron, dok su kod muškaraca primećene promene u nivoima estrogena i progesterone, s najpouzdanijim procenama za odnos As-testosteron i Hg-testosteron (98). Rezultati ovih studija ukazuju na potrebu za daljim istraživanjima uticaja metal(oid)a, kako na hormonsku ravnotežu, tako i na ostale sisteme u organizmu.

Imajući u vidu da prethodne studije nisu istraživale BMD za kombinovanu izloženost Pb, Cd, Hg i As na različite sisteme u organizmu, ova studija odgovara savremenim toksikološkim zahtevima procenom toksičnih ishoda nakon izloženosti ovoj smeši toksičnih metala. Kako bi se omogućio precizniji pristup modelovanju BMD-a, odabrana je arbitrarna doza smeše u skladu sa izabranim dozama svih pojedinačnih metal(oid)a i primenjenim intervalima doza. Ovaj pristup omogućava adekvatnije određivanje odnosa između doze i odgovora za ispitivane parametre, pri čemu je širina intervala doza jednaka za svaki metal(oid) u okviru svakog parametra.

Uzimajući u obzir kriterijum za potvrdu efekta u ovoj studiji, identifikovani su sledeći efekti: povećanje nivoa SOD u plazmi, povećanje fokalne infiltracije mononuklearnim ćelijama u jetri, smanjenje neorganskog fosfora u u krvi, smanjenje nivoa MCH, smanjenje nivoa MCV, povećanje edema intersticijuma u testisima, smanjenje nivoa T3. Poređenjem BMD vrednosti za potvrđene odnose doza-odgovor, identifikovane su najniže BMD vrednosti za nivo MCV, koje predstavljaju kritične toksične efekte za svaki metal(oid) u ispitivanoj smeši i iznose  $3,15E-04$  mg Pb/kg t.m./dan,  $1,05E-03$  mg Cd/kg t.m./dan,  $2,10E-05$  mg Hg/kg t.m./dan i  $2,10E-04$  mg As/kg t.m./dan. Predviđene vrednosti BMDL su izuzetno niske, što ukazuje na to da čak i minimalne koncentracije stalne izloženosti smeši ispitivanih metal(oid)a mogu izazvati promene u nivoima ovih parametara. BMDL vrednosti za Pb, Hg i As u ispitivanoj smeši metal(oid)a su niže od PTWI/7 doze koja simulira dnevnu izloženost pojedinačnom metal(oid)u koja ne bi trebalo da ispolji štetni efekat (Pb -  $0,003$  mg/kg t.m., Hg -  $0,002$  mg/kg t.m., As -  $0,002$  mg/kg t.m.). Utvrđena BMDL vrednost za Cd u ispitivanoj smeši metal(oid)a je marginalno povećana u poređenju sa PTWI/7 dozom (Cd -  $0,001$  mg/kg t.m.).

Ovi rezultati ukazuju na to da Pb, Hg i As primenjeni u ispitivanoj smeši mogu dovesti do pojave štetnog efekta i pri nižim dozama u odnosu na njihovu pojedinačnu primenu uzimajući u obzir PTWI/7. Rezultati ukazuju i da Cd primenjen u ispitivanoj smeši može dovesti do pojave štetnog efekta i pri marginalnom povećanju doze koja pojedinačno ne bi trebalo da ispolji štetni efekat.

Za sve ostale parametre za koje je potvrđen efekat (povećanje nivoa SOD u plazmi, povećanje fokalne infiltracije mononuklearnim ćelijama u jetri, smanjenje neorganskog fosfora u u krvi, smanjenje nivoa MCH, povećanje edema intersticijuma u testisima, smanjenje nivoa T3) vrednosti za Pb, Cd i As u ispitivanoj smeši metal(oid)a bile su više od PTWI/7 doze. Takođe, utvrđene vrednosti za Hg u ispitivanoj smeši metal(oid)a bile su više od PTWI/7 doze za efekat povećanja nivoa SOD u plazmi, povećanja fokalne infiltracije mononuklearnim ćelijama u jetri i smanjenja neorganskog fosfora u u krvi, dok su niže vrednosti za Hg u ispitivanoj smeši metal(oid)a od PTWI/7 doze u slučaju bile utvrđene za efekat smanjenja nivoa MCH, povećanja edema intersticijuma u testisima i smanjenja nivoa T3.

#### 5.1.2. *In silico* toksikogenomska analiza smeše olova, kadmijuma, žive i arsena

##### 5.1.2.1. Uticaj smeše olova, kadmijuma, žive i arsena na hematološke promene

###### *Sveobuhvatna in vivo analiza, Benchmark modelovanje i analiza toksikogenomskih podataka*

U ovom istraživanju primenjen je integrativni pristup koji obuhvata *in vivo* analizu, *Benchmark* modelovanje i analizu toksikogenomskih podataka, čime je omogućeno celovito sagledavanje efekata izloženosti toksičnim metalima na hematološke promene. Nekoliko decenija, podaci ukazuju na interakcije između toksičnih metal(oid)a i hipotezu da smeše ovih supstanci mogu uticati na zdravlje ljudi drugačije od pojedinačne supstance (312–314). Ova studija istražila je efekte subakutne izloženosti smeši Pb, Cd, Hg i As na hematološke parametre kod eksperimentalnih životinja. Pored toga, sprovedena je *in silico* analiza kako bi se istražili potencijalni molekularni mehanizmi koji povezuju ove metal(oid)e sa različitim hematološkim poremećajima. Rezultati *in vivo* eksperimenta otkrili su promene u nivoima RCB, Hb, HCT, MCV, MCH, MCHC i Fe u tretiranim grupama u poređenju sa kontrolom, što ukazuje na moguć razvoj anemije. Povećan broj trombocita ukazao je na potencijalnu trombocitozu. Takođe, zabeležene su promene u broju leukocita i neutrofila, naročito pri izloženosti višim dozama, zajedno sa sporadičnim promenama u broju monocita i eozinofila, što ukazuje na imunotoksični potencijal ove smeše metala. Slične rezultate zabeležili su Jadhav i saradnici (2007) pri ispitivanju složenije smeše metala koja uključuje As, Cd, Pb, Hg, Cr, Ni, Mn i Fe nakon produžene izloženosti od 90 dana (315). Poznato je da toksični metali i njihove smeše mogu uticati na vrednosti ovih hematoloških parametara putem različitih mehanizama, od kojih su mnogi još uvek nedovoljno istraženi (315–317).

Da bi se dalje istražili odnosi između uočenih promena i procenili relevantni nivoi doziranja ispitivane mešavine metala(loida), izvršena je BMD analiza za svaki metal u smeši u odnosu na izmerene hematološke parametre. Cilj je bio identifikovati doze toksičnih metal(oida) u smeši koje bi dovele do promene od 5% u vrednostima ispitivanih parametara kada su prisutni u smeši. Uski BMDI, svaki manji od faktora širine 100, dobijeni su i za MCV i za MCH, što ukazuje na veću preciznost u proceni u poređenju sa drugim izmerenim parametrima. Uzimajući u obzir ova dva parametra, niža BMDL vrednost je identifikovana za MCV. Ovaj rezultat implicira da promene u zapremini crvenih krvnih zrnaca mogu da ispolje povećanu osetljivost na toksične uticaje ispitivane smeše metala (što je takođe dokazano poređenjem sa izlaganjem pojedinačnim supstancama). Niži BMDL za MCV ukazuje na osetljivost ovog parametra na štetne efekte smeše metala, naglašavajući važnost promena u nivou MCV u proceni toksičnosti i povezanih zdravstvenih rizika ispitivane smeše. Razmatrajući ostale izmerene parametre, najniže vrednosti BMDL zabeležene su za apsolutni broj neutrofila, kao i za sadržaj eozinofila (%) i apsolutni broj bazofila. Međutim, ovi intervali su bili značajno široki, što ukazuje na manju preciznost u proceni.

Hematološke bolesti obuhvataju širok spektar stanja, pri čemu je poznato da visoka izloženost arsenu (As) obično dovodi do pojave anemije, leukopenije i eozinofilije, što rezultira smanjenom produkcijom eritrocita i leukocita. S druge strane, izloženost kadmijumu (Cd) može izazvati limfopeniju, neutrofiliju i anemiju (318). Olovo (Pb) prvenstveno utiče na sastav eritrocita, njihovu sintezu i preživljavanje, dok živa (Hg) može doprineti razvoju anemije i leukopenije (319–321).

Kako bi se pojasnila *in vivo* saznanja o hematotoksičnosti izazvanoj kombinovanom izloženošću Pb, Cd, Hg i As, sprovedena je *in silico* analiza, koja je identifikovala dva zajednička gena povezana sa razvojem hematoloških bolesti: FAS i ALAD.

Gen ALAD (delta-aminolevulinska kiselina dehidrataza) uključen je u sintezu hema i predstavlja ključni enzim za održavanje hemoglobina (Hb) i citohroma u ćelijama koštane srži i cirkulišućim eritrocitima (322). Smanjena ekspresija ovog gena dovodi do poremećaja u sintezi hema i, posledično, do razvoja hematoloških poremećaja. Naša analiza je pokazala da As smanjuje ekspresiju proteina čija sinteza zavisi od ovog gena, dok Pb smanjuje i mRNA i proteinsku ekspresiju ovog gena. Ovi rezultati ukazuju na to da As i Pb mogu doprineti razvoju hematoloških bolesti preko gena ALAD.

Gen FAS funkcioniše kao receptor za FAS ligand (FASL), a njihova interakcija pokreće apoptozu ćelija koje izražavaju FAS na svojoj površini (Nagata and Golstein 1995). Disfunkcija FAS sistema uglavnom dovodi do razvoja limfoproliferativnih poremećaja, ali može učestvovati i u patogenezi određenih tipova anemije (323,324). U ovoj studiji, *in silico* analiza je pokazala da As povećava ekspresiju mRNA gena FAS, Pb povećava ekspresiju njegovog proteina, dok Cd povećava i mRNA i proteinsku ekspresiju gena FAS. Ovo sugeriše da su ovi metal(oid)i mogli igrati ulogu u razvoju hematoloških poremećaja izazivanjem apoptoze. Analiza genske ontologije dodatno je pokazala da su ovi metal(oid)i delovali na signalne puteve FAS proteina, aktivaciju B limfocita posredovanu dejstvom susednih ćelija, apoptozu i puteve povezane sa sintezom hema putem zajedničkih gena, potencijalno doprinoseći razvoju hematoloških bolesti. Promene hematoloških parametara kod životinja ukazale su na pojavu anemije i trombocitoze u grupama tretiranim smešom Pb, Cd, Hg i As. Poznato je da akutna i hronična izloženost arsenu (As) može dovesti do razvoja anemije i trombocitopenije (325). U područjima gde su životinje (goveda) bile izložene povišenim nivoima arsena, zabeležen je pad broja eritrocita (RBC), nivoa hemoglobina (Hb) i hematokrita (HCT), što je rezultiralo hematološkim abnormalnostima, posebno anemijom (326). Smatra se da ovaj fenomen nastaje usled uticaja arsena na proizvodnju i eliminaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), što dovodi do njihovog nagomilavanja u organizmu i naknadnog oštećenja membrane eritrocita, čime se narušava eritropoeza (326,327). Nakon ulaska u organizam, Pb se vezuje za eritrocite i ispoljava hematotoksično dejstvo inhibicijom enzima uključenih u sintezu hema (delta-aminolevulinska

kiselina dehidrataza (ALAD) i heme sintetaza) pri višim koncentracijama, kao i indirektno enzima ferohelataze, koji je neophodan za ugradnju Fe u hem (307,328).

Takođe, Pb izaziva oksidativni stres, što dovodi do lipidne peroksidacije eritrocitne membrane i, posleđično, do hemolize. Slično tome, Cd ispoljava hematotoksične efekte, a nakon akutne, subakutne i hronične izloženosti može dovesti do razvoja anemije. Ovo se pripisuje inhibiciji heme-sintetaze i indukciji oksidativnog stresa (317,329). Matović i sar. (2015) su istakli da nakon izloženosti pacova Pb-u tokom 9 nedelja i akutne izloženosti Cd-u dolazi do smanjenja nivoa glutationa (GSH) u krvi u oba slučaja, dok izloženost Cd-u takođe smanjuje aktivnost superoksid-dismutaze (SOD). GSH i SOD imaju ključnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti organizma (329). U studiji Javorac i sar. (2021), kod pacova izloženih Pb-u uočeno je smanjenje nivoa RCB-a i hemoglobina (Hb), uz umereno smanjenje srednjeg zapreminskog korpuskularnog volumena (MCV), što ukazuje na razvoj mikrocitne hipohromne anemije (154). Pored toga, izloženost živi (Hg) utiče na hematološki sistem izazivanjem oštećenja bubrega, što smanjuje proizvodnju eritropoetina potrebnog za sintezu eritrocita. Takođe, može izazvati hemolizu i uticati na metabolizam gvožđa (Fe), potencijalno dovodeći do anemije. Studija iz Indonezije otkrila je niže vrednosti Hb i hematokrita (HCT) kod radnika u rudnicima zlata profesionalno izloženih Hg-u u poređenju sa referentnim vrednostima (330).

Izloženost binarnoj smeši četiri metala i metaloida ispitivanih u ovoj studiji takođe dovodi do promena u hematološkim parametrima (317). U studiji Mahaffey i Fowlert (1977), pacovi su oralno izlagani smeši arsena (As, 2,5 mg/kg/dan) i kadmijuma (Cd, 2,5 mg/kg/dan) i smeši As (2,5 mg/kg/dan) i Pb (10 mg/kg/dan) tokom 10 nedelja, kao i smeši Cd (2,5 mg/kg/dan) i Pb (10 mg/kg/dan) tokom 21 dana (331). Pacovi izloženi As-u i Cd-u imali su povećane vrednosti RCB-a i smanjene vrednosti HCT-a, ali je efekat bio manje od aditivnog (331). Izlaganje smeši As+Pb nije pokazalo značajno smanjenje vrednosti hemoglobina (Hb) i hematokrita (HCT) u poređenju sa vrednostima ovih parametara kod pacova izloženih pojedinačno As i Pb (331). Smeša Cd+Pb dovela je do smanjenja Hb i HCT kod pacova, dok je veličina eritrocita ostala ista kao kod delovanja pojedinačnih metal(loid)a (331). Zajednički uticaj Hg i Cd nakon subakutne oralne ekspozicije na hematološke parametre takođe je ispitan, pri čemu su promene ukazivale na mikrocitnu hipohromnu anemiju zbog smanjenja Hb i MCHC (332).

Epidemiološka istraživanja dokumentovala su da pojedinačna izloženost metalima iz životne sredine, kao što su Pb, Cd, Hg i Mn, može biti povezana sa promenama u statusu gvožđa kod dece (333,334). Međutim, postoje ograničena saznanja o kumulativnim efektima više metal(loid)a na status gvožđa. Trenutna studija je pokazala da su nivoi gvožđa bili smanjeni u svim grupama tretiranim odabranom smešom metal(loid)a, što ukazuje na to da zajednička izloženost metal(loid)ima, čak i pri niskim dozama, narušava normalnu funkciju gvožđa. Interakcije između metal(loid)a takođe mogu uticati na stopu apsorpcije pojedinih metal(loid)a zbog konkurentnosti za ćelijski unos (333,335). Na primer, nedostatak gvožđa povećava stopu apsorpcije nekih dvovalentnih metal(loid)a, posebno Pb.

Prethodne studije pokazale su da metal(loid)i mogu pokrenuti signalne puteve koji rezultiraju sekrecijom citokina i izazivanjem efekata na susedne ćelije (336). Ovo sugerise da imunomodulacija izazvana metal(loid)ima može dovesti do nepravilne aktivacije imunog sistema protiv specifičnih antigena (337). *In silico* rezultati ove studije ukazuju da imunološki sistem može delimično uticati na poremećaj hematološke homeostaze. Slično ispitivanju molekularnih mehanizama razvoja hematoloških bolesti, *in silico* analiza identifikovala je četiri zajednička gena za Pb, Cd, Hg i As koji su povezani sa razvojem anemije - ACHE, GSR, PARP1, TNF.

Acetilholinesteraza (AChE, Catwright krvna grupa) je integralni deo membrane eritrocita i pomaže u održavanju njihovog oblika i veličine. Aktivnost AChE može se koristiti kao jedan od potencijalnih markera za različite tipove anemija. Povećana koncentracija AChE prisutna je kod mikrocitne hipohromne anemije (338). As povećava ekspresiju ACHE mRNA, a povišene

koncentracije su zabeležene u slučajevima mikrocitne hipohromne anemije, što ukazuje na to da As može igrati ulogu u razvoju anemije modulacijom ovog gena. S druge strane, Cd smanjuje ekspresiju ACHE proteina, pa je njegov doprinos razvoju anemije putem ovog gena diskutabilan.

Gen glutation reduktaza (GSR) ima ulogu u borbi protiv oksidativnog stresa, a poznato je da oksidativni stres može doprineti razvoju anemije (339). Trenutna studija je otkrila da arsen (As) povećava ekspresiju GSR mRNA, čime se pojačava antioksidativna zaštita. Stoga se može zaključiti da As putem ovog gena ne doprinosi razvoju anemije. Kada je u pitanju kadmijum (Cd), on takođe povećava ekspresiju GSR mRNA, ali njegov uticaj na ekspresiju proteina je dvojak, što otežava zaključivanje o njegovoj ulozi u razvoju anemije preko ovog gena.

Faktor nekroze tumora (TNF) je citokin koji ima ključnu ulogu u inflamaciji i apoptozi ćelija (340). Disregulacija TNF-a može dovesti do *Fanconijeve* anemije, dok hiperprodukcija TNF-a u koštanoj srži kod aplastične anemije može uzrokovati imuno-posredovanu inhibiciju hematopoeze (341,342). Pored toga, povećana proizvodnja TNF-a usled inflamacije može doprineti razvoju anemije hroničnih bolesti povećavajući eliminaciju eritrocita iz cirkulacije i sprečavajući ugradnju gvožđa (Fe) u hem (343). Budući da je trenutna studija otkrila dvojak uticaj As-a na ekspresiju TNF mRNA i proteina, može se zaključiti da je njegov uticaj kompleksan. S druge strane, Cd, olovo (Pb) i živa (Hg) povećavaju ekspresiju TNF mRNA i proteina, koji imaju značajnu ulogu u razvoju različitih tipova anemije, pa se može sugerisati da ovi metali mogu doprineti razvoju anemije putem TNF gena.

PARP1 je ključni enzim koji učestvuje u prepoznavanju i reparaciji prekida DNK (344). Inhibicija PARP1 prethodno je predložena kao potencijalna terapija za lečenje akutne mijeloidne leukemije (AML) i AML povezane sa *Fanconijevom* anemijom (344,345). Kadmijum povećava ekspresiju PARP1 mRNA, što doprinosi razvoju anemije, dok arsen smanjuje ekspresiju proteina i mRNA PARP1.

Oksidativni stres nastaje kao posledica prekomernog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i/ili smanjene antioksidativne zaštite (346). ROS mogu oštetiti membranu eritrocita, što dovodi do lipidne peroksidacije i, posredno, hemolize, kao i do uticaja na eritropoezu, što može rezultirati razvojem različitih vrsta anemija (327,329). Kod eritrocita, oksidativni stres može nastati tokom metaboličkih procesa u ćeliji i tokom transporta kiseonika do tkiva. Značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti ima glutation, koji popravljaja oštećenja ćelija izazvana oksidativnim stresom (347). S obzirom na to da su eritrociti stalno izloženi oksidativnom stresu, neophodno je zaštititi hemoglobin (Hb) i druge makromolekule, zbog čega je važno održavati glutation u redukovanom obliku (GSH). Ovo omogućava enzim glutation-reduktaza, uz prisustvo kofaktora nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH), koji regeneriše GSH iz oksidovanog oblika (GSSG) (348).

Hemolitička anemija može nastati zbog nedostatka redoks ciklusa glutationa, što se najčešće javlja kao posledica deficijencije enzima uključenih u metabolizam i sintezu glutationa ili deficijencije glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD), koja obnavlja NADPH (348). Analiza genske ontologije zajedničkih gena za četiri ispitivana metala i metaloida pokazala je da su ključni signalni putevi: apoptoza indukovana slobodnim radikalima, nekroza izazvana nanočesticama i TNFR1 signalni put. Ovi rezultati ukazuju na to da zajednički geni za Pb, Cd, Hg i As igraju ulogu u putevima koji utiču na razvoj oksidativnog stresa, koji doprinosi nastanku anemije.

U prethodnim studijama uočeno je inhibiranje diferencijacije eritroida posredstvom TNF $\alpha$  (349) i povećano oslobađanje faktora nekroze tumora u anemijama povezanim sa kancerom (350), što potvrđuje uključenost ovih signalnih puteva u razvoj anemije, posebno pod uticajem predložene smeše metala. Kao što je ranije pomenuto, ACHE je integralni deo membrane eritrocita i pomaže u održavanju njihovog oblika i veličine. Takođe, poznato je da bi mogao poslužiti kao potencijalni marker za različite vrste anemija (351). Ova studija pokazuje da toksični metali i metaloidi mogu

uticati na aktivnost ACHE, a time i na strukturu eritrocita, što ukazuje na to da oni mogu doprineti razvoju anemije.

Analiza genske ontologije takođe je identifikovala nekrozu regulisanu nanočesticama kao jedan od značajnih puteva povezanih sa anemijom i izloženošću ispitivanoj smeši metal(oid)a. Iako nanočestice ispitivane smeše metal(oid)a nisu bile primenjene u eksperimentalnoj fazi ovog istraživanja, važno je napomenuti da metalne nanočestice mogu da disosuju u katjone u vodenoj sredini ćelijskih okruženja, omogućavajući tako metalima da ispolje štetne efekte (352). Poznato je da su različiti metal(oid)i povezani sa anemijom (303,353), dok s druge strane, nanočestice mogu izazvati oksidativni stres, hemolizu, morfološke promene, smanjenje elastičnosti membrana i promene u strukturi hemoglobina u crvenim krvnim zrnima (354). U skladu s tim, sugerišu se dva mehanizma kroz koja nanočestice metala (srebra i zlata) izazivaju deoksigenaciju hemoglobina u crvenim krvnim zrnima: vezivanje za membranu crvenih krvnih zrnaca i generisanje oksidativnog stresa (355).

U tretiranim grupama uočeno je statistički značajno povećanje broja trombocita/pločica, što ukazuje na pojavu trombocitoze, stanja koje karakteriše broj trombocita iznad gornje granice referentnog opsega. Trombocitoza može biti primarna, usled poremećaja u megakariopoezi, ili sekundarna (reaktivna), nastala usled spoljnih faktora. U ovom slučaju, uzročnici uključuju toksične metal(oid)e (356). Povećana izloženost smeši metala kod pacova može uticati na trombopoezu i dovesti do povećanja broja trombocita, pri čemu su izraženije promene primećene nakon subakutne izloženosti smeši metala (Zn+Cu+Fe+Mn+Pb+Cr) sa postepenim smanjenjem promena nakon 90 dana izloženosti (357). Podaci iz literature o uticaju Pb i Cd na broj trombocita/pločica u krvi nisu dosledni. U studiji Anđelković i sar. (2019), niža primenjena doza Cd (15 mg/kg tm.) dovela je do razvoja trombocitoze, dok je viša doza Cd (30 mg/kg tm.) u istoj studiji dovela do trombocitopenije nakon akutne izloženosti. Pretpostavlja se da se reaktivna trombocitoza razvija i povlači kada se prestane sa izloženošću ovom metalu (159). Takođe, pokazano je da subhronična izloženost (30 dana) pacova 15 mg CdCl<sub>2</sub>/kg tm./dan dovodi do razvoja trombocitoze (358). Pored toga, neorganska Hg takođe može izazvati promene u funkciji i strukturi trombocita kod sisara zbog vezivanja za sulfhidrilne grupe unutar trombocits (359).

Putem *in silico* analize identifikovani su geni preko kojih toksični metal(oid)i utiču na razvoj trombocitoze. THPO (trombopoetin) je primarni humoralni regulator produkcije trombocita, koji ostvaruje svoje dejstvo vezivanjem za receptor MPL. Pro-onkogen, receptor trombopoetina (MPL), povezan je sa JAK2 (Janus kinaza 2), koji dalje prenosi signal unutar ćelije i reguliše sintezu trombocita (356,360,361). Povećana aktivnost JAK2 i povišen nivo THPO mogu dovesti do razvoja trombocitoze (356,362).

Smanjena ekspresija MPL doprinosi razvoju trombocitoze usled promene ravnoteže između stimulacije signalizacije u megakariopoezi i uklanjanja trombopoetina putem internalizacije receptora u trombocitima (356).

Pored toga, CALR (kalretikulin) ima nejasnu ulogu u trombopoezi, ali je poznato da utiče na megakariocite i formiranje trombocita (363). Analize sprovedene u ovoj studiji pokazale su da kadmijum (Cd) i živa (Hg) povećavaju ekspresiju CALR mRNA, što doprinosi razvoju trombocitoze. Takođe, kadmijum smanjuje ekspresiju MPL mRNA, dok smanjena ekspresija ovog gena ima ulogu u razvoju trombocitoze. S obzirom na to da je povećan nivo THPO povezan sa razvojem trombocitoze, smanjena ekspresija THPO mRNA usled delovanja kadmijuma nije u skladu sa razvojem trombocitoze.

Analiza ontologije svih gena na koje je uticala smeša toksičnih metal(oid)a i povezanih sa trombocitozom, pokazala je da ovi geni doprinose razvoju ovog stanja kroz aktivaciju Jak-STAT signalnog puta i TPO signalnog puta. Zanimljivo je da je sindrom distalne delecije 16p11.2, povezan sa poremećajima iz spektra autizma (364), identifikovan kao značajan faktor za

trombocitozu. Druga studija je pokazala da je delecija 16p11.2 povezana sa anemijom usled nedostatka gvožđa (365).

Pomoću GeneMANIA alata identifikovani su geni povezani sa izabranim setom, kao i tipovi interakcija među njima. Dominantni tip interakcije kod sve tri bolesti bile su fizičke interakcije, što znači da je povezanost između gena rezultat reakcija između njihovih proteina.

Analiza obogaćivanja miRNA, prioritizacija faktora transkripcije i koncept mehanizma delovanja (MoA).

S obzirom na to da su miRNA i faktori transkripcije široko prepoznati kao ključni elementi u regulaciji ekspresije gena (366), oni su analizirani u ovom istraživanju kako bi se dalje razjasnile molekularne promene u predloženoj hematološkoj kaskadi koju izaziva ispitivana smeša toksičnih metala. Ova analiza identifikovala je ključne miRNA i faktore transkripcije za svaki skup gena. Rezultati našeg istraživanja u vezi sa anemijom delimično su u skladu sa rezultatima istraživanja ekspresije miRNA kod mezemhimalnih matičnih/stromalnih ćelija koštane srži pacijenata sa *Fanconijevom* anemijom, sugerišući hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-187-3p kao značajne regulatore (367). Dodatno, hsa-miR-129-1-3p je diferencijalno izražena u ćelijskim linijama i kod pacijenata sa *Fanconijevom* anemijom (368). U vezi sa trombocitozom, hsa-miR-22-3p je odabran kao važno cilj mesto dejstva, koje je takođe bilo u setu ushodno regulisanih egzozomalnih miRNA u koncentratima trombocita dobijenih aferezom tokom skladištenja (369). S obzirom na regulatornu ulogu gena povezanih sa hematološkim bolestima, hsa-miR-216b-5p je izdvojena kao značajan kandidat za referentni gen. To je bilo istaknuto u istraživanju miRNA ciljnih mesta dejstva u perifernoj krvi pacijenata koji su imali kritičnu fazu COVID-19, što ukazuje na njegovu povezanost sa imunološkom disregulacijom (370). S druge strane, specifične miRNA, kao što su hsa-miR-15a-5p i hsa-miR-16-5p, koje su identifikovane kao ciljni regulatori gena koji su pogođeni hematološkim bolestima i povezani sa izloženošću smeši metala u ovom istraživanju, takođe su prepoznate kao obećavajući biomarkeri za kasniji rizik od hronične limfocitne leukemije (371).. GATA1 je dodeljen kao glavni transkripcioni protein koji reguliše gene povezane sa anemijom. Isti transkripcioni faktor je ključni regulator različitih stadijuma hematopoeze (372). Mutacije GATA1 gena pronađene su u naslednoj anemiji, trombocitopeniji i akutnoj leukemiji povezanoj sa Daunovim sindromom (373). ERG je označen kao glavni regulator gena povezanih sa trombocitozom i izloženošću smeši metala. ERG je takođe prepoznat kao pro-onkogen u megakarioblastičnim leukemijama, gde njegova prekomerna ekspresija podstiče razvoj megakarioblastičnog fenotipa (374). Ovo istraživanje je ukazalo na CUX1 kao transkripcijski faktor koji reguliše gene povezane sa hematološkim bolestima i istraživanom mešavinom metala. Međutim, CUX1 je takođe prepoznat kao regulator gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa i posredno u leukemiju, kao i mijeloidne neoplazme (375,376).

Rezultati ovog istraživanja, zajedno sa ključnim regulatorima gena, organizovani su primenom koncepta MoA, kako bi se olakšalo sistematsko i pregledno dokumentovanje složene prirode bioloških odgovora povezanih sa hematotoksičnošću istraživane mešavine metala (Pb+Cd+Hg+As).

#### 5.1.2.2. Uticaj smeše olova, kadmijuma, žive i arsena na razvoj neurodegenerativnih bolesti

Toksični metali smatraju se rizikom iz životne sredine povezanim sa razvojem neuroloških oboljenja, ali snažne uzročne veze još uvek nisu u potpunosti potvrđene. Povišeni nivoi neesencijalnih metala mogu izazvati različite štetne intracelularne događaje, uključujući oksidativni stres, mitohondrijalnu disfunkciju, fragmentaciju DNK, pogrešno savijanje proteina, disfunkciju endoplazmatskog retikuluma, disregulaciju autofagije i aktivaciju apoptoze koja može da promeni neurotransmisiju. Ove promene mogu dovesti do neurodegeneracije, koja se dalje može manifestovati u vidu kognitivnih problema, poremećaja kretanja i disfunkcije učenja i pamćenja (377,378).

Mehanizmi kojima se ispitivani toksični metal(oid)i u ovom istraživanju mogu povezati sa neurodegenerativnim bolestima proučavani su u različitim eksperimentima (378–380). Međutim, povezanost smeše ovih metal(oid)a sa neurodegenerativnim bolestima i sposobnošću da deluju na aditivni ili čak sinergistički način nije dovoljno istražena.

Imajući u vidu sposobnost svakog od četiri selektovana toksična metal(oid)a da utiču na proces neurodegeneracije, korišćen je *in silico* toksikogenomski pristup istraživanja podataka kako bi se istražili značajni molekularni mehanizmi neurotoksičnosti povezane sa izlaganjem njihovoj smeši, kao i vezu sa razvojem ALS, PD i AD.

#### Zajednički geni

*In silico* istraživanje je otkrilo da su BDNF, HMOX1, MAPT i TNF zajednički geni za PD i AD, GSTP1 je zajednički gen za ALS i PD, dok je SOD2 zabeležen kao gen na koji utiču svi ispitivani metali u sve tri ispitivane neurodegenerativne bolesti (ND). Uobičajeni polimorfizam jednog nukleotida u pro-regiji ljudskog BDNF gena, koji rezultira supstitucijom valina na metionin, povezan je sa osetljivošću, incidencom i kliničkim karakteristikama nekoliko neurodegenerativnih poremećaja (381). Naše istraživanje je pokazalo da i Pb i As smanjuju ekspresiju BDNF mRNA i ekspresiju BDNF proteina, dok je MeHg pokazala suprotan način delovanja i kod PD i kod AD. Protein HMOX1 je prekomerno ekspimiran u neuronima i astrocitima moždane kore i hipokampusa u AD, dok je kod PD HMOX1 izrazito prekomerno ekspimiran u astrocitima supstancije nigre i ukrašava Levijeva tela u pogođenim dopaminergičkim neuronima (382). Naše istraživanje je pokazalo da su svi ispitivani metali povećali mRNA HMOX1 i u PD i u AD, sa izuzetkom Pb, koje je izazvalo smanjenje HMOX1 mRNA u razvoju AD. Kadmijum i arsen su povećali ekspresiju proteina HMOX1 u PD i AD, dok je Pb delovalo na suprotan način.

U mnogim neurodegenerativnim bolestima, formiranje agregiranih tau inkluzija, gubitak neurona i atrofija uzrokovani su mutacijama MAPT gena (383). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je u slučaju PD i AD, izloženost MeHg i As povezana sa smanjenjem ekspresije MAPT proteina, dok je MeHg povezan i sa povećanjem i sa smanjenjem mRNA MAPT.

Citokin TNF igra važnu ulogu u propagaciji inflamacije zbog aktivacije i regrutovanja imunih ćelija preko TNF receptora 1 (TNFR1). Štaviše, TNFR1 može direktno da izazove oksidativni stres aktivacijom enzima koji proizvode ROS (reaktivne vrste kiseonika) i RNS (reaktivne vrste azota). Oksidativni stres i inflamacija izazvani TNF-om međusobno pojačavaju svoje efekte i doprinose razvoju neurodegeneracije. Međutim, pokazalo se da TNF može imati dvojnju ulogu u ND. Stimulacija TNFR2 ispoljava neuroprotektivna svojstva i promovise regeneraciju tkiva (384). Na osnovu CTD analize, MeHg i Cd su povezani sa povećanom ekspresijom TNF proteina, dok je As povezan sa smanjenom ekspresijom TNF proteina i u PD i u AD. Olovo je povezano sa povećanom ekspresijom TNF proteina u razvoju PD, dok su i povećanje i smanjenje ekspresije TNF proteina povezani sa razvojem AD.

Takođe, postoji veza između smanjenja nivoa glutaciona i razvoja neurodegenerativnih bolesti. Pored toga, značajno smanjenje aktivnosti glutacion transferaze u određenim delovima mozga i u ventrikularnoj cerebrospinalnoj tečnosti utvrđeno je kod ALS, PD i AD (385,386). Utvrđeno je da svi ispitivani metali povećavaju GSTP1 mRNA, što bi, prema CTD analizi, moglo biti povezano sa razvojem ALS i PD.

Uloga oksidativnog stresa u stvaranju potencijalno štetnih radikala, poput superoksid anjona, može oštetiti komponente lanca transporta elektrona i druge ćelijske strukture, što pospešuje razvoj neurodegeneracije (387). Superoksid dismutaza 2, takođe poznata kao superoksid dismutaza zavisna od mangana, je enzim koji efikasno pretvara superoksid u manje reaktivni vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), koji može slobodno da difunduje kroz mitohondrijalnu membranu. Gubitak aktivnosti SOD2 može dovesti do brojnih patoloških fenotipova u metabolički aktivnim tkivima, posebno u centralnom

nervnom sistemu (388). *In silico* rezultati ove studije su pokazali da je SOD2 gen zajednički za sve tri bolesti i povezan sa izlaganjem smeši toksičnih metala. Zanimljivo je da je MeHg povećala ekspresiju SOD2 proteina u svim ispitivanim neurodegenerativnim bolestima, dok je As delovao na suprotan način. Pb i Cd i povećavaju i smanjuju ekspresiju SOD2 proteina. Ushodna regulacija SOD2 je verovatno kompenzatorni mehanizam protiv povećanog nivoa oksidativnog stresa i izmenjene mitohondrijalne homeostaze (388). *In vivo* rezultati ovog istraživanja su potvrđuju hipotezu (388), s obzirom da je ukupni nivo SOD bio povećan u svim grupama tretiranim smešom metal(oid)a, sa najizraženijim efektom u najvišem doznom nivou, te je ukupni oksidativni balans bio više narušen u nižim doznim nivoima.

Analiza podataka u ovom istraživanju pokazala je da je smeša ispitivanih supstanci u interakciji sa 7, 13 i 14 gena povezanih sa razvojem ALS, PD i AD. Fizičke interakcije (68,18%) su zabeležene kao najistaknutiji tip interakcija između gena za ALS, ko-ekspresija (60,85%) za PD i interakcije koje je predvideo server (44,30%) za AD.

Aktivnost proteina, ekspresija mRNA, ekspresija proteina i vezivanje za proteine

Mnoge gen-metal interakcije, predstavljene u Tabeli x, mogu se smatrati aditivnim. Međutim, jedan broj njih je pokazao suprotan način delovanja ili su bile dvojake prirode, što je otežalo grupisanje gena po ekspresiji ili aktivnosti. Ovo bi se moglo objasniti nekonvencionalnim odnosom doza-odgovor nazvanom nemonotoni doza-odgovor (NMDR), koji se često javlja u studijama koje ispituju neurotoksičnost metala (389,390). NMDR karakteriše kriva doza-odgovor čiji nagib menja pravac u okviru opsega testiranih doza (391). Ovo bi moglo da implicira da bi ispitivani metali mogli da povećaju i smanje aktivnost ili ekspresiju određenih gena u zavisnosti od doze kojoj su izloženi.

Štaviše, odstupanja u aktivnosti ili ekspresiji izmenjenih gena mogu se objasniti poremećajima u homeostazi koji mogu doprineti razvoju ND. Na primer, i disfunkcija i prekomerna aktivacija TP53 su ranije bili povezani sa apoptozom nervnih ćelija u ND (392,393). Takođe, model transgenog miša sa jednom obrisanom kopijom gena SOD2 ukršten sa standardnim modelom Alchajmerove bolesti (humani APP/J20) rezultirao je pojavom ubrzane AD patologije kod miša (394). Slični rezultati su takođe prijavljeni kod drugih mišjih modela AD, kao što su Tg2576 i Tg19959 miševi, koji prekomerno ekspimiraju mutirane oblike humanog amiloida-beta i pojačano taloženje amiloidnog plaka kao odgovor na smanjene nivoe SOD2 (395,396). S druge strane, prekomerna ekspresija enzima SOD2 u celom organizmu životinje rezultirala je različitim ishodima u pogledu produženja životnog veka i nije poboljšala funkciju neurona, dok je povećanje SOD2 u uobičajenom modelu Alchajmerove bolesti rezultiralo prevencijom nekih patoloških promena i poboljšanjem moždane funkcije (388). U većini slučajeva, studije na uzorcima postmortalne kičmene moždine obolelih od ALS-a ukazale su na smanjenu ekspresiju proteina Bcl-2 (397). Ovo potvrđuje studija koju su sproveli Azzouz i saradnici (2000), koja sugerise da prekomerna ekspresija Bcl-2 u transgenim miševima sa SOD1 može dovesti do odloženog pojavljivanja simptoma i povećanja preživljavanja (398). Ovaj efekat koji podstiče preživljavanje neurona izgleda da proizlazi iz neutralizacije proapoptotske funkcije proteina Bax i inhibicije aktivnosti kaspaza-1, -9 i -3 (399). Međutim, Houseveart i Cleveland (1999) su pokazali da prekomerna ekspresija Bcl-2 nije uspela da zaštiti motorne neurone od odumiranja u transgenom modelu ALS-a (400). Zanimljivo je da su povećani nivoi TNF-a u serumu zbog sistemske inflamacije povezani sa povećanim kognitivnim padom AD i PD što ukazuje na vezu između sistemske inflamacije i neurodegeneracije (384). S obzirom da je multipla skleroza (MS) pretežno izazvana sistemskim imunološkim odgovorom, testirane su anti-TNF terapije za multiplu sklerozu. Međutim, klinička ispitivanja sa reagensima koji neutrališu TNF kod pacijenata sa MS nisu uspela da poboljšaju bolest, a u nekim slučajevima su čak dovela do pogoršanja bolesti (384). Ovo se može objasniti dvojakom ulogom TNF-a u neurodegenerativnim bolestima. Dok je TNFR1 pretežno povezan sa

inflamacijom i neurodegeneracijom, TNFR2 je uključen u regeneraciju tkiva i neuroprotekciju (344).

### Molekularni putevi

Oksidativni stres i detoksikacija ROS, metabolizam folata i vitamina B12, AGE-RAGE signalni put i apoptoza identifikovani su kao glavni putevi koji mogu biti pogođeni ispitivanim toksičnoj smeši metala i koji učestvuju u razvoju neurodegenerativnih bolesti.

### Oksidativni stres

Neurodegenerativne bolesti poput Alchajmerove i Parkinsonove bolesti su poremećaji povezani sa starenjem, koji se odlikuju nakupljanjem abnormalnih oblika specifičnih proteina u mozgu. Dok je Parkinsonova bolest (PD) povezana sa degeneracijom dopaminergičkih neurona u regionu *substantia nigra* i prisustvom Levi-jevih tela (intracelularnih inkluzija sa agregatima presinaptičkog proteina  $\alpha$ -sinukleina) (401), Alzheimerova bolest (AD) se karakteriše ekstracelularnim amiloidnim plakovima i intraneuronalnim neurofibrilarnim zapletima u mozgu (401,402). Histopatološke promene prisutne u AD često se nalaze u agregatima sa metalnim jonima, koji mogu izazvati proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) (402). Takođe, postoji značajan broj dokaza koji sugerišu da je oksidativni stres centralni mehanizam koji dovodi do degeneracije kortikalnih i spinalnih motornih neurona, što je tipična karakteristika amiotrofične lateralne skleroze (ALS). Primer su povišeni markeri oksidativnog oštećenja u kičmenoj moždini i cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata sa ALS-om, praćeni mutacijama u antioksidativnom enzimu superoksid dismutazi 1 (SOD1) (403). Pored toga, rezultati kliničkih studija su pokazali da su nivoi markera prooksidativnog stresa, malondialdehida (MDA) i 8-hidroksiguanozina (8-OHdG), povećani u perifernoj krvi pacijenata sa ALS-om, dok su uočena smanjenje nivoa antioksidansa glutaciona i mokraćne kiseline kod pacijenata sa ALS-om (404). Uopšteno govoreći, pokazalo se da su neurološki poremećaji praćeni povećanim oksidativnim stresom, posebno imajući u vidu nalaze da su bočni lanci proteina modifikovani ili direktno od strane ROS, ili indirektno, proizvodima peroksidacije lipida (401). Svi metali prisutni u ispitivanoj smeši smatraju se redoks-neaktivnim metalima, čiji je važan mehanizam toksičnosti inaktivacija glavnih antioksidanata u ćelijama i posledično povećanje proizvodnje reaktivnih oblika kiselika (ROS), kao što su hidroksilni radikal ( $\text{HO}\cdot$ ), superoksidni radikal ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), peroksid vodonika ( $\text{H}_2\text{O}_2\cdot$ ) (405,406). U skladu s tim, rezultati ovog istraživanja su pokazali da je detoksifikacija ROS-a među najvažnijim putevima u ALS i PD, a takođe je navedena i u putevima pogođenim u AD. Dodatno, biološki procesi koji su pogođeni u ALS uključuju metabolizam glutathiona, detoksifikaciju oksidanata u ćelijama, kao i odgovor na oksidativni stres, dok su u slučaju PD zabeleženi odgovor na reaktivne kiseonične vrste i metabolizam superoksida. Detoksifikacija u ćelijama i odgovor ćelija na oksidativni stres bili su biološki procesi pogođeni i u ALS i u PD. SOD2 gen, koji kodira enzim koji uništava slobodne superoksidne radikale u ljudskom organizmu, je jedini gen prisutan u sve tri istraživane bolesti i pogođen ispitivanom smešom toksičnih metala. U studiji koju je sproveo Akram i saradnici (2018), pokazano je značajno smanjenje ekspresije SOD2 gena kod osoba izloženih olovu u poređenju sa kontrolama (407). Takođe, MeHg i As izazivaju značajnu ushodnu regulaciju GSR i SOD2 u studiji sprovedenoj na HT-22 ćelijskoj liniji, pokazujući porast ovih antioksidativnih proteina kao kompenzatorni mehanizam za smanjenje proizvodnje ATP-a usled disfunkcije lanca transporta elektrona (408). Rezultati studije Mendieta-Wejebe i saradnika (2013) pokazali su da su nivoi mRNA SOD2 u mozgu Wistar pacova smanjeni pri dozama od 0,562 i 1,125 mg/kg CdCl<sub>2</sub> u poređenju sa kontrolnom grupom (409). Kao što je i pokazano u ovom istraživanju, neurotoksični SOD1 depoziti u porodičnoj amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi (*engl. familiar ALS, fALS*) povezanoj sa SOD 1 upućuju na disfunkcionalni mehanizam u razvoju PD (410). Imajući u vidu da su neuroni izuzetno osetljivi na oksidativni stres, aktivnost superporodice glutation transferaza takođe je povezana sa neurodegenerativnim oboljenjima. Primećeno je da bi veza između izlaganja Pb i rizika od ALS-a mogla biti u korelaciji sa određenim polimorfizmima GSTP1 gena. Takođe, u

proteomskom istraživanju *post mortem* uzoraka pacijenata sa PD, pokazano je da su nivoi GSTP1-1 povišeni samo u uznapredovalim fazama bolesti (411). Ćelijski odgovor na oksidativni stres označen je kao jedan od važnih bioloških procesa pokrenutih ispitivanom smešom metala, povezanih sa razvojem ALS-a i PD-a, dok je metabolizam glutaciona označen kao najvažniji za ALS.

#### Metabolizam folata i vitamin B12

Drugi važan molekularni put na koji utiče ispitivana smeša toksičnih metala je metabolizam folata, značajan za sve tri neurodegenerativne bolesti i označen kao jedan od najvažnijih za razvoj ALS. Pored toga, metabolizam vitamina B12 je izdvojen kao jedan od najznačajnijih puteva u razvoju PD povezan sa smešom toksičnih metala (SOD1, SOD2, TNF, IL6), dok je takođe povezan i sa AD (SOD2, TNF, IL1B). Folati poreklom iz ishrane su neophodni za razvoj nervnog sistema, regulaciju neurogeneze i programirane ćelijske smrti. Folati podstiču remetilaciju homocisteina, aminokiseline koja može izazvati prekidanje DNK lanaca, oksidativni stres i apoptozu (412). Različite studije su povezale nedostatak folata i povećane nivoe homocisteina sa neurodegenerativnim bolestima, dok genetski i klinički podaci sugerišu uloge folata i homocisteina u patogenezi psihijatrijskih poremećaja (412). Pokazano je da je homocistein relevantan u patogenezi amiotrofične lateralne skleroze (ALS), tako što dodatno pogoršava oštećenje krvno-moždane barijere i disfunkciju prisutnih kod pacijenata sa ALS (413). Pored toga, hipoteza ciklusa folata nudi objašnjenje smanjenja RNK i povećanja taurina u nervnom tkivu kod ALS bolesti (Ioshino, 1984). Pacijenti sa AD takođe imaju snižene vrednosti folata u plazmi, povećane nivoe homocisteina u plazmi i poremećaje u nivou S-adenozilmetionina u mozgu (414). U skladu s tim, pokazalo se da veći unos folata i vitamina B12 u ishrani može smanjiti rizik od PD kroz smanjenje homocisteina u plazmi (415,416), kao i da poboljša stanje neurotrofije i inhibira oštećenje nerava kod pacijenata sa Alzheimerovom bolešću (416).

#### AGE-RAGE signalni put

Pokazano je da su nivoi naprednih produkata glikacije (AGE) i njihovih receptora (RAGE) povišeni, dok su nivoi rastvorljivog receptora za AGE (sRAGE) smanjeni kod pacijenata sa Alchajmerovom bolešću (417–419). Rezultati ovog istraživanja podržavaju nalaze koji ukazuju na ulogu AGE, RAGE i sRAGE u patofiziologiji Alchajmerove bolesti. Interakcija AGE sa svojim ćelijskim receptorom RAGE dovodi do stvaranja reaktivnih kiseoničkih vrsta (ROS) kroz aktivaciju nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze (420), što zatim aktivira nuklearni faktor kapa B (NF-kB) (421). NF-kB aktivira brojne gene citokina kao što su tumor nekrozni faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1, IL-6 i IL-8 (422). Proinflamatorni citokini pojačavaju aktivnost NADPH-oksidge (423) i povećavaju ROS (424). Pored toga, ćelijska antioksidativna odbrana je označena kao važan biološki proces poremećen u neurodegeneraciji. Pošto je za razgradnju AGE potreban glutation, čiji su nivoi smanjeni kod pacijenata sa AD, to praktično znači da bi u takvim stanjima nivoi AGE, izvora superoksidnog anjona, posledično bili povišeni. Iako u ovom istraživanju signalni put AGE-RAGE nije povezan sa ALS, može se sugerisati značaj ovog molekularnog puta u razvoju te bolesti (425), posebno imajući u vidu da je RAGE član superfamilija imunoglobulina i receptor ćelijske površine koji igra ključnu ulogu u zapaljenju i ćelijskoj disfunkciji (426,427). Osim sa AGE, on stupa u interakciju sa brojnim molekulima kao što su članovi porodice S100/kalgranulina, protein HMGB1 i molekuli koji su sklorni agregaciji, kao što su superoksid dismutaza 1 (SOD1) i TAR DNK vezujući protein 43 (TDP-43) pronađen u ALS (428,429). Ova interakcija pokreće višestruke intracelularne signalne puteve koji dovode do proizvodnje proinflamatornih molekula i ROS-a što dovodi do oksidativnog stresa i kasnijeg odumiranja neurona (420,430). Takođe, u turskoj kohorti studije asocijacije na nivou celog genoma (engl. genome-wide association study, GWAS). (N=174 pacijenata sa PD i N=150 zdravih kontrola), AGER rs2070600 SNP je takođe bio u korelaciji sa najvećim rizikom za razvoj PD. Pored toga, u poređenju sa zdravim kontrolama, nedavno se pokazalo da pacijenti sa PD imaju veće

koncentracije S100B i HMGB1, dva poznata liganda RAGE, u supstanciji nigra i cerebrospinalnoj tečnosti (431).

## Apoptoza

Smatra se da su apoptoza i nekroza dva glavna puta smrti neurona u neurodegenerativnim bolestima (432,433). Međutim, autofagična smrt ćelija, ekscitotoksičnost i međusobna komunikacija različitih mehanizama ćelijske smrti mogu takođe biti programirani, što značajno doprinosi disfunkciji neurona i, konačno, njihovoj smrti (432). U ovom istraživanju je pokazano da je negativna regulacija apoptotičkog signalnog puta glavni biološki proces koji dovodi do AD, uključujući smrt neurona, regulaciju apoptotičkog procesa neurona, negativnu regulaciju apoptotičkog signalnog puta i negativnu regulaciju ćelijske komunikacije. Fas ligand (FasL) put sa indukcijom stresa i regulacijom proteina toplotnog šoka (engl. *heat shock* protein, HSP) prepoznati su kao dva relevantna poremećena molekularna funkcionalna procesa, dok je smrt neurona identifikovana kao ključni faktor u razvoju Parkinsonove bolesti (PD). Apoptoza se može pokrenuti signalima, bilo ekstrinzičnim ili intrinzičnim putem (434,435). Kaspaza-3, (efektor i krajnji izvršilac kaspaze koju kodira CASP3 gen) je jedan od regulatornih faktora koji aktiviraju oba puta apoptoze (436), a upravo na CASP3 su uticali svi ispitivani metali, što ukazuje na važnost ovog signalnog procesa u razvoju Alchajmerove bolesti. Takođe, Bax se smatra najvažnijim pro-apoptotskim genom, dok je Bcl-2 značajan endogeni anti-apoptotski gen koji ima ulogu u održavanju fiziološkog stanja neurona. Istraživanja su pokazala da  $\beta$ -amiloidni prekursorski protein može dovesti do povećane toksičnosti u neuralnim matičnim ćelijama, smanjenja ekspresije Bcl-2, povećanja ekspresije Bax-a i disbalansa između Bax/Bcl-2 odnosa (437).

Ovo *in silico* istraživanje sugerise da je na oba gena, Bax i Bcl-2, koji su značajni za razvoj Alchajmerove bolesti, uticala ispitivana smeša metala. Pored toga, FasL put - regulator spoljašnjeg puta, koji dovodi do trimerizacije Fas receptora i formiranja unutarćelijskog multiproteinskog kompleksa (432), istaknut je u analizi molekularnih puteva povezanih sa Alchajmerovom bolešću. Takođe, regulacija indukcije stresa putem HSP proteina nalazi se među najvažnijim molekularnim putevima, što ukazuje na proces odbrane od nepravilno savijenih proteina, A $\beta$  peptida i tau proteina, koji izazivaju stvaranje toksičnih oligomera, a na kraju i plakova i neurofibrilarnih čvorova (438).

Što se tiče amiotrofične lateralne skleroze (ALS), ovo istraživanje je identifikovalo TP53 kao važan regulatorni faktor apoptoze za sve ispitivane metale. Prijavljeni su i izmenjeni nivoi i lokalizacija p53 i pro-apoptotičkih proteina u ALS postmortalnim tkivima. Nivoi proteina TP53 su bili povišeni u motornim neuronima kičmene moždine kod ALS-a, ali ne i u neuronima motornog korteksa. Zbog vrlo kratkog poluzivota TP53 u fiziološkim uslovima, povišeni nivoi p53 kod pacijenata sa ALS-om sugerisu da je protein aberantno stabilizovan, ili usled smanjene regulacije proteina koji negativno regulišu p53, kao što je mdm2, ili zbog smanjenog razgradnje p53 putem proteazomskog sistema. Prisutnost p53 u jedrima motornih neurona, koji nemaju dendritske procese i imaju zaobljeno telo ćelije, sugerise da akumulacija p53 u jedru može odgovarati atrofiji ćelija i smrti (439).

## Ostali molekularni putevi

### Pregled efekata nanočestica

U ovoj studiji zabeleženo je da efekti nanočestica (NP) predstavljaju zajednički molekularni put za Alchajmerovu (AD) i Parkinsonovu bolest (PD). Sinteza i primena NP za različite primene raste. Njihov potencijal da izazovu toksične efekte na proteine povezane sa razvojem neurodegenerativnih bolesti (ND) je u sposobnosti da prodiru u ćeliju i njene organele, što može dovesti do narušavanja njihove funkcije (440). Nanočestice metala uključene su u patogenezu AD zbog svoje sposobnosti da povećaju A $\beta$  peptide i fosforilišu tau protein, što uzrokuje senilne/amiloidne plakove i neurofibrilarne klupka (NFTs), karakteristične za AD. Takođe je primećeno da intranazalna

instilacija SiO<sub>2</sub>-NP (20 µg/dan/1–7 dana) kod pacova dovodi do njihovog prisustva u strijatumu, izazivanja oksidativnog oštećenja, inflamatornog odgovora, smanjenja koncentracije dopamina i nivoa tirozinske hidrosilaze, što ukazuje da ove NP negativno utiču na dopaminergične neurone u strijatumu (440). Ova zapažanja su potkrepljena eksperimentalnim dokazima koji pokazuju da nanočestice mogu da izazovu održene patologije mozga putem razgradnje krvno-moždane barijere (441).

#### Putevi mikronutrijenata selena

Naša analiza je otkrila da put mikronutrijenata selena takođe može da promeni procese u nervnom sistemu u korist razvoja PD. Postoje neki dokazi da hipermetilacija GFII povezana sa selenom pruža potencijalno objašnjenje za inverznu povezanost između selena i mišićnog tonusa novorođenčeta. Dodatno, ovi nalazi ukazuju na to da druge modifikacije metilacije DNK povezane sa selenom u placenti mogu igrati važnu ulogu u drugim zdravstvenim efektima selena na razvoj i rast fetusa (442). S druge strane, model PD kod pacova ukazuje da selen pomaže u suzbijanju oksidativnog stresa i smanjuje oštećenje DNK (443).

#### Dishomeostaza bakra

Poremećaj homeostaze bakra je takođe identifikovan kao mogući signalni put u Alchajmerovoj bolesti (AD). Poremećaj bakra može dovesti do interakcije sa tau proteinom i Aβ (beta-amiloidom), što može pogoršati njihove patološke ishode. Prijavljeno je da se bakar nagomilava u mozgu osoba sa AD, što dodatno povećava ekspresiju APP proteina, agregaciju Aβ i hiperfosforilaciju tau proteina (444).

#### Stres smicanja tečnosti i ateroskleroza

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su stres smicanja tečnosti i ateroskleroza označeni kao zajednički molekularni putevi u razvoju AD i PD. Oštećenje moždane vaskulature, reducirana kapilarna mreža u mozgu, disfunkcija endotela, degeneracija pericita, kao i poremećaj glimfatskog sistema, predstavljaju glavne promene u vaskularnom stablu kod AD, dok su mikrokrvarenja, disfunkcija endotela, promenjeni periciti i poremećaj glimfatskog sistema povezani sa PD. Disfunkcije krvno-moždane barijere su takođe povezane sa neurodegenerativnim oboljenjima. Oštećenje krvno-moždane barijere, defekti u angioneurinima, poremećena funkcija proteina povezanih sa receptorima lipoproteina I i smanjena ekspresija proteina tesnih spojeva zabeleženi su kao obeležja AD, dok su disfunkcija krvno-moždane barijere, promenjena funkcija p-glikoproteina i smanjena ekspresija proteina tesnih spojeva povezani sa PD. Dodatno, smanjen cerebralni protok krvi i poremećaj neurovaskularnog kuplovanja identifikovani su kao zajedničke procesi kod obe bolesti, AD i PD (445).

#### NRF2 signalni put

NRF2 signalni put je izdvojen kao značajan molekularni put izmenjen u PD. Istraživanje Petrillo i saradnika (2020) pokazalo je aktivaciju Nrf2 puta kod PD na sistemskom nivou (446). Konkretno, utvrdili su da je NRF2 visoko eksprimiran u leukocitima krvi pacijenata, zajedno sa glavnim ciljnim molekulima koji su uključeni u ćelijsku odbranu protiv oksidativnog stresa. Takođe, mitohondrijska disfunkcija kao jedan od glavnih aktivatora NRF2 puta, otkrivena je perifernim α-sinukleinskim oligomerima. Autori su istakli centralnu ulogu NRF2 puta u hroničnim bolestima i njegov značaj zato što predstavlja potencijalni terapijski cilj za neurodegenerativna oboljenja, kako kod odraslih, tako i kod dece (446). Pored toga, brojna istraživanja ukazuju da NRF2 ima značajnu ulogu u očuvanju zdravlja mitohondrija, uključujući mitohondrijski membranski potencijal, respiraciju, mitofagiju i biogenezu mitohondrija, što su sve karakteristike PD (447).

#### Interleukin-4 i Interleukin-13 signalizacija

Sve veći broj dokaza ukazuje na to da se neuroinflamacija i inflamatorni odgovor u mozgu smatraju patološkim mehanizmom neurodegenerativnih bolesti, uključujući Alchajmerovu bolest (448). S druge strane, interleukin-4 (IL-4) i interleukin-13 (IL-13) su poznati antiinflamatorni citokini koji doprinose obnovi i regeneraciji ćelija u uslovima inflamacije. U centralnom nervnom sistemu, IL-4 i IL-13 ispoljavaju neuroprotektivne efekte na neurone u životinjskim modelima eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE) (449) i Alchajmerove bolesti (450), smanjujući proizvodnju inflamatornih medijatora. Naša studija je pokazala da se signalizacije interleukina-4 i interleukina-13 mogu posmatrati kao putevi koje su narušeni u Alchajmerovoj bolesti, što je u skladu sa studijom koju su sprovedi (451). Rezultati ove studije sugerisu da IL-4 i IL-13, koji su endogeno ekspimirani iz reaktivne mikroglije mogu igrati ključnu ulogu u smrti neurona regulacijom oksidativnog stresa tokom neurodegenerativnih bolesti, kao što su Alchajmerova bolest i demencija (451).

#### NO/cGMP/PKG posredovana neuroprotekcija

Sve veći broj istraživanja pokazuje da aktivacija NO signalnog puta, koja dovodi do fosforilacije transkripcionog faktora CREB (protein vezan za element resposivan na ciklični adenzin monofosfat), tzv. NO/cGMP/PKG/CREB signalni put, poboljšava izmenjenu neuroplastičnost i deficiti pamćenja kod životinjskih modela AD (452). NO može delovati na presinaptičku ćeliju i podstaći oslobađanje neurotransmitera poput glutamata, putem aktivacije sGC/cGMP/PKG puta (453). Takođe, NO može pospešiti CREB signalizaciju putem S-nitrozilacije nuklearnih proteina povezanih sa CREB ciljnim genima i na taj način olakšati vezivanje CREB-a za DNK (454). Pored toga, povećana aktivnost nakon nitrozilacije omogućena je interakcijom NO sa drugim proteinima, poput jonskih kanala zavisnih od cikličnih nukleotida i kanala za oslobađanje kalcijuma na rijanodinskom receptoru. Važno je napomenuti da nitrozilacija smanjuje aktivnost apoptotskih kaspaza i NMDA receptora (NMDAR), što se smatra delom neuroprotektivne akcije NO, s obzirom na to da prekomerna aktivnost NMDAR dovodi do abnormalnog povećanja intracelularnog Ca<sup>2+</sup> nivoa što dovodi do ekscitotoksičnosti (455). Osim važne uloge u neurotransmisiji i sinaptičkoj plastičnosti, neuravnotežena proizvodnja NO izaziva neurotoksičnost. Pored dobro poznatih patoloških obeležja A $\beta$  i tau proteina, AD karakteriše i abnormalna NO/sGC/cGMP/PKG/CREB signalizacija u mozgu, promena u ekspresiji različitih izoformi NOS i nepravilna S-nitrozilacija ciljanih proteina, pružajući snažnu vezu između AD i NO signalizacije, što je takođe zabeleženo u našoj studiji (452).

#### Metabolizam jednougleničnih jedinjenja

Neuravnotežen unos određenih hranljivih materija može imati ulogu u nastanku i progresiji neurodegenerativnih bolesti posredstvom epigenetskih promena. Posebno je poznato da vitamini B grupe imaju važnu ulogu u regulaciji metabolizma jednougleničnih jedinjenja i u promeni potencijala za metilaciju. Promene u metabolizmu jednougleničnih jedinjenja, bilo putem remetilacije ili puteva transulfuracije, mogu dovesti do hiperhomocisteinemije i smanjenja odnosa S-adenozilmetionin/S-adenozilhomocistein, što poboljšava reakcije metiltransferaze (456). Na taj način, oštećena DNK metilacija može predstavljati mehanizam putem kojeg nedostatak vitamina B grupe može biti povezan sa neurodegeneracijom. Poznato je da su hiperhomocisteinemija i nedostatak vitamina B povezani sa smanjenjem zapremine mozga i padom kognitivnih i memorijskih funkcija (457,458), kroz mehanizme koji uključuju neuravnoteženost metilacionog i redoks potencijala, što uzrokuje promene u prilivu kalcijuma, akumulaciji amiloidnih i tau proteina, apoptozu i smrt neurona, bilo direktno ili promenom ekspresije gena (459). Takođe je poznato da ishrana i metabolička disfunkcija imaju ulogu u ALS-u (460), što je pokazano i u našoj studiji.

#### Metabolizam dopamina

Levodopa je najefikasniji lek za Parkinsonovu bolest (PD). S druge strane, postoje dokazi da levodopa i njeni metaboliti, poput dopa/dopamin kinona, imaju toksičan efekat na nigralne neurone,

što je potvrđeno in vitro istraživanjima. Takođe, postoje sve jači dokazi da oksidativni stres i mitohondrijska disfunkcija doprinose patogenezi PD (461). Ovo istraživanje je naglasilo da je metabolizam dopamina značajan molekularni put u PD, što je u skladu sa studijom koju su sproveli Dreiem et al. (2009), koja je pokazala da je MeHg supstanca koja ometa homeostazu dopamina i prelazi krvno-moždanu barijeru (462). MeHg tretman na dopaminergičke PC12 ćelije dovela je do povećane sinteze i oslobađanja dopamina, kao i nakupljanja 3,4-dihidroksifenilacetaldehida. Iako MeHg nije inhibirala enzim aldehyd dehidrogenaze, izazvala je smanjenje NAD<sup>+</sup> rezervoara u ćelijama, koji je neophodan kofaktor za aktivnost aldehyd dehidrogenaze. Generalno, svaki stimulus koji utiče na NAD<sup>+</sup> rezervoar na nivou mitohondrija dovešće do smanjenja aktivnosti aldehyd dehidrogenaze i oštećenja detoksikacije 3,4-dihidroksifenilacetaldehida. S obzirom na to da je disfunkcija kompleksa I važan događaj u patogenezi PD, izveštaji ukazuju da inhibicija kompleksa I i III mitohondrijske respiratorne lančane može dovesti do povećanih nivoa 3,4-dihidroksifenilacetaldehida i 3,4-dihidroksifeniletanola (463).

Pokazano je da se predloženi pristup toksikogenomske analize podataka može smatrati korisnim za bolje razumevanje molekularnih mehanizama uključenih u neurodegeneraciju i neurodegenerativne bolesti izazvane smešom toksičnih metala. Međutim, treba priznati da ovaj pristup ima određena ograničenja. Istraživanje podataka (*engl. data-mining*) zavisi od onlajn izvora (kao što je CTD baza podataka), kao i od kvaliteta interakcija prisutnih u njima (145,464). Pošto se podaci u toksikonomsom in silico ispitivanju dobijaju povlačenjem statističkih asocijacija između hemikalija-gena-bolesti, nije moguće razmotriti odnos doza-odgovor, put i trajanje izloženosti metalima, zajedno sa individualnom osetljivošću izloženih subjekata (465). Stoga ga treba uglavnom posmatrati kao uvid u dalja in vivo i in vitro laboratorijska ispitivanja.

## **5.2. Protektivno dejstvo probiotika na toksičnost smeše olova, kadmijuma, žive i arsena**

### **5.2.1. Hematološki, biohemijski parametri i hormoni**

U ovoj studiji zabeleženo je povećanje broja leukocita, monocita, apsolutnog broja limfocita, neutrofila i monocita u grupi koja je tretirana smešom toksičnih metal(oid)a i multikomponentnog probiotika u poređenju sa kontrolnom grupom.

Probiotici mogu uticati na nespecifični imunitet i modifikovati krvne parametre kroz interakciju sa imunskim ćelijama (466). Na primer, suplementacija probioticima u određenim istraživanjima dovela je do značajnih promena u broju leukocita, što ukazuje na njihov potencijal da utiču na imunski sistem (466). Kliničko ispitivanje, sprovedeno kod zdravih odraslih osoba koje su konzumirale mleko obogaćeno sojevima *Lactobacillus acidophilus* La1 i *Bifidobacterium bifidum*, pokazalo je značajno povećanje fagocitne aktivnosti leukocita, naročito granulocita, nakon unosa probiotika (467). Slično tome, kod grupe zdravih starijih osoba koje su konzumirale mleko sa dodatkom *Bifidobacterium lactis* HN019, zabeleženo je povećanje fagocitnog kapaciteta polimorfonuklearnih ćelija (468).

Istraživanje u sklopu ove doktorske disertacije ukazuju na mogućnost složene interakcije između probiotika i toksičnih metala, koja može uticati na dinamiku populacija imunskih ćelija u krvi. Povećanje broja monocita, limfocita i neutrofila može delom predstavljati i adaptivni odgovor organizma na stres izazvan toksičnim metal(oid)ima (469).

Pored toga, u ovoj studiji uočeno je povećanje broja eritrocita, kao i viših nivoa hemoglobina (Hb), hematokrita (HCT) i srednjeg volumena eritrocita (MCV) u grupi tretiranoj smešom toksičnih metal(oid)a i multikomponentnog ili monokomponentnog probiotika, pri čemu su neki parametri dostigli vrednosti više i od kontrolne grupe. Takođe, nivo srednje koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC) i broj trombocita, koji su bili smanjeni usled izloženosti toksičnim metal(oid)ima, vraćeni su na vrednosti slične kontrolnim u grupama tretiranim kombinacijom

toksičnih metal(oid)a i probiotika. Nasuprot tome, srednja masa hemoglobina u eritrocitima (MCH) bila je niža u grupama tretiranim kombinacijom toksičnih metal(oid)a i multikomponentnog ili monokomponentnog probiotika u poređenju sa kontrolnom grupom.

Suplementacija sojevima *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, kao i njihovom kombinacijom tokom četvoronedelnog perioda na *Charles Foster* pacovima, dovela je do značajnog povećanja broja eritrocita, nivoa hemoglobina, srednjeg volumena eritrocita, prosečne koncentracije hemoglobina u eritrocitima, ali i srednje mase hemoglobina po eritrocitu (470). Nakon tretmana laboratorijski izolovanim sojevima Pro-3 (*Weissella confusa* MZ735961) i Pro-4 (*Lactiplantibacillus plantarum* MZ727611) u trajanju od 45 dana u krvi Wistar pacova primećeno je povećanje broja eritrocita i nivoa Hb u poređenju sa negativnom kontrolom, koje je bilo izraženije kod mužjaka nego kod ženki (471). Dodatno, nakon petonedelnog tretmana probiotskim bakterijama, uključujući sledeće kombinacije: 1) *Lactobacillus plantarum* MZ707748 i MZ710117, 2) *Lactobacillus plantarum* MZ735961 i *Weissella confusa* MZ727611, 3) *Lactobacillus plantarum* MZ710117, *Weissella confusa* MZ727611 i *Lactobacillus acidophilus*, te 4) *Lactobacillus plantarum* MZ707748, MZ710117, MZ735961, *Weissella confusa* MZ727611 i *Lactobacillus acidophilus*, zabeleženo je značajno povećanje broja eritrocita, nivoa hemoglobina (Hb) i broja trombocita kod mužjaka i ženki Wistar pacova u poređenju sa negativnom kontrolnom grupom (472). Može se zaključiti da probiotici ostvaruju zaštitne efekte na hematološki sistem kroz niz složenih mehanizama. Obnavljanjem i stimulacijom eritropoeze, kao i smanjenjem oksidativnog stresa uzrokovanog izlaganjem teškim metalima, oni štite krvne ćelije od oštećenja (472,473). Dodatno, probiotici povoljno utiču na raznovrsnost i funkcionalnost crevne mikrobiote, što ne samo da poboljšava apsorpciju hranljivih materija, već omogućava i dostupnost esencijalnih minerala ključnih za održavanje normalnih parametara krvi (474). Sekvestracijom teških metala unutar svojih ćelijskih struktura, probiotici sprečavaju da ovi metali izazovu oštećenja na ćelijskom nivou, promovišući na taj način ukupno hematološko zdravlje (475). Ova poboljšanja prvenstveno se pripisuju sposobnosti probiotika da vežu teške metale, čime smanjuju njihovu bioraspoloživost i toksičnost, čuvajući tako integritet krvnih elemenata i funkcionalnost hematopoetskog sistema (476).

U ovoj studiji primećeno je smanjenje ukupnog holesterola u serumu, uz istovremeno sniženje nivoa HDL-holesterola, u grupi tretiranoj kombinacijom toksičnih metal(oid)a i multikomponentnog probiotika u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe, zabeleženo je smanjenje nivoa triglicerida i ALP u svim tretiranim grupama, pri čemu su vrednosti kod grupa tretiranih probioticima bile bliže onima u kontrolnoj grupi.

Dodavanje probiotika doprinelo je normalizaciji nivoa direktnog bilirubina i uree u grupi izloženoj smeši toksičnih metal(oid)a, dovodeći ga na nivo kontrolne grupe. Uočeno je i da je koncentracija gvožđa u serumu bila niža u grupama tretiranim smešom toksičnih metal(oid)a i probioticima u poređenju s kontrolnom grupom, a bila je i blago smanjena u poređenju sa grupom tretiranom samo smešom toksičnih metal(oid)a. S druge strane, nivo fosfata ( $PO_4^{3-}$ ) značajno je smanjen isključivo u grupi tretiranoj kombinacijom toksičnih metal(oid)a i monokomponentnog probiotika.

Suplementacija sojevima *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, kao i njihovom kombinacijom tokom četvoronedelnog perioda na *Charles Foster* pacovima, dovela je do smanjenje ukupnog holesterola u serumu, LDL-holesterola i triglicerida i značajnog povećanja koncentracije HDL-holesterola (470). Oštećenje jetre manifestuje se poremećajem nivoa serumske aktivnosti jetrenih enzima, kao što su ALT, AST i ALP. Nasuprot rezultatima ove studije, u studiji (477) nisu zabeleženi značajni efekti *Saccharomyces boulardii* na nivoe ALP kod pacova sa eksperimentalno izazvanom opstruktivnom žuticom (477). Međutim, randomizovana kontrolisana studija pokazala je da *Saccharomyces boulardii* smanjuje nivoe ALP kod pacijenata sa dekompenzovanom cirozom (478). Nakon šest nedelja oralne suplementacije multikomponentnim

probiotikom (*Bifidobacterium bifidum* W23, *B. lactis* W51, *B. lactis* W52, *Lactobacillus acidophilus* W37, *L. brevis* W63, *L. casei* W56, *L.salivarius*W24, *Lactococcuslactis*W19 and *Lc. lactis* W58) uočeno je da oralna suplementacija multikomponentnim probiotikom ispoljava dozno-nezavisan i povoljan efekat na bioraspoloživost gvožđa i apsorpciju gvožđa u dvanaestopalačnom crevu kod modela pacova. Takođe, utvrđeno je da izaziva dozno-nezavisno preusmeravanje gvožđa iz seruma, što je usaglašeno sa rezultatima istraživanja u okviru ove doktorske disertacije (479). Međutim, smanjen nivo gvožđa u serumu u grupama tretiranim smešom toksičnih metal(oid)a i probioticima u poređenju s kontrolnom grupom može biti i rezultat kompleksnih inerakcija između toksičnih metal(oid)a i probiotika. Pozitivan uticaj probiotika na funkciju bubrega i nivo uree, kao markera bubrežne funkcije kod hroničnih bubrežnih oboljenja, već je dokumentovan (480). Takođe, istraživanja Majlesi i saradnika (2017) pokazala su da probiotski sojevi *Bacillus coagulans* i *Lactobacillus plantarum* doprinose ublažavanju toksičnosti Hg kod pacova, pri čemu se njihov zaštitni efekat ogleda i u poboljšanju nivoa uree nakon izlaganja ovom metalu (127). Pored toga, s obzirom na sposobnost probiotskih sojeva da utiču na apsorpciju i metabolizam određenih minerala, moguće je da smanjenje nivoa  $PO_4^{3-}$  u grupi tretiranoj sojem *Saccharomyces boulardii* proizlazi iz ovog efekta. Takođe, specifična interakcija ovog soja sa metal(o)idima mogla bi doprineti promenama u apsorpciji drugih hranljivih materija, uključujući fosfate (481).

Iako o regulaciji hormonalne signalizacije ima dosta podataka još uvek nije precizno razjašnjena. Sve je više dokaza da mikrobiota utiče na proizvodnju i lučenje hormona, reaguje na hormone domaćina i reguliše nivo ekspresije hormona domaćina (482).

U ovoj studiji uočeno je da multikomponentni i monokomponentni probiotik dovode nivo fT3 na kontrolni u poređenju sa smanjenjem uzrokovanim tretmanom smešom metal(oid)a, ali i da multikomponentni probiotik smanjuje nivo T4 u poređenju sa kontrolnom grupom. U nivoima fT4 i T3 nije bilo značajnih efekata probiotika. U skladu sa tim rezultima, meta-analiza koja sumira rezultate osam randomizovanih kontrolisanih ispitivanja pokazala je da suplementacija probioticima/prebioticima ne utiče na nivo hormona štitaste žlezde, ali može u manjoj meri smanjiti nivo antitela na receptor za tireostimulirajući hormon kod pacijenata sa Gravesovom bolešću (483). Nasuprot ovim rezultatima, u grupi miševa obolelih od hipotiroidizma indukovano karbimazolom primećen je značajan porast nivoa tiroidnih hormona trijodotironina (T3) i tiroksina (T4) i značajno smanjenje nivoa tireostimulirajućeg hormona (TSH) prilikom ishrane mlekom obogaćenim bakterijama *L. acidophilus*, *L. casei* and *L.plantarum*. Najveći efekat uočeno je u grupi tretiranoj smešom bakterija, a ovaj efekat je pokazatelj sposobnosti mlečnokiselinskih bakterija da obnove i povećaju nivo ćelija štitaste žlezde za lučenje hormona, a time su doprinele regulaciji i ravnoteži rada ove žlezde u lučenju njenih hormona (484).

U istraživanju sprovedenom u okviru ove doktorske disertacije uočeno je da multikomponentni, a posebno monokomponentni probiotik, povećavaju nivo testosterona koji je blago smanjen nakon tretmana smešom metal(oid)a. Blago povećanje nivoa androstendiona uočeno je u grupi MIX 5 + SB u odnosu na sve ostale grupe, ukazujući na androgeni protektivni efekat soja *Saccharomyces boulardii*. Povećanje nivoa testosterona uočeno je i nakon primene probiotika sa semenkama maslačka, korijandera i urme kod mužjaka pacova tretiranih živom (25ppm) u trajanju od 42 dana. Sličan efekat uočeno je i pri primeni multikomponentnog probiotika istog sastava (*Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus planarum* LP 6595 i *Lactobacillus planarum*) na ublažavanje toksičnih efekata smeše di-2-etilheksil ftalata, di-n-butil ftalata i bisfenola A, što ukazuje da protektivni efekat nije specifičan za određenu supstancu (485). Međutim, randomizovana, dvostruko slepa, placebo-kontrolisana studija koja je ispitivala efekat suplementacije probioticima ne podržava hipotezu da suplementacija *L. reuteri* ATCC PTA 6475 može povećati nivo testosterona kod starijih muškaraca (486).

U ovoj studiji, nivoi renina, aldosterona i kortizola nisu bili značajnije izmenjeni u poređenju sa kontrolnom grupom, ali je primećen trend smanjenja kortizola u grupama tretiranim probioticima.

Ova hipoteza podržana je rezultatima meta-analize koji sugerišu da suplementacija probioticima može smanjiti nivo kortizola, naročito u određenim podgrupama, ali su potrebna dalja istraživanja kako bi se bolje razumeli mehanizmi delovanja i faktori koji utiču na rezultate (487). Suplementacija probioticima pokazala je značajno smanjenje nivoa kortizola, naročito kod zdravih pojedinaca, pri čemu je najveći efekat primećen prilikom upotrebe pojedinačnih sojeva probiotika, dok su studije u Aziji ukazale na još izraženiji učinak. Probiotici utiču na osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda i mogu modulirati odgovor na stres, poboljšavajući zdravlje creva i smanjujući upalu (487).

#### 5.2.2. Nivoi metal(oid) u krvi, fecesu i tkivima

Prethodne studije su pokazale da probiotici poseduju sposobnost vezivanja metal(oida), što dovodi do njihovog smanjenog prisustva u krvi i tkivima (111,476).

U ovoj studiji uočeno je da oba probiotika u manjoj ili većoj meri smanjuju nivo metaloida u krvi, tkivima i fecesu tretiranih životinja. Izmereni Pb i Cd u fecesu tretiranih životinja u grupi tretiranoj toksičnim metal(oid)ima i multikomponentnim probiotikom bili su u nivou kontrole nakon 14 dana tretman. Slično tome, nivoi tih metala su nakon 28 dana izloženosti toksičnim metal(oid)ima i monokomponentnim probiotikom takođe bili u kontrolnom nivou.

Uočeno je da, u poređenju sa kontrolom, multikomponentni probiotik značajno smanjuje nivo Pb u femuru, Cd u jetri i plućima, Hg u femuru i As u krvi, plućima i femuru tretiranih životinja. Takođe je uočeno da, u poređenju sa kontrolom, monokomponentni probiotik značajno smanjuje nivo Pb u bubrezima, Cd u krvi i plućima, Hg u femuru i As u krvi, plućima i femuru tretiranih životinja.

#### 5.2.3. Distribucija bioelemenata u krvi, fecesu i tkivima

Poznato je da toksični metali, ali i probiotski sojevi mogu uticati na apsorpciju određenih elemenata, promeniti crevnu mikrofloru, kao i distribuciju bioelemenata u organizmu (474,479).

U ovoj studiji uočeno je da i multikomponentni i monokomponentni probiotik smanjuju nivo Fe u tkivu jetre, bubrega, pluća, pankreasa, slezine, testisa i femura. Takođe, uočeno je i da multikomponentni i monokomponentni probiotik dovodi nivo Zn u nivo kontrolne grupe u jetri. Uočeno je i povišen nivo Cu u grupi tretiranoj monokomponentnom probiotikom. U tkivu mozga, Cu i Mn su povišeni u svim tretiranim grupama, dok je Cu značajno povišen u plućima u svim tretiranim grupama. U femuru, Zn i Mn su povišeni u svim tretiranim grupama.

Smanjenje nivoa Fe u tkivima može se objasniti smanjenjem nivoa Fe u serumu koje je posledica štetnog dejstva metala. Takođe, ovi efekti se potencijalno mogu se objasniti i promenom apsorpcije u prisustvu probiotskih sojeva, ali i preraspodelom bioelemenata pod dejstvom toksičnih metal(oida) i njihovog štetnog dejstva na redoks status (474,479).

#### 5.2.4. Parametri redoks statusa u krvi i tkivima

U ovom istraživanju zabeležen je blag trend smanjenja većine prooksidativnih parametara, uključujući TOS, PAB, MDA i AOPP, u grupama pacova tretiranih multikomponentnim i monokomponentnim probiotikom. Ove promene dovele su do smanjenja skora oksidativnog oštećenja u pomenutim grupama, kao i do blagog smanjenja povećanog skora oksidativne ravnoteže u krvi pacova nakon subakutnog oralnog izlaganja smeši teških Pb, Cd, Hg i As.

Izloženost kadmijumu u koncentraciji od 70 ppm tokom 35 dana rezultirala je povećanjem parametara oksidativnog stresa u krvi Wistar pacova. Tretman probiotikom i njegovom nanoformulacijom, koji sadrže sojeve *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* u dozi od 1 mL sa koncentracijom  $2 \times 10^8$  CFU, značajno je smanjio nivoe biomarkera oksidativnog stresa, uključujući 8-hidroksideoksiguanozina (8-OHdG), AOPP i metilglioksala (MG) u serumu. Ovi efekti pripisuju se antioksidativnim i helatnim svojstvima probiotika, pri čemu je nanoformulacija pokazala veću

efikasnost u smanjenju nivoa 8-OHdG u serumu (488). Slično tome, u studiji sprovedenoj na Wistar pacovima zabeleženo je smanjenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u krvi nakon tretmana kadmijumom u dozi od 200 µg dnevno tokom 42 dana. Ovaj efekat je neutralisan istovremenom primenom *Lactobacillus plantarum* ( $1 \times 10^9$  CFU/dan) i inulina (5% ukupne hrane), kao i kombinacijom kadmijuma sa *Bacillus coagulans* ( $1 \times 10^9$  spora/dan) i inulinom (5% ukupne hrane). Međutim, u istoj studiji nije zabeležena statistički značajna razlika u vrednostima malondialdehida (MDA) i aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) između svih posmatranih grupa (489). Slično, primena *Lactobacillus plantarum* ( $1 \times 10^9$  CFU/dan) i inulina (5% ukupne hrane), kao i *Bacillus coagulans* ( $1 \times 10^9$  spora/dan) i inulina (5% ukupne hrane) kod pacova tretiranih živom značajno je povećala GPX i vrednosti SOD u serumu (489). U istraživanju na miševima izloženim olovu putem vode u koncentraciji od 1 g/L, vijabilni i inaktivirani soj *Lactobacillus plantarum* CCFM8661w pokazali su protektivni efekat smanjenjem povišenih nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta u krvi (490). Dodatno, u studiji na Wistar pacovima tretiranim natrijum-arsenitom tokom četiri nedelje, primenjena je suspenzija od 2 mL sa  $2 \times 10^9$  CFU liofilizovanih probiotskih sojeva *Lactobacillus* i *Bifidobacterium lactis*. Tretman je poboljšao redoks status krvi, smanjio nivo MDA i povećao koncentracije SOD, CAT i GSH u serumu (491).

U ovom istraživanju zabeleženo je značajno poboljšanje većine parametara redoks statusa u tkivima jetre i bubrega kod pacova subakutno oralno izloženih smeši teških metala (Pb, Cd, Hg i As). Tretman multikomponentnim i monokomponentnim probiotikom pokazao je protektivni efekat, pri čemu je monokomponentni probiotik ispoljio izraženije poboljšanje antioksidativnih parametara. Ove promene rezultirale su smanjenjem indeksa oksidativnog stresa i povećanjem skora antioksidativne zaštite u tkivu jetre, u poređenju sa grupom pacova koja nije bila tretirana probioticima, dok u tkivu bubrega nije bilo razlike u skoru oksidativne ravnoteže.

Banwo i saradnici (2021) su pokazali da sojevi *Lactobacillus plantarum* ML05 i *Pichia kudriavzevii* FY05 mogu smanjiti štetne posledice izloženosti Cd i Pb (492). Ispitivani sojevi, pojedinačno ili u kombinaciji, značajno ublažavaju oksidativni stres u jetri i bubrežima pacova, što se ogleda u sniženju nivoa malondialdehida (MDA) i povećanju aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutationa (GSH) izazvanih ovim toksičnim metalima. Kombinacija oba soja se pokazala naročito efikasnom u povećanju koncentracija GSH i CAT u jetri pacova izloženih olovu tokom 28 dana, dok je kod pacova izloženih kadmijumu najefikasnije smanjila nivo MDA u jetri. Takođe, kombinovana primena ovih sojeva doprinela je značajnom povećanju SOD, CAT i GSH u bubrežima pacova tretiranih kadmijumom, dok je soj *Lactobacillus plantarum* ML05 pružio veću zaštitu redoks statusa bubrežnog tkiva pri izlaganju olovu. Istraživanje Ojekule i saradnika je pokazalo da *Weissella cibaria* WD2 i *Lactobacillus plantarum* CaD1 imaju izražen antioksidativni kapacitet (493). *In vivo* eksperimenti na albino pacovima vrste Wistar, tretiranim Cd i Pb tokom 28 dana, pokazali su da administracija ovih sojeva poboljšava antioksidativni kapacitet bubrega i jetre oštećenih teškim metalima. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KLDS1.0207 pokazao je sposobnost unapređenja antioksidativne zaštite jetre i bubrega kod miševa izloženih tretmanu olovom nakon 15 dana (494). U studiji na pilićima, suplementacija *Lactobacillus pentosus* ITA23 i *Lactobacillus acidipiscis* ITA44 u potpunosti obnovila antioksidativnu zaštitu u jetri nakon izloženosti olovu tokom 21 dana (495). U eksperimentalnoj studiji sprovedenoj na miševima koji su akutno oralno izloženi kadmijumu u dozi od 1,8 mg, ustanovljeno je da i vijabilni i inaktivirani soj *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 ispoljavaju protektivni efekat. Ovaj efekat ogleda se u smanjenju oksidativnog stresa u bubrežima i jetri, uz normalizaciju nivoa SOD, CAT, GSH i MDA u ovim tkivima (496).

U ovom istraživanju utvrđeno je povećanje većine parametara redoks statusa u moždanom tkivu pacova subakutno izloženih smeši teških metala (Pb, Cd, Hg i As), uključujući i grupe tretirane probioticima. Ipak, primena multikomponentnog probiotika pokazala je izraženiji efekat u poboljšanju antioksidativne zaštite u mozgu. Probiotici imaju značajan povoljan uticaj na redoks

status u mozgu, što potvrđuje primer u kojem se oksidativni stres, izazvan disbiozom crevne mikrobiote, manifestovao smanjenjem aktivnosti GSH i SOD, kao i povećanjem nivoa MDA u kortiko-hipokampalnom regionu mozga. Ove štetne promene su delimično ublažene primenom probiotskog tretmana koji sadrži *Lactobacillus sporogenes*, *Clostridium butyricum* i *Streptococcus faecalis* (497).

Najveći broj istraživanja koja su se bavila zaštitnim efektima probiotika na uticaj toksičnih metala na moždano tkivo fokusirao se na Pb. Studija koju su sprovedeli Zhai i saradnici (2018) pruža značajne dokaze da dijetetski suplementi koji sadrže probiotike (*Lactobacillus plantarum* CCFM8661), mikronutrijente i biljne ekstrakte mogu predstavljati inovativnu nutritivnu strategiju za suzbijanje toksičnosti izazvane olovom (498). Rezultati pokazuju da oba ispitivana suplementa efikasno povećavaju nivo SOD i regenerišu GSH, dok istovremeno smanjuju koncentraciju MDA u moždanom tkivu miševa izloženih Pb (498). Zaštitni efekti ovih dijetetskih suplemenata u ublažavanju oksidativnog stresa i kognitivnih oštećenja pokazali su se superiornijim u poređenju sa tretmanima helatorima. Dodatno, primena suplemenata tokom izlaganja olovu obezbedila je značajniju zaštitu nego njihova primena nakon završetka izlaganja. Potencijal probiotskog soja *Lactobacillus rhamnosus* u ublažavanju oksidativnog stresa u mozgu nakon izloženosti 0,2% olovu mLadih Wistar pacova tokom perioda gestacije i laktacije pokazan je u studiji (499). Izlaganje olovu dovelo je do smanjene aktivnosti enzima SOD, GPX, CAT i GSH u mozgu, dok je primena ovog probiotskog soja značajno poboljšala njihove nivoe, ukazujući na njegov zaštitni efekat (499). Nadalje, u istraživanju sprovedenom na miševima, ustanovljeno je da soj *Lactobacillus fermentum* HNU312 takođe poseduje sposobnost da ublaži oksidativna oštećenja i poremećaje u ponašanju izazvane hroničnom izloženošću Pb tokom ranog razvoja mozga. Ovaj probiotski soj doprineo je smanjenju nivoa MDA, dok je istovremeno povećao koncentracije SOD i GSH u mozgu, u poređenju sa kontrolnom grupom izloženom samo olovu (500).

Oralna primena probiotika *Saccharomyces boulardii* pokazala je zaštitni efekat u ublažavanju povreda pluća izazvanih ishemijom aorte i reperfuzijom kod pacova (501). Ovaj efekat ogleda se u smanjenju oksidativnog stresa, očuvanju integriteta crevnih ćelija i modulaciji inflamatornih procesa (501). Nedeljna suplementacija ovim probiotikom pre ishemije rezultirala je nižim nivoima MDA i povećanom koncentracijom GSH u plućnom tkivu (501). Pozitivni efekat probiotskog soja *Lactiplantibacillus plantarum* na inflamaciju pluća povezanu sa izloženošću PM2.5 česticama može se objasniti njegovim antioksidativnim svojstvima (502). S obzirom na to da PM2.5 čestice često sadrže toksične metale, rezultati ove studije podržavaju hipotezu da probiotski sojevi mogu ublažiti štetne efekte određenih toksičnih supstanci na respiratorni sistem (502). U ovom istraživanju pokazano je da je *Saccharomyces boulardii* smanjio nivo većine prooksidativnih parametara, iako je istovremeno zabeleženo i smanjenje nivoa SOD i GSH u ovoj grupi.

Lutgendorff i saradnici su utvrdili da primena višekomponentnog probiotika, koji sadrži sojeve *Lactobacillus acidophilus* (W70), *Lactobacillus casei* (W56), *Lactobacillus salivarius* (W24), *Lactococcus lactis* (W58), *Bifidobacterium bifidum* (W23) i *Bifidobacterium lactis* (W52), značajno smanjuje oksidativni stres u pankreasu na modelu akutnog pankreatitisa (503). Pretretman ovim probiotikom pospešuje biosintezu glutationa (GSH) i povećava njegov nivo u pankreasnom tkivu, što doprinosi prevenciji peroksidativnih oštećenja pankreasa i poboljšanju lokalnih inflamatornih odgovora (503). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da multikomponentni probiotik značajno smanjuje nivo MDA i blago povećava koncentraciju TAS, dok *Saccharomyces boulardii* doprinosi blagom porastu nivoa SOD u tkivu pankreasa.

Suplementacija jogurtom, kefirnim mlekom i kefirnim zrcima pokazala je povoljne efekte u ublažavanju štetnog dejstva izloženosti Pb. Ovi efekti su se manifestovali kroz smanjenje nivoa MDA, uz istovremeno povećanje nivoa SOD i GSH u tkivu testisa pacova, u poređenju sa grupom izloženom samo olovu u dozi od 50 mg/kg telesne mase dnevno tokom perioda od 35 dana (504).

Takođe, nakon jednomesečne izloženosti kadmijumu putem oralne gavaže (10 ppm), tretman fekalnom transplantacijom mikrobiote (FMT) u kombinaciji sa (probiotski soje HD-48) pokazao je značajan protektivni efekat na antioksidativne enzime u testisima (505). Rezultati su pokazali povećanu aktivnost katalaze (CAT), superoksid-dismutaze (SOD) i glutation-peroksidaze (GPx), što ukazuje na smanjenje oksidativnog stresa izazvanog kadmijumom (505). Rezultati ovog istraživanja sugerišu da multikomponentni probiotik doprinosi blagom smanjenju većine prooksidativnih parametara u tkivu testisa, u poređenju sa vrednostima ovih parametara u grupama izloženim smeši toksičnih metala.

#### 5.2.5. Aktivnost acetilholinesteraze u mozgu

U okviru ovog istraživanja ustanovljeno je da primena multikomponentnog probiotika efikasno sprečava smanjenje aktivnosti enzima acetilholinesteraze (AChE) izazvanog izlaganjem smeši metal(oid)a. Nasuprot tome, monokomponentni probiotik nije pokazao značajnu delotvornost u postizanju ovog efekta.

Acetilholinesteraza je esencijalni enzim u regulaciji nervne provodljivosti u biološkim sistemima. Njena osnovna uloga je razgradnja acetilholina, čime se prekida ekscitatorni efekat ovog neurotransmitera na postsinaptičke membrane i omogućava pravilno funkcionisanje prenosa nervnih impulsa. Pored toga, acetilholinesteraza učestvuje u procesu razvoja i sazrevanja neuronskih struktura, doprinoseći kako razvoju tako i regeneraciji nervnih ćelija (506).

U studiji koju su sprovedi Long i saradnici (2022), pacovima je tokom perioda od 12 nedelja putem vode davano olovo u koncentraciji od 200 mg/L (507). Istovremeno, primena probiotičkog soja *Lactobacillus fermentum SCHY34* u dozi od  $10^9$  CFU/kg telesne mase pokazala je potencijal za ublažavanje neurotoksičnih efekata olova na moždano tkivo *Sprague-Dawley* pacova. Ovaj probiotski soj doprineo je očuvanju normalnog lučenja i aktivnosti različitih neurotransmitera, uključujući i acetilholinesterazu (507).

Neke studije sugerišu da probiotik može usporiti progresiju Alchajmerove bolesti i pozitivno uticati na kognitivne funkcije. Ovaj efekat se može objasniti sposobnošću određenih sojeva da sintetišu neurotransmitere i neuromodule. Pokazano je da soj *Lactobacillus plantarum* pogoduje sintetisanju acetilholina (508). Takođe, soj *Lactobacillus plantarum MTCC 1325* pokazao je povoljne efekte na modelu Alchajmerove bolesti izazvane D-galaktozom kod albino pacova. Njegova primena dovela je do povećanja nivoa acetilholina (ACh) u hipokampusu i moždanom korteksu, kao i do značajnog poboljšanja kognitivnih funkcija, uključujući pamćenje i prostorno učenje (509). Unapređene kognitivne funkcije i poboljšano pamćenje se pripisuje antioksidativnim svojstvima acetilholina, kao i svojstvu da povećanje nivoa antioksidanasa doprinosi poboljšanju aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaze, istovremeno smanjujući nivo acetilholinesteraze (510). Pored toga, Roy Sarkar i saradnici (2020) su utvrdili da disbioza crevne mikrobiote može dovesti do neurobihevioralnih promena kod miševa. Primećeni su smanjena gustina neurona u hipokampusu, oslabljene kognitivne funkcije, povećana aktivnost acetilholinesteraze u kortiko-hipokampalnom području i pojačan oksidativni stres, a ove promene su delimično ublažene probiotskim tretmanom koji sadrži *Lactobacillus sporogenes*, *Clostridium butyricum*, *Streptococcus faecalis* (497).

#### 5.2.6. Histopatološke promene u tkivima

U ovom istraživanju utvrđeno je da su histopatološke promene u tkivima jetre, bubrega, mozga, srca i pluća bile donekle smanjene u grupama tretiranim multikomponentnim i monokomponentnim probiotikom u poređenju sa grupom izloženom smeši metal(oid)a. U tkivu testisa, sve tretirane

grupe pokazale su slične histopatološke promene, dok u tkivima slezine i femura nije bilo uočljivih razlika između tretiranih i kontrolne grupe. Od svih ispitivanih tkiva, multikomponentni i monokomponentni probiotici uspeli su da neutralizuju efekat smeše metal(oid)a jedino u tkivu pankreasa.

Pozitivni efekti probiotika na pankreas potvrđeni su i u studiji Lutgendorff i saradnika (2008), gde je višekomponentni probiotik, koji sadrži sojeve *Lactobacillus acidophilus* (W70), *Lactobacillus casei* (W56), *Lactobacillus salivarius* (W24), *Lactococcus lactis* (W58), *Bifidobacterium bifidum* (W23) i *Bifidobacterium lactis* (W52), značajno smanjio oštećenja pankreasa u modelu akutnog pankreatitisa. Pretretman ovim probiotikom doveo je do ublažavanja edema, hemoragije i neutrofilne infiltracije u tkivu pankreasa, što ukazuje na njegov zaštitni potencijal u ovakvim okolnostima (503).

#### 5.2.7. Mehanizmi dejstva probiotika u ublažavanju štetnih efekata toksičnih metal(oid)a

Probiotici su prepoznati kao obećavajući biološki agensi u umanjenju štetnih efekata toksičnih metal(oid)a poput Pb, Cd, Hg i As. Njihovo delovanje temelji se na složenim mehanizmima koji podržavaju detoksikaciju organizma i smanjuju gastrointestinalnu apsorpciju ovih štetnih supstanci (511).

##### 5.2.7.1. Površinsko vezivanje, bioakumulacija i faktori koji utiču na efikasnost

Probiotici poseduju sposobnost vezivanja jona toksičnih metal(oid)a putem funkcionalnih grupa prisutnih u njihovim ćelijskim zidovima, čime se smanjuje njihova apsorpcija i akumulacija u tkivima, ali i pospešuje eliminaciju metala iz organizma. Proces vezivanja metala zavisi od prisustva specifičnih struktura i funkcionalnih grupa probiotika. Na primer, S-sloj proteina u ćelijskom zidu probiotika pospešuje vezivanje Pb putem interakcije sa grupama poput –OH, –C=O i –N–H. Za Cd, dominantan mehanizam vezivanja uključuje jonsku razmenu, dok su za As značajne hidroksilne i karbonilne grupe. Na efikasnost vezivanja utiču faktori poput pH vrednosti, temperature, prisustva žučnih soli i vrste toksične supstance (512–514).

U ovom istraživanju uočeno je da su i multikomponentan i monokomponentan probiotik značajno smanjili koncentraciju svih ispitivanih metal(oid)a u *in vitro* uslovima.

##### 5.2.7.2. *In vivo* mehanizmi (modulacija crevne mikrobiote, antioksidativna svojstva, modulacija imunog sistema)

Pored vezivanja, protektivno delovanje probiotika može se ostvariti i drugim mehanizmima (511,513). Mnoga protektivna svojstva probiotika, poput adsorpcije i posledičnog smanjenja koncentracije štetnih supstanci, demonstrirana su u *in vitro* uslovima, ali se njihova efikasnost u potpunosti može potvrditi samo kroz *in vivo* studije (511). Prethodne studije ukazuju na smanjenu apsorpciju, povećano izlučivanje metala i obnavljanje crevne barijere, kao i smanjenje oksidativnog stresa i inflamacije izazvanih izloženošću metalima (511). Izloženost toksičnim metalima narušava mikrobiotski balans u crevima, dovodeći do disbioze. Probiotici pomažu u obnavljanju ravnoteže mikrobiote i jačanju crevne barijere, čime se smanjuje ulazak metala u sistemsku cirkulaciju (514). Takođe, oni utiču na regulaciju ekspresije proteina uključenih u transport metala, smanjujući njihovu apsorpciju (514).

Mnogi probiotički sojevi poseduju antioksidativne sposobnosti, koje pomažu u neutralisanju reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) generisanih tokom izlaganja teškim metalima (515). Ove osobine doprinose smanjenju oksidativnog stresa i zaštiti tkiva od oštećenja izazvanih metalima. Određeni

probiotici transformišu toksične metale u manje štetne forme, dodatno umanjujući njihovu bioraspoloživost (npr. vezivanje metala za ćelijsku površinu bakterija, metabolička transformacija As u manje toksične metilovane derivate, transformacija metilovane Hg u neorgansku Hg ( $Hg^{2+}$ ) zatim u  $Hg^0$ , koja se slabije apsorbuje u gastrointestinalnom traktu) (515–517).

Probiotici utiču i na imunske procese povezane s toksičnim dejstvom metala, povećavajući aktivnost imunskih ćelija uključenih u detoksikaciju. Na ovaj način se smanjuje inflamacija izazvana metalima, dok se toksični metali transformišu u manje reaktivne oblike putem imunološki posredovanih mehanizama (513–515).

U ovom istraživanju uočeno je da su multikomponentan i monokomponentan probiotik ostvarili protektivno dejstvo na hematološke, biohemijske parametre, kao i na parametre oksidativnog stresa u krvi i tkivima. Takođe ostvarili su protektivan efekat na acetilholinesterazu.

Kliničke studije potvrđuju efikasnost probiotika u smanjenju štetnih efekata toksičnih metala. Na primer, sojevi poput *Pediococcus acidilacti* pokazali su potencijal u prevenciji akumulacije metala u ljudskom organizmu (518). Pored toga, kliničko ispitivanje pokazalo je da oralna suplementacija jogurtom obogaćenim sojem *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 značajno smanjuje koncentracije toksičnih metala, prvenstveno Hg i As, u krvi trudnica i dece (519).

Probiotici poseduju značajan potencijal kao agensi u ublažavanju štetnih efekata teoksičnih metala. Njihovo višestruko delovanje – uključujući vezivanje metala, modulaciju mikrobiote, antioksidativni efekat, imunološku modulaciju i kliničku efikasnost – čini ih obećavajućim sredstvom za zaštitu zdravlja od štetnih efekata zagađivača iz grupe toksičnih metala.

## 6. ZAKLJUČCI

Ispitivanjem subakutne toksičnosti smeše rastućih doza Pb, Cd, Hg i As kod pacova mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Značajan porast nivoa Pb, Cd, Hg i As u krvi uočen je u grupi kojoj je davana najviša doza smeše ispitivanih metala u odnosu na kontrolu. Takođe, značajne promene u smanjenju unosa hrane i vode, kao i prirasta telesne mase uočene su pri najvišem doznom nivou.
- Subakutno izlaganje rastućim dozama smeše Pb, Cd, Hg i As dovodi do dozno i tkivno specifične akumulacije toksičnih metala. Značajno povećanje nivoa Cd u jetri, Pb i Cd u bubrežima i As u mozgu dobijeno je za srednji i dva najviša primenjena dozna nivoa, dok je pri primeni dva najviša dozna nivoa dobijeno značajno povećanje Hg u bubrežima, Cd u mozgu i Pb u femuru. Značajno povećanja As u jetri, bubrežima, plućima u femuru, kao i Cd u plućima, pankreasu i femuru dobijeno je pri izloženosti najvišoj primenjenoj dozi ispitivanih metala.
- Izlaganje najnižoj dozi ispitivane smeše metala dovodi do značajnijih promena parametara anemije u krvi, odnosno sniženja broja eritrocita, hemoglobina, hematokrita, i nivoa gvožđa, kao i značajnog povećanja parametra oksidativnog stresa,  $O_2^-$ , PAB i AOPP. Sa porastom doza efekti smeše metala na parametre anemije ostaju i dalje značajno promenjeni, kao i efekti na parametre oksidativnog stresa, povećan  $O_2^-$  i MDA, a smanjen nivo SH grupa. Dodatno, pri najvišim doznim nivoima dobijeno je značajno povećanje broja leukocita, neutrofila i trombocita, kao i smanjenje HDL i triglicerida. Povećan direktni bilirubini i smanjen nivo ALP u odnosu na kontrolu dobijeni su u svim doznim nivoima.
- Tkiva ispoljavaju različitu osetljivost na oksidativni stres izazvan rastućim dozama smeše toksičnih metala (Pb, Cd, Hg, As). Najizraženije promene zabeležene su mozgu i plućima s tim da je u mozgu dobijeno povećanje praćenih parametara redoks statusa pri skoro svim doznim nivoima, dok je u plućima zabeleženo smanjenje većine parametara, osim IMA i SH grupa čiji su nivoi povećani. U jetri je dobijeno smanjenje SOD i GSH pri većini doznih nivoa, dok je MDA snižen u srednjem i dva najviša dozna nivoa u bubrežima. Dodatno, više doze smeše Pb, Cd, Hg i As značajno su smanjile aktivnost enzima AChE u mozgu.
- Najniži primenjeni dozni nivo smeše Pb, Cd, Hg i As doveo je do značajnog smanjenja Cu, Fe i Mn u mozgu pacova i do značajnog smanjenja Cu u bubrežima, dok promene u nivoima biolemenata u drugim tkivima nisu uočene pri primeni nižih doza. Izlaganje eksperimentalnih životinja dva najviša dozna nivoa dovodi do značajnog smanjenja Fe u najvećem broju ispitivanih organa, Cu u mozgu i plućima i Mn u mozgu i srcu, dok je nivo Zn značajno povećan u jetri.
- Histopatološka analiza ukazuje na progresivna oštećenja većine organa pri izloženosti smeši metal(a), sa uočljivijim efektima pri većim doznim nivoima i najizraženijim promenama primećenim u jetri, bubrežima, mozgu, srcu, plućima i testisima.
- *Benchmark* analiza utvrdila je postojanje doza-odgovor za sledeće efekte: povećanje nivoa SOD u plazmi, povećanje fokalne infiltracije mononuklearnim ćelijama u jetri, smanjenje neorganskog fosfata u u krvi, smanjenje nivoa MCH i MCV, povećanje edema intersticijuma u testisima, smanjenje nivoa trijodtironina. Najniža BMD vrednost je za nivo MCV, koji predstavlja kritični toksični efekat za svaki metal(oid) u ispitivanoj smeši, odnosno *Benchmark* dozu studije i iznosi  $3,15E-04$  mg Pb/kg t.m./dan,  $1,05E-03$  mg Cd/kg t.m./dan,  $2,10E-05$  mg Hg/kg t.m./dan i  $2,10E-04$  mg As/kg t.m./dan.
- *In silico* analiza ukazala je da smeša ispitivanih metala Pb, Cd, Hg i As dominantno ispoljava efekat na nivou kardiovaskularnog i nervnog sistema što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim *in vivo*. Uočene značajne promene u hematološkim parametrima, prvenstveno u grupama pacova izloženih najvišim doznim nivoima, ukazuju na razvoj anemije i trombocitoze, pri čemu promene u ekspresiji miRNA i transkripcionih faktora utiču na njihove signalne puteve i doprinose razvoju ovih promena. Efekat smeše ispitivanih metala na nervni sistem odvija se kroz aktivaciju oksidativnog stresa i disfunkcionalnost ključnih molekularnih puteva (detoksikacija ROS, metabolizam folne

kiseline i vitamina B12, AGE-RAGE signalni put i apoptoza), pri čemu je gen *SOD2* identifikovan kao centralna meta toksičnog dejstva.

Ispitivanjem protektivnog dejstva probiotika na ispoljavanje štetnih efekata smeše Pb, Cd, Hg i As mogu se izvesti sledeći zaključci:

- *In vitro* rezultati pokazuju da su probiotici efikasni u smanjenju koncentracije ispitivanih metala, pri čemu je monokomponentni probiotik efikasniji u smanjenju koncentracija Cd i As, dok je dejstvo mono- i multikomponentnog probiotika veoma slično u smanjenju koncentracije Pb i Hg.
- Oba probiotika uticala su na značajno smanjenje nivoa Cd, Hg i As u krvi u poređenju sa grupom životinja tretiranom najvišom dozom smeše Pb, Cd, Hg i As. Smanjenje Pb je bilo izraženije pri primeni multikomponentnog probiotika, ali ne i statistički značajno u odnosu na životnje tretirane smešom ispitivanih metala.
- Primena oba probiotika dovodi do smanjenja ispitivanih metal(oid)a u tkivima, multikomponentni probiotik efikasniji je u umanjenju Cd i Hg u jetri, Hg u bubrežima i Pb, Cd i As u femuru, dok je monokomponentni probiotik efikasniji u smanjenju koncentracije Pb i As u bubrežima i Cd i As u plućima.
- Posle četiri nedelje tretmana, oba probiotika anulirala su smanjenje unosa hrane i vode izazvano najvišom dozom smeše Pb, Cd, As i Hg, dok je smanjenje prirasta telesne mase anulirao samo multikomponentni probiotik. Primena oba probiotika anulirala je negativan efekat ispitivane smeše metala na smanjenje relativne mase jetre.
- Promene u hematološkim parametrima izazvane najvišom dozom ispitivane smeše metala, smanjenje hemoglobina, hematokrita, MCV, kao i povećanje MCHC i trombocita, su u nivou kontrolnih vrednosti kod životinja kojima su primenjivana oba probiotika.
- Primena oba probiotika dovodi do normalizovanja povišenih vrednosti direktnog bilirubina i smanjene vrednosti uree koje su dobijene kod životinja tretiranih smešom toksičnih metala.
- Suplementacija sa oba probiotika normalizuje nivo slobodnog trijodtironina, kao i koncentracije Zn u jetri i smanjuje povišene koncentracije Mn u mozgu.
- Primena oba probiotika pozitivno utiče na parametar TAS u krvi, dok je monokomponentni probiotik pozitivno delovao na sniženje nivoa MDA u krvi, dovodeći ga u nivo kontrolne vrednosti. U pogledu parametara redoks statusa u tkivima primena samo multikomponentnog probiotika je dovela do poboljšanja u odnosu na efekte izazvane smešom toksičnih metala, normalizovana je vrednost TAS u jetri, IMA u plućima, TOS i  $O_2^{\cdot-}$  u pankreasu i MDA u testisima.
- Multikomponentni probiotik je anulirao štetan uticaj ispitivane smeše metala na smanjenje aktivnosti enzima acetilholinesteraze.
- Primena oba probiotika delimično je ublažila histopatološke promene u većini ispitanih organa, sa najizraženijim pozitivnim efektom u pankreasu.
- Imajući u vidu sve dobijene rezultate multikomponentni probiotik je efikasniji u umanjenju štetnih efekata izazvanih smešom Pb, Cd, Hg i As od monokomponentnog probiotika.

## 7. LITERATURA

1. Barbosa F. Toxicology of metals and metalloids: Promising issues for future studies in environmental health and toxicology. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues* [Internet]. 2017;80(3):137–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2016.1259475>
2. Ali H, Khan E, Ilahi I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *J Chem*. 2019;2019(Cd).
3. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity , mechanism and health effects of some heavy metals. 2014;7(2):60–72.
4. Rădulescu A, Lundgren S. A pharmacokinetic model of lead absorption and calcium competitive dynamics. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–27.
5. Liu D, Shi Q, Liu C, Sun Q, Zeng X. Effects of Endocrine-Disrupting Heavy Metals on Human Health. *Toxics*. 2023;11(4):1–8.
6. Djukić-Ćosić D, Ninković M, Maličević Ž, Plamenac-Bulat Z, Matović V. Effect of supplemental magnesium on the kidney levels of cadmium, zinc, and copper of mice exposed to toxic levels of cadmium. *Biol Trace Elem Res*. 2006;114(1–3):281–91.
7. Djukić-Ćosić D, Ninković M, Maličević Z, Matović V, Soldatović D. 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*. 2007;20(3):177–86.
8. Bulat ZP, Djukić-Ćosić D, Maličević Ž, Bulat P, Matović V. Zinc or magnesium supplementation modulates Cd intoxication in blood, kidney, spleen, and bone of rabbits. *Biol Trace Elem Res*. 2008;124(2):110–7.
9. Bulat Z, Đukić-Ćosić D, Antonijević B, Bulat P, Vujanovic D, Buha A, et al. The Effect of Magnesium Supplementation on the Distribution Patterns of Zinc , Copper , and Magnesium in Rabbits Exposed to Prolonged CadmiumIntoxication. *Sci World J*. 2012;2012.
10. Đukić-Ćosić D, Ćurčić-Jovanović, Marijana Plamenac-Bulat Z, Ninković M, Maličević Ž, Matović V. Relation between lipid peroxidation and iron concentration in mouse liver after acute and subacute cadmium intoxication. *Toxicology*. 2008;22:66–72.
11. Wallace DR, Taalab YM, Heinze S, Tariha Lovaković, Blanka Pizent A, Renieri E, Tsatsakis A, et al. Toxic-Metal-Induced Alteration in miRNA Expression Profile as a Proposed Mechanism for Disease Development. *Cells*. 2020;9(4):901.
12. Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip Toxicol*. 2012;5(2):47–58.
13. Sall ML, Diaw AKD, Gningue-Sall D, Efremova Aaron S, Aaron JJ. Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. *Environ Sci Pollut Res*. 2020;27(24):29927–42.
14. Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front Pharmacol*. 2021;12(April):1–19.
15. Ashkan MF. Lead: Natural Occurrence, Toxicity to Organisms and Bioremediation by Lead-degrading Bacteria: A Comprehensive Review. *J Pure Appl Microbiol*. 2023;17(3):1298–319.
16. Raj K, Das AP. Lead pollution: Impact on environment and human health and approach for a sustainable solution. *Environ Chem Ecotoxicol* [Internet]. 2023;5(February):79–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2023.02.001>
17. Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: A review. *Interdiscip Toxicol*. 2015;8(2):55–64.
18. Hu H, Shih R, Rothenberg S, Schwartz BS. The epidemiology of lead toxicity in adults: Measuring dose and consideration of other methodologic issues. *Environ Health Perspect*. 2007;115(3):455–62.
19. Scinicariello F, Murray HE, Moffett DB, Abadin HG, Sexton MJ, Fowler BA. Lead and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: Where does it lead? A meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 2007;115(1):35–41.
20. Ramírez Ortega D, González Esquivel DF, Blanco Ayala T, Pineda B, Gómez Manzo S, Marcial

- Quino J, et al. Cognitive impairment induced by lead exposure during lifespan: Mechanisms of lead neurotoxicity. *Toxics*. 2021;9(2):1–30.
21. Bellinger DC. Very low lead exposures and children's neurodevelopment. *Curr Opin Pediatr*. 2008;20(2):172–7.
  22. Reuben A. Childhood Lead Exposure and Adult Neurodegenerative Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2018;64(1):17–42.
  23. Cicero CE, Mostile G, Vasta R, Rapisarda V, Santo S, Ferrante M, et al. Metals and neurodegenerative diseases . A systematic review. *Environ Res [Internet]*. 2017;159(July):82–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.048>
  24. Loghman-Adham M. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Indian J Occup Environ Med*. 2008;12(3):103–6.
  25. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead exposure and cardiovascular disease - A systematic review. *Environ Health Perspect*. 2007;115(3):472–82.
  26. La Llave León O, M. Salas Pacheco J. Effects of Lead on Reproductive Health. *Lead Chem*. 2020;1–19.
  27. Kumar S. Occupational and Environmental Exposure to Lead and Reproductive Health Impairment: An Overview. *Indian J Occup Int Med*. 2019;23(1):8–13.
  28. Genchi G, S S, Graziantono L, Carocci A, Catalano A. The Effects of Cadmium Toxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(Cd):1–24.
  29. Kumar S, Sharma A. Cadmium toxicity: Effects on human reproduction and fertility. *Rev Environ Health*. 2019;
  30. Kubier A, Wilkin RT, Pichler T. Cadmium in soils and groundwater: A review. *Appl Geochemistry*. 2019;108(July).
  31. Khan MA, Khan S, Khan A, Alam M. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Sci Total Environ [Internet]*. 2017;601–602:1591–605. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.030>
  32. Peera Sheikh Kulsum PG, Khanam R, Das S, Nayak AK, Tack FMG, Meers E, et al. A state-of-the-art review on cadmium uptake, toxicity, and tolerance in rice: From physiological response to remediation process. *Environ Res [Internet]*. 2023;220(October 2022):115098. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115098>
  33. Rahimzadeh MR, Rahimzadeh MR, Kazemi S, Moghadamnia AA. Cadmium toxicity and treatment: An update. *Casp J Intern Med*. 2017;8(3):135–45.
  34. Munisamy R, Ismail SNS, Praveena SM. Cadmium exposure via food crops: A case study of intensive farming area. *Am J Appl Sci*. 2013;10(10):1252–62.
  35. Schaefer HR, Dennis S, Fitzpatrick S. Cadmium: Mitigation strategies to reduce dietary exposure. *J Food Sci*. 2020;85(2):260–7.
  36. Charkiewicz AE, Omeljaniuk WJ, Nowak K, Garley M, Nikliński J. Cadmium Toxicity and Health Effects—A Brief Summary. *Molecules*. 2023;28(18):1–16.
  37. Li FJ, Suroliya R, Singh P, Dsouza KG, Stephens CT, Wang Z, et al. Fibrinogen mediates cadmium-induced macrophage activation and serves as a predictor of cadmium exposure in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2022;322(4):L593–606.
  38. Gallagher CM, Meliker JR. Blood and urine cadmium, blood pressure, and hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 2010;118(12):1676–84.
  39. Peana M, Pelucelli A, Chasapis CT, Perlepes SP, Bekiari V, Medici S, et al. Biological Effects of Human Exposure to Environmental Cadmium. *Biomolecules*. 2023;13(1):1–19.
  40. Edwards JR, Prozialeck WC. Cadmium, Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;313(16):3635–44.
  41. Pizent A, Tariba B, Živković T. Reproductive toxicity of metals in men. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2012;63(SUPPL.1):35–46.
  42. Branca JJV, Morucci G, Pacini A. Cadmium-induced neurotoxicity: Still much ado. *Neural Regen Res*. 2018;13(11):1879–82.
  43. Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: A review. *Int J*

- Environ Health Res. 2014;24(4):378–99.
44. Patrick L. Toxic metals and antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. *Altern Med Rev*. 2003;8(2):106–28.
  45. Filipič M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2012;733(1–2):69–77.
  46. Li R, Wu H, Ding J, Fu W, Gan L, Li Y. Mercury pollution in vegetables, grains and soils from areas surrounding coal-fired power plants. *Sci Rep*. 2017;7(May):1–9.
  47. Boylan HM, Cain RD, Kingston HM “Skip.” A New Method to Assess Mercury Emissions: A Study of Three Coal-Fired Electric-Generating Power Station Configurations. *J Air Waste Manag Assoc*. 2003;53(11):1318–25.
  48. Zhao M, Li Y, Wang Z. Mercury and Mercury-Containing Preparations: History of Use, Clinical Applications, Pharmacology, Toxicology, and Pharmacokinetics in Traditional Chinese Medicine. *Front Pharmacol*. 2022;13(March):1–23.
  49. Bernhoft RA. Mercury toxicity and treatment: A review of the literature. *J Environ Public Health*. 2012;2012.
  50. Yang L, Zhang Y, Wang F, Luo Z, Guo S, Strähle U. Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*. 2020;245.
  51. Ajsuvakova OP, Tinkov AA, Aschner M, Michalke B, Skalnaya MG, Skalny A V, et al. Sulfhydryl groups as targets of mercury toxicity. *Coord Chem Rev*. 2020;417:1–38.
  52. Bridges CC, Zalups RK. Mechanisms involved in the transport of mercuric ions in target tissues. *Arch Toxicol*. 2018;91(1):63–81.
  53. Wu YS, Osman AI, Hosny M, Elgarahy AM, Eltaweil AS, Rooney DW, et al. The Toxicity of Mercury and Its Chemical Compounds: Molecular Mechanisms and Environmental and Human Health Implications: A Comprehensive Review. *ACS Omega*. 2024;9(5):5100–26.
  54. Gao Z, Wu N, Du X, Li H, Mei X, Song Y. Toxic Nephropathy Secondary to Chronic Mercury Poisoning: Clinical Characteristics and Outcomes. *Kidney Int Reports*. 2022;7(6):1189–97.
  55. Park JD, Zheng W. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. *J Prev Med Public Heal*. 2012;45(6):344–52.
  56. Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol*. 2006;36(8):609–62.
  57. Sutton DJ, Tchounwou PB, Ninashvili N, Shen E. Mercury induces cytotoxicity and transcriptionally activates stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Mol Sci*. 2002;3(9):965–84.
  58. Fujimura M, Usuki F. Methylmercury-mediated oxidative stress and activation of the cellular protective system. *Antioxidants*. 2020;9(10):1–20.
  59. Sánchez-Alarcón J, Milić M, Bustamante-Montes LP, Isaac-Olivé K, Valencia-Quintana R, Ramírez-Durán N. Genotoxicity of mercury and its derivatives demonstrated in vitro and in vivo in human populations studies. Systematic review. *Toxics*. 2021;9(12):1–22.
  60. Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ. Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicol Sci*. 2011;123(2):305–32.
  61. Antman KH. Introduction: The History of Arsenic Trioxide in Cancer Therapy. *Oncologist*. 2001;6(S2):1–2.
  62. Scheindlin S. The duplicitous nature of inorganic arsenic. *Mol Interv*. 2005;5(2):60–4.
  63. Francesconi KA. Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pure Appl Chem*. 2010;82(2):373–81.
  64. Khan NI, Owens G, Bruce D, Naidu R. Human arsenic exposure and risk assessment at the landscape level: A review. *Environ Geochem Health*. 2009;31(SUPPL. 1):143–66.
  65. Kenyon EM. Arsenic toxicokinetic modeling and risk analysis: Progress, needs and applications. *Toxicology*. 2021;457(919).
  66. Khairul I, Wang QQ, Jiang YH, Wang C, Naranmandura H. Metabolism, toxicity and anticancer activities of arsenic compounds. *Oncotarget*. 2017;8(14):23905–26.
  67. Kapaj S, Peterson H, Liber K, Bhattacharya P. Human health effects from chronic arsenic poisoning -

- A review. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng.* 2006;41(10):2399–428.
68. Shen S, Li XF, Cullen WR, Weinfeld M, Le XC. Arsenic binding to proteins. *Chem Rev.* 2013;113(10):7769–92.
  69. Buha A, Matović V. Basic principles of toxicological evaluation of mixtures. *Arch Pharm.* 2015;304–15.
  70. Claus Henn B, Coull BA, Wright RO. Chemical Mixtures and Children’s Health. *Curr Opin Pediatr.* 2014;26(2):223–9.
  71. Lin X, Gu Y, Zhou Q, Mao G, Zou B, Zhao J. Combined toxicity of heavy metal mixtures in liver cells. *J Appl Toxicol.* 2016;36(9):1163–72.
  72. von Stackelberg K, Guzy E, Chu T, Claus Henn B. Exposure to Mixtures of Metals and Neurodevelopmental Outcomes: A Review. *Risk Anal.* 2015;35(6):971–1016.
  73. Muthusamy S, Peng C, Ng JC. Effects of binary mixtures of benzo[a]pyrene, arsenic, cadmium, and lead on oxidative stress and toxicity in HepG2 cells. *Chemosphere [Internet].* 2016;165:41–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.137>
  74. Mejía JJ, Díaz-Barriga F, Calderón J, Ríos C, Jiménez-Capdeville ME. Effects of Lead–Arsenic Combined Exposure on Central Monoaminergic Systems. *Neurotoxicol Teratol.* 1997;19(6):489–97.
  75. Sannadi S, Kadeyala PK, Gottipolu RR. Reversal effect of monoisoamyl dimercaptosuccinic acid (MiADMSA) for arsenic and lead induced perturbations in apoptosis and antioxidant enzymes in developing rat brain. *Int J Dev Neurosci [Internet].* 2013;31(7):586–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.07.003>
  76. Hagopian-Schlekat T, Chandler GT, Shaw TJ. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar Environ Res.* 2001;51(3):247–64.
  77. Lynch NR, Hoang TC, O’Brien TE. Acute toxicity of binary-metal mixtures of copper, zinc, and nickel to *Pimephales promelas*: Evidence of more-than-additive effect. *Environ Toxicol Chem.* 2016;35(2):446–57.
  78. Montvydiene D, Marčiulioniene D. Assessment of toxic interactions of heavy metals in a multicomponent mixture using *Lepidium sativum* and *Spirodela polyrrhiza*. *Environ Toxicol.* 2004;19(4):351–8.
  79. Orr SE, Barnes MC, George HS, Joshee L, Jeon B, Scirelle A, et al. Exposure to mixtures of mercury, cadmium, lead, and arsenic alters the disposition of single metals in tissues of Wistar rats. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues [Internet].* 2018;81(24):1246–56. Available from: <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1551164>
  80. Matović V, Buha A, Đukić-Ćosić D, Bulat Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem Toxicol.* 2014;78:13–40.
  81. Chin-Chan M, Navarro-yepes J, Quintanilla-vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders : Alzheimer and Parkinson diseases. 2015;9(April):1–22.
  82. Andrade VM, Aschner M, Santos APM. Neurotoxicity of Metal Mixtures. Springer, Cham; 2017. 227–265 p.
  83. Zeng X, Xu X, Boezen HM, Vonk JM, Wu W, Huo X. Decreased lung function with mediation of blood parameters linked to e-waste lead and cadmium exposure in preschool children \*. *Environ Pollut [Internet].* 2017;230:838–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.014>
  84. Buha A, Matovic V, Antonijevic B, Bulat Z, Curcic M, Renieri EA, et al. Overview of Cadmium Thyroid Disrupting Effects and Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5):1501.
  85. AAndjelkovic M, Djordjevic AB, Antonijevic E, Antonijevic B, Stanic M, Kotur-Stevuljevic J, et al. Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood , Liver , and Kidney. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(2):274.
  86. Djordjevic VR, Wallace DR, Schweitzer A, Boricic N, Knezevic D, Matic S, et al. Environmental cadmium exposure and pancreatic cancer : Evidence from case control , animal and in vitro studies. *Environ Int [Internet].* 2019;128(January):353–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.048>
  87. Wallace DR, Spandidos DA, Tsatsakis A, Schweitzer A, Djordjevic V, Djordjevic AB. Potential

- interaction of cadmium chloride with pancreatic mitochondria : Implications for pancreatic cancer. *Int J Mol Med*. 2019;44(1):145–56.
88. White AJ, Brien KMO, Niehoff NM, Carroll R, Sandler DP. Metallic Air Pollutants and Breast Cancer Risk in a Nationwide Cohort Study. *Epidemiology*. 2019;30(1):20.
  89. Đukić-Ćosić D, Baralić K, Javorac D, Djordjevic AB, Bulat Z. An overview of molecular mechanisms in cadmium toxicity. *Curr Opin Toxicol*. 2020;19(1):56–62.
  90. Nurchi VM, Djordjevic AB, Crisponi G, Alexander J, Bjørklund G, Aaseth J. Arsenic toxicity: Molecular targets and therapeutic agents. *Biomolecules*. 2020;10(2):235.
  91. Tsatsakis AM, Kouretas D, Tzatzarakis MN, Stivaktakis P, Tsarouhas K, Golokhvast KS, et al. Simulating real-life exposures to uncover possible risks to human health: A proposed consensus for a novel methodological approach. *Hum Exp Toxicol*. 2017;36(6):554–64.
  92. Hernandez AF, Buha A, Constantin C, Wallace DR, Sarigiannis D, Neagu M, et al. Critical assessment and integration of separate lines of evidence for risk assessment of chemical mixtures. *Arch Toxicol [Internet]*. 2019;93(10):2741–57. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02547-x>
  93. Fiati Kenston SS, Su H, Li Z, Kong L, Wang Y, Song X, et al. The systemic toxicity of heavy metal mixtures in rats. *Toxicol Res (Camb)*. 2018;7(3):396–407.
  94. Ezejiolor AN, Orish CN, Akaranta O. Multi-Organ induced toxicity of metal mixture (CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)), and the ameliorative potentials of plantain *Musa paradisiaca* (F. Musaceae) stem juice on male Wistar rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol [Internet]*. 2022;14(4):211–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36161263> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC9490206>
  95. Baralić K, Javorac D, Marić Đ, Đukić-Ćosić D, Bulat Z, Antonijević Miljaković E, et al. Benchmark dose approach in investigating the relationship between blood metal levels and reproductive hormones: Data set from human study. *Environ Int*. 2022;165(May).
  96. Baralić K, Marić Đ, Vukelić D, Antonijević Miljaković E, Anđelković M, Antonijević B, et al. Effects of the real-life metal(oid)s mixture on female reproductive function: Less is different. *Sci Total Environ*. 2023;895(June).
  97. Đukić-Ćosić D, Baralić K, Javorac D, Bulat Z, Ćurčić M, Antonijević B, et al. Exploring the relationship between blood toxic metal(oid)s and serum insulin levels through benchmark modelling of human data: Possible role of arsenic as a metabolic disruptor. *Environ Res*. 2022;215(July).
  98. Marić Đ, Baralić K, Javorac D, Mandić Rajčević S, Đukić-Ćosić D, Antonijević Miljaković E, et al. Puzzling relationship between levels of toxic metals in blood and serum levels of reproductive hormones: Benchmark dose approach in cross-sectional study. *All Life [Internet]*. 2022;15(1):1052–64. Available from: <https://doi.org/10.1080/26895293.2022.2128439>
  99. Marić Đ, Baralić K, Vukelić D, Milošević I, Nikolić A, Antonijević B, et al. Thyroid under siege: Unravelling the toxic impact of real-life metal mixture exposures in Wistar rats. *Chemosphere*. 2024;360(May).
  100. Javorac D, Baralić K, Marić Đ, Mandić-Rajčević S, Đukić-Ćosić D, Bulat Z, et al. Exploring the endocrine disrupting potential of lead through benchmark modelling – Study in humans. *Environ Pollut*. 2023;316(June 2022).
  101. Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger MJ, Knutsen KH, More S, et al. Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA J*. 2017;15(1):1–41.
  102. Byford T. Principles for modelling dose-response for the risk assessment of chemicals. *Environ Heal Criteria*. 2009;(239):1–137.
  103. Baralić K, Javorac D, Antonijević E, Buha-Djordjević A, Ćurčić M, Đukić-Ćosić D, et al. Relevance and evaluation of the benchmark dose in toxicology. *Arh Farm (Belgr)*. 2020;70(3):130–41.
  104. Brooks BW, Sabo-Attwood T, Choi K, Kim S, Kostal J, LaLone CA, et al. Toxicology Advances for 21st Century Chemical Pollution. *Cell Press*. 2020;(January):19–21.
  105. Karri V, Schuhmacher M, Kumar V. Heavy metals ( Pb , Cd , MeHg , As ) as risk factors for cognitive dysfunction : A general review of metal mixture mechanism in brain. *Environ Toxicol Pharmacol [Internet]*. 2016;48:203–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.016>

106. Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Hornung MW, Johnson RD, et al. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem.* 2010;29(3):730–41.
107. Boverhof DR, Zacharewski TR. Toxicogenomics in risk assessment: Applications and needs. *Toxicol Sci.* 2006;89(2):352–60.
108. Tung C, Cheng H, Wang C, Wang S, Lin P. Leveraging complementary computational models for prioritizing chemicals of developmental and reproductive toxicity concern: an example of food contact materials. *Arch Toxicol.* 2020;94(2):485–94.
109. Breda SGJ Van, Claessen SMH, Lo K, Herwijnen M Van, Gaj S, Kok TMCM De, et al. Epigenetic mechanisms underlying arsenic - associated lung carcinogenesis. *Arch Toxicol.* 2014;89(1):1959–69.
110. Liu Z, Huang R, Roberts R, Tong W. Toxicogenomics: A 2020 Vision. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2020;40(2):92–103. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.12.001>
111. Monachese M, Burton JP, Reid G. Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: A potential role for probiotics? *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(18):6397–404.
112. Mumtaz S, Ali S, Khan R, Shakir HA, Tahir HM, Mumtaz S, et al. Therapeutic role of garlic and vitamins C and E against toxicity induced by lead on various organs. *Environ Sci Pollut Res.* 2020;27(9):8953–64.
113. Zwolak I. Protective Effects of Dietary Antioxidants against Vanadium-Induced Toxicity: A Review. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020.
114. Bhattacharya S. The role of medicinal plants and natural products in melioration of cadmium toxicity. *Orient Pharm Exp Med* [Internet]. 2018;18(3):177–86. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13596-018-0323-0>
115. Barreto FM, Colado Simão AN, Morimoto HK, Batisti Lozovoy MA, Dichi I, Helena da Silva Miglioranza L. Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Nutrition.* 2014;30(7–8):939–42.
116. Średnicka P, Juszczuk-Kubiak E, Wójcicki M, Akimowicz M, Roszko M. Probiotics as a biological detoxification tool of food chemical contamination: A review. *Food Chem Toxicol.* 2021;153.
117. Chiochetti GM, Jadán-Piedra C, Monedero V, Zúñiga M, Vélez D, Devesa V. Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(10):1534–45.
118. Muhialdin BJ, Saari N, Hussin ASM. Review on the biological detoxification of mycotoxins using lactic acid bacteria to enhance the sustainability of foods supply. *Molecules.* 2020;25(11).
119. El Khoury A, Atoui A, Yaghi J. Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control* [Internet]. 2011;22(10):1695–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.001>
120. Wang YS, Wu TH, Yang Y, Zhu CL, Ding CL, Dai CC. Binding and detoxification of chlorpyrifos by lactic acid bacteria on rice straw silage fermentation. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes.* 2016;51(5):316–25.
121. Daisley BA, Monachese M, Trinder M, Bisanz JE, Chmiel JA, Burton JP, et al. Immobilization of cadmium and lead by *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mitigates apical-to-basolateral heavy metal translocation in a Caco-2 model of the intestinal epithelium. *Gut Microbes* [Internet]. 2019;10(3):321–33. Available from: <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1526581>
122. Bisanz JE, Enos MK, Mwanga JR, Chagalucha J, Burton JP, Gloor GB, et al. Randomized Open-Label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in Tanzanian pregnant women and school children. *MBio.* 2014;5(5):1–7.
123. Kim B, Shynlova O, Lye S. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 is a unique prophylactic agent that suppresses infection-induced myometrial cell responses. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-41133-0>
124. Kirillova A V., Danilushkina AA, Irisov DS, Bruslik NL, Fakhruullin RF, Zakharov YA, et al. Assessment of Resistance and Bioremediation Ability of *Lactobacillus* Strains to Lead and Cadmium. *Int J Microbiol.* 2017;2017.
125. Zhai Q, Xiao Y, Tian F, Wang G, Zhao J, Liu X, et al. Protective effects of lactic acid bacteria-fermented soymilk against chronic cadmium toxicity in mice. *RSC Adv.* 2015;5(6):4648–58.

126. Zhai Q, Liu Y, Wang C, Qu D, Zhao J, Zhang H, et al. *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 modulates bile acid enterohepatic circulation and increases lead excretion in mice. *Food Funct.* 2019;10(3):1455–64.
127. Majlesi M, Shekarforoush SS, Ghaisari HR, Nazifi S, Sajedianfard J, Eskandari MH. Effect of Probiotic *Bacillus Coagulans* and *Lactobacillus Plantarum* on Alleviation of Mercury Toxicity in Rat. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2017;9(3):300–9.
128. Jadán-Piedra C, Baquedano M, Puig S, Vélez D, Devesa V. Use of *Saccharomyces cerevisiae* to Reduce the Bioaccessibility of Mercury from Food. *J Agric Food Chem.* 2017;65(13):2876–82.
129. Karazhiyan H, Mehraban Sangatash M, Karazhyan R, Mehrzad A, Haghighi E. Ability of different treatments of *Saccharomyces cerevisiae* to surface bind aflatoxin M1 in Yoghurt. *J Agric Sci Technol.* 2016;18(6):1489–98.
130. Barathi MD, Chandrasekar S, Ramya V. A preliminary study on stability and viability of encapsulated probiotic ability to bind mycotoxin. *Int J Curr Res Chem Pharm Sci.* 2014;1(6):113–22.
131. Da Silva JFM, Peluzio JM, Prado G, Madeira JEGC, Silva MO, De Moraes PB, et al. Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains. *Sci World J.* 2015;2015.
132. Halttunen T, Salminen S, Tahvonon R. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2007;114(1):30–5.
133. Bagherzadeh Kasmani F, Mehri M. Effects of a multi-strain probiotics against aflatoxicosis in growing Japanese quails. *Livest Sci* [Internet]. 2015;177:110–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.04.018>
134. Kim JA, Lee SH, Choi SH, Jung KK, Park MS, Jeong JY, et al. Heavy metal risk management: Case analysis. *Toxicol Res.* 2012;28(3):143–9.
135. Ademuyiwa O, Agarwal R, Chandra R, Raj Behari J. Effects of sub-chronic low-level lead exposure on the homeostasis of copper and zinc in rat tissues. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. 2010;24(3):207–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.01.002>
136. Chen LH, Chen YH, Cheng KC, Chien TY, Chan CH, Tsao SP, et al. Antiobesity effect of *Lactobacillus reuteri* 263 associated with energy metabolism remodeling of white adipose tissue in high-energy-diet-fed rats. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2018;54:87–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.11.004>
137. Javorac D, Anđelković M, Repić A, Tatović S, Djordjević AB, Miljković EA, et al. Comprehensive insight into the neurotoxic mechanisms of low dose Pb exposure in Wistar rats: Benchmark dose analysis. *Chem Biol Interact.* 2022;360(March).
138. Denninger JK, Smith BM, Kirby ED. Testing in Mice on a Budget. *J Vis ized Exp.* 2019;20(141):1–20.
139. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7(2):88–95.
140. Davis AP, Murphy CG, Rosenstein MC, Wieggers TC, Mattingly CJ. The Comparative Toxicogenomics Database facilitates identification and understanding of chemical-gene-disease associations : arsenic as a case study. *BMC Med Genomics.* 2008;1(1):48.
141. Davis AP, Grondin CJ, Johnson RJ, Sciaky D, McMorran R, Wieggers J, et al. The Comparative Toxicogenomics Database : update 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D948–D954.
142. Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc.* 2013;2(10):2366–82.
143. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. The GeneMANIA prediction server : biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(2):214–20.
144. Chin CH, Chen SH, Wu HH, Ho CW, Ko MT, Lin CY. cytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol.* 2014;8(4):1–7.
145. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(May):305–11.
146. Licursi V, Conte F, Fiscon G, Paci P. MIENTURNET: An interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based analysis. *BMC Bioinformatics.* 2019;20(1):1–10.

147. Keenan AB, Torre D, Lachmann A, Leong AK, Wojciechowicz ML, Utti V, et al. ChEA3: transcription factor enrichment analysis by orthogonal omics integration. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W212–24.
148. George F, Mahieux S, Daniel C, Titécat M, Beauval N, Houcke I, et al. Assessment of Pb(II), Cd(II), and Al(III) removal capacity of bacteria from food and gut ecological niches: Insights into biodiversity to limit intestinal bioavailability of toxic metals. *Microorganisms.* 2021;9(2):1–16.
149. Cavaleri F. Review of Amyotrophic Lateral Sclerosis, Parkinson's and Alzheimer's diseases helps further define pathology of the novel paradigm for Alzheimer's with heavy metals as primary disease cause. *Med Hypotheses* [Internet]. 2015;85(6):779–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2015.10.009>
150. Ni W, Huang Y, Wang X, Zhang J, Wu K. Associations of neonatal lead, cadmium, chromium and nickel co-exposure with DNA oxidative damage in an electronic waste recycling town. *Sci Total Environ* [Internet]. 2014;472:354–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.032>
151. Chen Y, Xu X, Zeng Z, Lin X, Qin Q, Huo X. Blood lead and cadmium levels associated with hematological and hepatic functions in patients from an e-waste-polluted area. *Chemosphere* [Internet]. 2019;220:531–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.129>
152. Xu J, Zhao M, Pei L, Liu X, Wei L, Li A, et al. Effects of heavy metal mixture exposure on hematological and biomedical parameters mediated by oxidative stress. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;705:134865. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134865>
153. Oladipo OO, Ayo JO, Ambali SF, Mohammed B, Aluwong T. Dyslipidemia induced by chronic low dose co-exposure to lead, cadmium and manganese in rats: the role of oxidative stress. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2017;53(June):199–205. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.017>
154. Javorac D, Antonijević B, Anđelković M, Repić A, Bulat P, Djordjević AB, et al. Oxidative stress, metallomics and blood toxicity after subacute low-level lead exposure in Wistar rats: Benchmark dose analyses. *Environ Pollut.* 2021;291(September).
155. Garçon G, Leleu B, Zerimech F, Marez T, Haguenoer JM, Furon D, et al. Biologic markers of oxidative stress and nephrotoxicity as studied in biomonitoring of adverse effects of occupational exposure to lead and cadmium. *J Occup Environ Med.* 2004;46(11):1180–6.
156. Conterato GMM, Bulcão RP, Sobieski R, Moro AM, Charão MF, de Freitas FA, et al. Blood thioredoxin reductase activity, oxidative stress and hematological parameters in painters and battery workers: Relationship with lead and cadmium levels in blood. *J Appl Toxicol.* 2013;33(2):142–50.
157. Pizent A, Anđelković M, Tariba Lovaković B, Živković Semren T, Buha Djordjević A, Gamulin M, et al. Environmental Exposure to Metals, Parameters of Oxidative Stress in Blood and Prostate Cancer: Results from Two Cohorts. *Antioxidants.* 2022;11(10).
158. Massó EL, Corredor L, Antonio MT. Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/or cadmium. *J Trace Elem Med Biol.* 2007;21(3):210–6.
159. Andjelkovic M, Djordjevic AB, Antonijevic E, Antonijevic B, Stanic M, Kotur-Stevuljjevic J, et al. Toxic effect of acute cadmium and lead exposure in rat blood, liver, and kidney. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(2):274.
160. Kahn LG, Philippat C, Nakayama SF, Slama R, Trasande L. Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2020;8(8):703–18. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30129-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30129-7)
161. Ge X, He J, Lin S, Bao Y, Zheng Y, Cheng H, et al. Associations of metal mixtures with thyroid function and potential interactions with iodine status: results from a cross-sectional study in MEWHC. *Environ Sci Pollut Res.* 2023;30(48):105665–74.
162. Li A, Zhou Q, Mei Y, Zhao J, Zhao M, Xu J, et al. Thyroid disrupting effects of multiple metals exposure: Comprehensive investigation from the thyroid parenchyma to hormonal function in a prospective cohort study. *J Hazard Mater* [Internet]. 2023;459(July):132115. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132115>
163. Kim K, Argos M, Persky VW, Freels S, Sargis RM, Turyk ME. Associations of exposure to metal and metal mixtures with thyroid hormones: Results from the NHANES 2007–2012. *Environ Res*

- [Internet]. 2022;212(PC):113413. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113413>
164. Anyanwu BO, Ezejiofor AN, Nwaogazie IL, Akaranta O, Orisakwe OE. Low-dose heavy metal mixture (lead, cadmium and mercury)-induced testicular injury and protective effect of zinc and *Costus afer* in wistar albino rats. *Andrologia*. 2020;52(9):1–16.
  165. Ozoani H, Ezejiofor AN, Okolo KO, Orish CN, Cirovic A, Cirovic A, et al. Zinc and selenium attenuate quaternary heavy metal mixture-induced testicular damage via amplification of the antioxidant system, reduction in metal accumulation, inflammatory and apoptotic biomarkers. *Toxicol Res* [Internet]. 2023;39(3):497–515. Available from: <https://doi.org/10.1007/s43188-023-00187-z>
  166. Li X, Yu X, Luo K, Liu H, Fan X, Yin X, et al. Exposure to metals and the disruption of sex hormones in 6–19 years old children: An exploration of mixture effects. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2023;250(May 2022):114477. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114477>
  167. Tao C, Li Z, Fan Y, Li X, Qian H, Yu H, et al. Independent and combined associations of urinary heavy metals exposure and serum sex hormones among adults in NHANES 2013–2016. *Environ Pollut* [Internet]. 2021;281:117097. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117097>
  168. van den Dungen MW, Rijk JCW, Kampman E, Steegenga WT, Murk AJ. Steroid hormone related effects of marine persistent organic pollutants in human H295R adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Vitro*. 2015;29(4):769–78.
  169. Hakkarainen J, Zhang FP, Jokela H, Mayerhofer A, Behr R, Cisneros-Montalvo S, et al. Hydroxysteroid (17 $\beta$ ) dehydrogenase 1 expressed by Sertoli cells contributes to steroid synthesis and is required for male fertility. *FASEB J*. 2018;32(6):3229–41.
  170. Pötzl B, Kürzinger L, Stopper H, Fassnacht M, Kurlbaum M, Dischinger U. Endocrine Disruptors: Focus on the Adrenal Cortex. *Horm Metab Res*. 2023;56(1):78–90.
  171. David M, Jahan S, Hussain J, Rehman H, Cloete KJ, Afsar T, et al. Biochemical and reproductive biomarker analysis to study the consequences of heavy metal burden on health profile of male brick kiln workers. *Sci Rep* [Internet]. 2022;12(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11304-7>
  172. Zhang H, Yan J, Nie G, Xie D, Zhu X, Niu J, et al. Association and mediation analyses among multiple metal exposure, mineralocorticoid levels, and serum ion balance in residents of northwest China. *Sci Rep* [Internet]. 2024;14(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58607-5>
  173. da Cunha Martins A, Carneiro MFH, Grotto D, Adeyemi JA, Barbosa F. Arsenic, cadmium, and mercury-induced hypertension: mechanisms and epidemiological findings. *J Toxicol Environ Heal - Part B Crit Rev* [Internet]. 2018;21(2):61–82. Available from: <https://doi.org/10.1080/10937404.2018.1432025>
  174. Qu Y, Lv Y, Ji S, Ding L, Zhao F, Zhu Y, et al. Effect of exposures to mixtures of lead and various metals on hypertension, pre-hypertension, and blood pressure: A cross-sectional study from the China National Human Biomonitoring. *Environ Pollut* [Internet]. 2022;299(January):118864. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118864>
  175. Kalantzi I, Pergantis SA, Black KD, Shimmield TM, Papageorgiou N, Tsapakis M, et al. Metals in tissues of seabass and seabream reared in sites with oxic and anoxic substrata and risk assessment for consumers. *Food Chem* [Internet]. 2016;194:659–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.072>
  176. Tang S, Luo S, Wu Z, Su J. Association between blood heavy metal exposure levels and risk of metabolic dysfunction associated fatty liver disease in adults: 2015–2020 NHANES large cross-sectional study. *Front Public Heal*. 2024;12(February):1–8.
  177. Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E, Kamath PS. Global burden of liver disease: 2023 update. *J Hepatol* [Internet]. 2023;79(2):516–37. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.017>
  178. Green RM, Flamm S. AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology*. 2002;123(4):1367–84.
  179. Garcia-Martinez R, Caraceni P, Bernardi M, Gines P, Arroyo V, Jalan R. Albumin: Pathophysiologic

- basis of its role in the treatment of cirrhosis and its complications. *Hepatology*. 2013;58(5):1836–46.
180. Leem AY, Kim HY, Kim YS, Park MS, Chang J, Jung JY. Association of serum bilirubin level with lung function decline: A Korean community-based cohort study. *Respir Res*. 2018;19(1):1–8.
  181. Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res*. 2016;23(9):8244–59.
  182. Li W, Li X, Su J, Chen H, Zhao P, Qian H, et al. Associations of blood metals with liver function: Analysis of NHANES from 2011 to 2018. *Chemosphere [Internet]*. 2023;317(January):137854. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137854>
  183. Han X, Lv Z, He M, Cheng J, Zhang Y, Wang T, et al. Effects of multiple metals exposure on abnormal liver function: The mediating role of low-density lipoprotein cholesterol. *Ecotoxicol Environ Saf [Internet]*. 2024;276(April):116283. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116283>
  184. Kim D, Ock J, Moon K. Association between Pb , Cd , and Hg Exposure and Liver Injury among Korean Adults. 2021;
  185. Yu Y, Li Z, Zhou Y, Dong C, Kuang H, Zheng T. Science of the Total Environment Associations between trace level thallium and multiple health effects in rural areas: Chinese Exposure and Response Mapping Program ( CERMP ). *Sci Total Environ [Internet]*. 2023;862(October 2022):160466. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160466>
  186. Guerra Ruiz AR, Crespo J, López Martínez RM, Iruzubieta P, Casals Mercadal G, Lalana Garcés M, et al. Measurement and clinical usefulness of bilirubin in liver disease. *Adv Lab Med*. 2021;2(3):352–61.
  187. Zhu H, Jia Y, Cao H, Meng F, Liu X. Biochemical and histopathological effects of subchronic oral exposure of rats to a mixture of five toxic elements. *Food Chem Toxicol [Internet]*. 2014;71:166–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.005>
  188. Jadhav SH, Sarkar SN, Patil RD, Tripathi HC. Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: A biochemical and histopathological study in male rats. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2007;53(4):667–77.
  189. Cobbina SJ, Chen Y, Zhou Z, Wu X, Zhao T, Zhang Z, et al. Toxicity assessment due to sub-chronic exposure to individual and mixtures of four toxic heavy metals. *J Hazard Mater [Internet]*. 2015;294:109–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.03.057>
  190. Matović V, Ćosić ĐĐ, Buha A, Bulat Z. Route , Dose and Duration of Exposure to Cadmium-Relevance to Oxidative Stress Induction Cadmium-Ubiquitous Toxic Metal of Nowadays. In: *Peroxidases*. Lucas Boga. 2013. p. 159–75.
  191. Markiewicz-Górka I, Januszewska L, Michalak A, Prokopowicz A, Januszewska E, Pawlas N, et al. Effects of chronic exposure to lead, cadmium, and manganese mixtures on oxidative stress in rat liver and heart. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2015;66(1):51–62.
  192. Buckner CA, Lafrenie RM, Dénommée JA, Caswell JM, Want DA, Gan GG, et al. We are IntechOpen , the world ’ s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 % . *Intech [Internet]*. 2016;11(tourism):13. Available from: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
  193. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(3):337–49.
  194. Paksi Z, Jancsó A, Pacello F, Nagy N, Battistoni A, Gajda T. Copper and zinc binding properties of the N-terminal histidine-rich sequence of Haemophilus ducreyi Cu,Zn superoxide dismutase. *J Inorg Biochem*. 2008;102(9):1700–10.
  195. Docea AO, Gofita E, Goumenou M, Calina D, Rogoveanu O, Varut M, et al. Six months exposure to a real life mixture of 13 chemicals’ below individual NOAELs induced non monotonic sex-dependent biochemical and redox status changes in rats. *Food Chem Toxicol*. 2018;115(April):470–81.
  196. Ezedom T, Asagba S, Tonukari NJ. Toxicological effects of the concurrent administration of cadmium and arsenic through the food chain on the liver and kidney of rats. *J Basic Appl Zool*.

2020;81(1).

197. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018;75(18):3313–27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>
198. Buhari O, Dayyab FM, Igbinoba O, Atanda A, Medhane F, Faillace RT. The association between heavy metal and serum cholesterol levels in the US population: National Health and Nutrition Examination Survey 2009–2012. *Hum Exp Toxicol*. 2020;39(3):355–64.
199. Ledda C, Iavicoli I, Bracci M, Avola R, Senia P, Santarelli L, et al. Serum lipid, lipoprotein and apolipoprotein profiles in workers exposed to low arsenic levels: Lipid profiles and occupational arsenic exposure. *Toxicol Lett* [Internet]. 2018;282:49–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.10.014>
200. Ranasinghe P, Wathurapatha WS, Ishara MH, Jayawardana R, Galappathy P, Katulanda P, et al. Effects of Zinc supplementation on serum lipids: A systematic review and meta-analysis. *Nutr Metab* [Internet]. 2015;12(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12986-015-0023-4>
201. Lentini P, Zanolli L, Granata A, Signorelli SS, Castellino P, Dell'Aquila R. Kidney and heavy metals - The role of environmental exposure (Review). *Mol Med Rep*. 2017;15(5):3413–9.
202. Madden EF, Fowler BA. Mechanisms of nephrotoxicity from metal combinations: A review. *Drug Chem Toxicol*. 2000;23(1):1–12.
203. Jain RB. Co-exposures to toxic metals cadmium, lead, and mercury and their impact on unhealthy kidney function. *Environ Sci Pollut Res*. 2019;26(29):30112–8.
204. Sun Y, Zhou Q, Zheng J. Nephrotoxic metals of cadmium, lead, mercury and arsenic and the odds of kidney stones in adults: An exposure-response analysis of NHANES 2007–2016. *Environ Int* [Internet]. 2019;132(June):105115. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105115>
205. Jin R, Zhu X, Shrubsole MJ, Yu C, Xia Z, Dai Q. Associations of renal function with urinary excretion of metals: Evidence from NHANES 2003–2012. *Environ Int* [Internet]. 2018;121(October):1355–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.002>
206. Fowler BA. Mechanisms of kidney cell injury from metals. *Environ Health Perspect*. 1993;100:57–63.
207. Hochadel JF, Waalkes MP. Sequence of exposure to cadmium and arsenic determines the extent of toxic effects in male Fischer rats. *Toxicology*. 1997;116(1–3):89–98.
208. Nordberg GF, Gerhardsson L, Mumtaz MM, Ruiz P, Fowler BA. Interactions and Mixtures in Metal Toxicology [Internet]. Fourth Edi. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier; 2014. 213–238 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00011-1>
209. Fowler BA, Mahaffey KR. Interactions among lead, cadmium, and arsenic in relation to porphyrin excretion patterns. *Environ Health Perspect*. 1978;VOL. 25(August):87–90.
210. Vukelić D, Baralić K, Marić Đ, Đukic-Čosić D, Bulat Z, Panieri E, et al. Hepato-renal toxicity of low dose metal(oid)s mixture in real-life risk simulation in rats: Effects on Nrf2/HO-1 signalling and redox status. *Sci Total Environ*. 2024;908(November 2023).
211. Su H, Li Z, Kenston SSF, Shi H, Wang Y, Song X, et al. Joint toxicity of different heavy metal mixtures after a short-term oral repeated-administration in rats. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(10).
212. Sugawara N. Effect of dietary cadmium on serum and liver lipids in mice in relation to interaction of essential metals, zinc, copper and iron. *J Toxicol Sci*. 1984;9(29–36).
213. Martin O, Scholze M, Ermler S, McPhie J, Bopp SK, Kienzler A, et al. Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures: A systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. *Environ Int* [Internet]. 2021;146(June 2020):106206. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106206>
214. Jia Q, Zhang Y, Liu S, Li Z, Zhou F, Shao L, et al. Analysis of search strategies for evaluating low-dose heavy metal mixture induced cognitive deficits in rats: An early sensitive toxicological approach. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2020;202(January):110900. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110900>
215. Ouyang L, Li Q, Rao S, Su R, Zhu Y, Du G, et al. Cognitive outcomes caused by low-level lead, cadmium, and mercury mixture exposure at distinct phases of brain development. *Food Chem*

- Toxicol. 2023;175(January).
216. Pyatha S, Kim H, Lee D, Kim K. Co-exposure to lead, mercury, and cadmium induces neurobehavioral impairments in mice by interfering with dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the striatum. *Front Public Heal*. 2023;11(November):1–12.
  217. Zhou F, Ouyang L, Xie J, Liu S, Li Q, Yang S, et al. Co-exposure to low-dose lead, cadmium, and mercury promotes memory deficits in rats: Insights from the dynamics of dendritic spine pruning in brain development. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2023;264(September).
  218. Zhou F, Yin G, Gao Y, Liu D, Xie J, Ouyang L, et al. Toxicity assessment due to prenatal and lactational exposure to lead, cadmium and mercury mixtures. *Environ Int* [Internet]. 2019;133(June):105192. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105192>
  219. Zhou F, Yin G, Gao Y, Ouyang L, Liu S, Jia Q, et al. Insights into cognitive deficits caused by low-dose toxic heavy metal mixtures and their remediation through a postnatal enriched environment in rats. *J Hazard Mater* [Internet]. 2020;388(October 2019):122081. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122081>
  220. Chatterjee M, Kortenkamp A. Cadmium exposures and deteriorations of cognitive abilities: estimation of a reference dose for mixture risk assessments based on a systematic review and confidence rating. *Environ Heal A Glob Access Sci Source* [Internet]. 2022;21(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12940-022-00881-9>
  221. Sprong C, te Biesebeek JD, Chatterjee M, Wolterink G, van den Brand A, Blaznik U, et al. A case study of neurodevelopmental risks from combined exposures to lead, methyl-mercury, inorganic arsenic, polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers and fluoride. *Int J Hyg Environ Health*. 2023;251.
  222. Qing Y, Zheng J, Tang TR, Li S, Cao S, Luo Y, et al. Risk assessment of combined exposure to lead, cadmium, and total mercury among the elderly in Shanghai, China. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2023;256(March):114874. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114874>
  223. Deng H, Tu Y, Wang H, Wang Z, Li Y, Chai L, et al. Environmental behavior, human health effect, and pollution control of heavy metal(oids) toward full life cycle processes. *Eco-Environment Heal* [Internet]. 2022;1(4):229–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2022.11.003>
  224. Briffa J, Sinagra E, Blundell R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon* [Internet]. 2020;6(9):e04691. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
  225. Merced-Nieves FM, Arora M, Wright RO, Curtin P. Metal mixtures and neurodevelopment: Recent findings and emerging principles. *Curr Opin Toxicol* [Internet]. 2021;26:28–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.03.005>
  226. Rai A, Maurya SK, Khare P, Srivastava A, Bandyopadhyay S. Characterization of developmental neurotoxicity of As, Cd, and Pb mixture: Synergistic action of metal mixture in glial and neuronal functions. *Toxicol Sci*. 2010;118(2):586–601.
  227. Ikpeama EU, Orish CN, Ezejiofor AN, Rovira J, Cirovic A, Cirovic A, et al. Essential Trace Elements Prevent the Impairment in the Retention Memory, Cerebral Cortex, and Cerebellum Damage in Male Rats Exposed to Quaternary Metal Mixture by Up-regulation, of Heme Oxygenase-1 and Down-regulation of Nuclear Factor Erythroid 2-related. *Neuroscience* [Internet]. 2023;512:70–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.01.002>
  228. Andrade V, Mateus ML, Batoréu MC, Aschner M, Marreilha dos Santos AP. Changes in rat urinary porphyrin profiles predict the magnitude of the neurotoxic effects induced by a mixture of lead, arsenic and manganese. *Neurotoxicology*. 2014;45:168–77.
  229. Tsatsakis AM, Docea AO, Calina D, Buga AM, Zlatian O, Gutnikov S, et al. Hormetic Neurobehavioral effects of low dose toxic chemical mixtures in real-life risk simulation (RLRS) in rats. *Food Chem Toxicol*. 2019;125(December 2018):141–9.
  230. Calabrese EJ, Rubio-Casillas A. Biphasic effects of THC in memory and cognition. *Eur J Clin Invest*. 2018;48(5):0–2.
  231. Berry R, López-Martínez G. A dose of experimental hormesis: When mild stress protects and improves animal performance. *Comp Biochem Physiol -Part A Mol Integr Physiol* [Internet]. 2020;242(January):110658. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110658>

232. Calabrese EJ, Mattson MP. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *npj Aging Mech Dis* [Internet]. 2017;3(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41514-017-0013-z>
233. Ijomone OM, Ijomone OK, Iroegbu JD, Ifenatuoha CW, Olung NF, Aschner M. Epigenetic influence of environmentally neurotoxic metals. *Neurotoxicology* [Internet]. 2020;81(August):51–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.08.005>
234. Miller L, Shapiro AM, Cheng J, Wells PG. The free radical spin trapping agent phenylbutylnitron reduces fetal brain DNA oxidation and postnatal cognitive deficits caused by in utero exposure to a non-structurally teratogenic dose of ethanol: A role for oxidative stress. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2013;60:223–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.015>
235. Wang G, Fowler BA. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2008;233(1):92–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.01.017>
236. Anushruti A, Rai NK, Sachin T, Bandyopadhyay S. Exposure to As, Cd and Pb-mixture induces A $\beta$ , amyloidogenic APP processing and cognitive impairments via oxidative stress-dependent neuroinflammation in young rats. *Toxicol Sci*. 2015;143(1):64–80.
237. Zhang YM, Liu XZ, Lu H, Mei L, Liu ZP. Lipid peroxidation and ultrastructural modifications in brain after perinatal exposure to lead and/or cadmium in rat pups. *Biomed Environ Sci*. 2009;22(5):423–9.
238. Hussien HM, Ghareeb DA, Ahmed HEA, Hafez HS, Saleh SR. Pharmacological implications of ipriflavone against environmental metal-induced neurodegeneration and dementia in rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2021;28(46):65349–62.
239. Javorac D, Đorđević AB, Anđelković M, Tatović S, Baralić K, Antonijević E, et al. Redox and essential metal status in the brain of Wistar rats acutely exposed to a cadmium and lead mixture. *Arch Ind Hyg Toxicol*. 2020;71(3):197–204.
240. Sule K, Anikovskiy M, Prenner EJ. Lipid Structure Determines the Differential Impact of Single Metal Additions and Binary Mixtures of Manganese, Calcium and Magnesium on Membrane Fluidity and Liposome Size. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2):1–17.
241. Pandya C, Pillai P, Nampoothiri LP, Bhatt N, Gupta S, Gupta S. Effect of lead and cadmium co-exposure on testicular steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats. *Andrologia*. 2012;44(SUPPL.1):813–22.
242. Patra RC, Rautray AK, Swarup D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet Med Int*. 2011;2011.
243. Anyanwu BO, Orish CN, Ezejiolor AN, Nwaogazie IL, Orisakwe OE. Neuroprotective effect of *Costus afer* on low dose heavy metal mixture (lead, cadmium and mercury) induced neurotoxicity via antioxidant, anti-inflammatory activities. *Toxicol Reports* [Internet]. 2020;7(April):1032–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.008>
244. Akintunde JK, Ironi AE, Ajani EO, Olayemi T V. Neuroprotective effect of dietary black seed flour on key enzymes linked with neuronal signaling molecules in rats exposed to mixture of environmental metals. *J Food Biochem*. 2018;42(5):1–11.
245. Agrawal S, Bhatnagar P, Flora SJS. Changes in tissue oxidative stress, brain biogenic amines and acetylcholinesterase following co-exposure to lead, arsenic and mercury in rats. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2015;86:208–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.013>
246. Marić Đ, Antonijević Miljaković E, Marić J, Javorac D, Baralić K, Đukić-Ćosić D, et al. Influence of toxic metal mixture on acetylcholinesterase activity in subchronic exposure in rats. *Maced Pharm Bull*. 2022;68(03):337–8.
247. Basha CD, Reddy RG. Long-term changes in brain cholinergic system and behavior in rats following gestational exposure to lead: Protective effect of calcium supplement. *Interdiscip Toxicol*. 2015;8(4):159–68.
248. Malqui H, Anarghou H, Ouardi FZ, Ouasmi N, Najimi M, Chigr F. Continuous Exposure to Inorganic Mercury Affects Neurobehavioral and Physiological Parameters in Mice. *J Mol Neurosci*. 2018;66(2):291–305.
249. Santos D, Milatovic D, Andrade V, Batoreu MC, Aschner M, Marreilha dos Santos AP. The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and

- neuroinflammation in the rat brain. *Toxicology* [Internet]. 2012;292(2–3):90–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2011.11.017>
250. Najimi S, Bouhaimi A, Daubèze M, Zekhnini A, Pellerin J, Narbonne JF, et al. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bull Environ Contam Toxicol*. 1997;58(6):901–8.
  251. De Lima D, Roque GM, De Almeida EA. Invitro and invivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar Environ Res*. 2013;91:45–51.
  252. Chowdhury R, Ramond A, O’Keeffe LM, Shahzad S, Kunutsor SK, Muka T, et al. Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2018;362:14–6.
  253. Nigra AE, Ruiz-Hernandez A, Redon J, Navas-Acien A, Tellez-Plaza M. Environmental Metals and Cardiovascular Disease in Adults: A Systematic Review Beyond Lead and Cadmium. *Curr Environ Heal reports* [Internet]. 2016;3(4):416–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s40572-016-0117-9>
  254. Hu XF, Lowe M, Chan HM. Mercury exposure, cardiovascular disease, and mortality: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Environ Res* [Internet]. 2021;193(November 2020):110538. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110538>
  255. Yang D, Yang Q, Fu N, Li S, Han B, Liu Y, et al. Hexavalent chromium induced heart dysfunction via Sesn2-mediated impairment of mitochondrial function and energy supply. *Chemosphere* [Internet]. 2021;264:128547. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128547>
  256. Hudson KM, Belcher SM, Cowley M. Maternal cadmium exposure in the mouse leads to increased heart weight at birth and programs susceptibility to hypertension in adulthood. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-49807-5>
  257. Yim G, Wang Y, Howe CG, Romano ME. Exposure to Metal Mixtures in Association with Cardiovascular Risk Factors and Outcomes: A Scoping Review. *Toxics*. 2022;10(116):1–32.
  258. Porta A, Rienzo M Di, Wessel N, Kurths J. Addressing the complexity of cardiovascular regulation. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci*. 2009;367(1892):1215–8.
  259. Crowe A, Morgan EH. Effect of Dietary Cadmium on Iron Metabolism in Growing Rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997;146(145):136–46.
  260. Nucera S, Serra M, Caminiti R, Ruga S, Passacatini LC, Macri R, et al. Non-essential heavy metal effects in cardiovascular diseases: an overview of systematic reviews. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2024;11(January). Available from: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2024.1332339>
  261. Cirovic A, Orisakwe OE, Cirovic A, Jevtic J, Tasic D, Tasic N. Non-Uniform Bioaccumulation of Lead and Arsenic in Two Remote Regions of the Human Heart’s Left Ventricle: A Post-Mortem Study. *Biomolecules*. 2023;13(8).
  262. Adil M, Kandhare AD, Ghosh P, Bodhankar SL. Sodium arsenite-induced myocardial bruise in rats: Ameliorative effect of naringin via TGF- $\beta$ /Smad and Nrf/HO pathways. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2016;253:66–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.015>
  263. Li C, Shi L, Peng C, Yu G, Zhang Y, Du Z. Lead-induced cardiomyocytes apoptosis by inhibiting gap junction intercellular communication via autophagy activation. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2021;337:109331. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109331>
  264. Wenzel P, Schuhmacher S, Kienhöfer J, Müller J, Hortmann M, Oelze M, et al. Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2008;80(2):280–9.
  265. Javorac D, Tatović S, Anđelković M, Repić A, Baralić K, Djordjević AB, et al. Low-lead doses induce oxidative damage in cardiac tissue: Subacute toxicity study in Wistar rats and Benchmark dose modelling. *Food Chem Toxicol*. 2022;161(November 2021).
  266. Yáñez L, Carrizales L, Zanatta MT, de Jesús Mejía J, Batres L, Díaz-Barriga F. Arsenic-cadmium interaction in rats: toxic effects in the heart and tissue metal shifts. *Toxicology*. 1991;67(2):227–34.
  267. Wang Y, Tang Y, Li Z, Hua Q, Wang L, Song X, et al. Joint toxicity of a multi-heavy metal mixture and chemoprevention in sprague dawley rats. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(4):1–15.
  268. Bondue A, Carpentier C, Roufousse F. Hypereosinophilic syndrome: Considerations for the cardiologist. *Heart*. 2022;108(3):164–71.

269. Roufousse F, Weller PF. Practical approach to the patient with hypereosinophilia. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(1):39–44.
270. Pryds K, Rasmussen LE, Andersen NH. Fatal right-sided heart failure due to leukostasis in a patient with leukemic transformation of myelodysplastic syndrome. *Clin Case Reports*. 2019;7(1):115–9.
271. Kelleher P, Pacheco K, Newman LS. Inorganic Dust Pneumonias: The Metal-Related Parenchymal Disorders. *Env Heal Perspect*. 2000;108(4):685–96.
272. Sengupta A, Maji A, Jash D, Maikap M. Unexplained dyspnea in a patient of chronic arsenicosis: A diagnostic challenge and learning curve for physicians. *Lung India*. 2015;32(2):169–71.
273. Cheng S, Chen Z, Gu H, Zhou R. The Correlation between Metal Mixed Exposure and Lung Function in Different Ages of the Population. *Metabolites*. 2024;14(139).
274. Fortoul TI, Saldivar O. L, Espejel-Maya G, Bazarro N. P, Mussali-Galante P, Avila-Casado MDC, et al. Inhalation of cadmium, lead or its mixture: Effects on the bronchiolar structure and its relation with metal tissue concentrations. Vol. 19, *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2005. p. 329–34.
275. Kinnula V, Crapo J. Superoxide Dismutases in the Lung and Human Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:1600–1619.
276. Boskabady MH, Tabatabai SA, Farkhondeh T. Inhaled lead affects lung pathology and inflammation in sensitized and control guinea pigs. Vol. 31, *Environmental Toxicology*. 2016. p. 452–60.
277. Suzuki KT, Ohnuki R, Yaguchi K, Yamada YK. Accumulation and chemical forms of cadmium and its effect on essential metals in rat spleen and pancreas. *J Toxicol Environ Health*. 1983;11(4–6):727–37.
278. Radike M, Warshawsky D, Caruso J, Goth-Goldstein R, Reilman R, Collins T, et al. Distribution and accumulation of a mixture of arsenic, cadmium, chromium, nickel, and vanadium in mouse small intestine, kidneys, pancreas, and femur following oral administration in water or feed. *J Toxicol Environ Heal - Part A*. 2002;65(23):2029–52.
279. Pallagi P, Tóth E, Görög M, Venglovecz V, Madácsy T, Varga Á, et al. Heavy metals in cigarette smoke strongly inhibit pancreatic ductal function and promote development of chronic pancreatitis. *Clin Transl Med*. 2024;14(6).
280. Bashir N, Manoharan V, Miltonprabu S. Grape seed proanthocyanidins protects against cadmium induced oxidative pancreatitis in rats by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis via Nrf-2/HO-1 signaling. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2016;32:128–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.001>
281. Riaz MA, Nisa ZU, Anjum MS, Butt H, Mehmood A, Riaz A, et al. Assessment of metals induced histopathological and gene expression changes in different organs of non-diabetic and diabetic rats. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-62807-0>
282. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and Function of the Immune System in Vertebrates. *Neonatal Immun*. 2007;6085(March):1–55.
283. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):606–16.
284. Corsetti G, Romano C, Stacchiotti A, Pasini E, Dioguardi FS. Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis Triggered by Sub-Chronic Lead Exposure in Mice Spleen: a Histopathological Study. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2017;178(1):86–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-016-0912-z>
285. Soria EA, Pérez RD, Queralt I, Pérez CA, Bongiovanni GA. Immunotoxicological effects of arsenic bioaccumulation on spatial metallomics and cellular enzyme response in the spleen of male Wistar rats after oral intake. *Toxicol Lett* [Internet]. 2017;266:65–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.014>
286. Yuan G, Dai S, Yin Z, Lu H, Jia R, Xu J, et al. Toxicological assessment of combined lead and cadmium: Acute and sub-chronic toxicity study in rats. *Food Chem Toxicol*. 2014;65:260–8.
287. Venter C, Olivier A, Taute H, Oberholzer HM. Histological analysis of the effects of cadmium, chromium and mercury alone and in combination on the spleen of male Sprague-Dawley rats. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng* [Internet]. 2020;55(8):925–34. Available from: <https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1756158>
288. Cenariu D, Iluta S, Zimta AA, Petrushev B, Qian L, Dirzu N, et al. Extramedullary hematopoiesis of

- the liver and spleen. *J Clin Med*. 2021;10(24):1–12.
289. Machado-Neves M. Effect of heavy metals on epididymal morphology and function: An integrative review. *Chemosphere* [Internet]. 2022;291(P2):133020. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133020>
  290. Djuric A, Begic A, Gobeljic B, Ninkovic M, Stanojevic I, Vojvodic D, et al. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2015;86:25–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.09.004>
  291. Vidaud C, Bourgeois D, Meyer D. Bone as target organ for metals: The case of f-elements. *Chem Res Toxicol*. 2012;25(6):1161–75.
  292. Rodríguez J, Mandalunis PM. A review of metal exposure and its effects on bone health. *J Toxicol*. 2018;2018.
  293. Huang Z, Wang X, Wang H, Zhang S, Du X, Wei H. Relationship of blood heavy metals and osteoporosis among the middle-aged and elderly adults: A secondary analysis from NHANES 2013 to 2014 and 2017 to 2018. *Front Public Heal*. 2023;11.
  294. Kazantzis G. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *BioMetals*. 2004;17(5):493–8.
  295. Wallin M, Barregard L, Sallsten G, Lundh T, Karlsson MK, Lorentzon M, et al. Low-Level Cadmium Exposure Is Associated with Decreased Bone Mineral Density and Increased Risk of Incident Fractures in Elderly Men: The MrOS Sweden Study. *J Bone Miner Res*. 2016;31(4):732–41.
  296. Johri N, Jacquillet G, Unwin R. Heavy metal poisoning: The effects of cadmium on the kidney. *BioMetals*. 2010;23(5):783–92.
  297. Dongre NN, Suryakar AN, Patil AJ, Hundekari IA, Devarnavadagi BB. Biochemical effects of lead exposure on battery manufacture workers with reference to blood pressure, calcium metabolism and bone mineral density. *Indian J Clin Biochem*. 2013;28(1):65–70.
  298. Kim YH, Shim JY, Seo MS, Yim HJ, Cho MR. Relationship between blood mercury concentration and bone mineral density in Korean men in the 2008–2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Korean J Fam Med*. 2016;37(5):273–8.
  299. Dani SU. Osteoresorptive arsenic intoxication. *Bone* [Internet]. 2013;53(2):541–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.01.017>
  300. Lever JH. Paget's disease of bone in Lancashire and arsenic pesticide in cotton mill wastewater: A speculative hypothesis. *Bone*. 2002;31(3):434–6.
  301. Di D, Tooki T, Zhou H, Cui Z, Zhang R, Zhang J li, et al. Metal mixture and osteoporosis risk: Insights from plasma metabolite profiling. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2023;263(July):115256. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115256>
  302. Yang X, Li L, Nie L. Associations between co-exposure to heavy metals and vertebral compression fracture, as well as femoral neck bone mineral density: A cross-sectional study from NHANES data. *PLoS One* [Internet]. 2024;19(5 May):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0303418>
  303. Zhang S, Sun L, Zhang J, Liu S, Han J, Liu Y. Adverse Impact of Heavy Metals on Bone Cells and Bone Metabolism Dependently and Independently through Anemia. *Adv Sci*. 2020;7(19):1–15.
  304. Blanusa M, Prester L, Radic S, Kargacin B. Inorganic mercury exposure, mercury-copper interaction, and DMPS treatment in rats. *Environ Health Perspect*. 1994;102(SUPPL. 3):305–7.
  305. Buha A, Jugdaohsingh R, Matovic V, Bulat Z, Antonijevic B, Kerns JG, et al. Bone mineral health is sensitively related to environmental cadmium exposure- experimental and human data. *Environ Res* [Internet]. 2019;176:108539. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108539>
  306. Lu H, Yuan G, Yin Z, Dai S, Jia R, Xu J, et al. Effects of subchronic exposure to lead acetate and cadmium chloride on rat's bone: Ca and Pi contents, bone density, and histopathological evaluation. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(2):640–7.
  307. Javorac D, Antonijević B, Anđelković M, Repić A, Bulat P, Djordjevic AB, et al. Oxidative stress, metallomics and blood toxicity after subacute low-level lead exposure in Wistar rats: Benchmark dose analyses. *Environ Pollut*. 2021;291(August).
  308. Chen X, Wang Z, Zhu G, Liang Y, Jin T. Benchmark dose estimation of cadmium reference level for hypertension in a Chinese population. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2015;39(1):208–12.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.026>

309. Wang Q, Ye LX, Zhao HH, Chen JW, Zhou YK. Benchmark dose approach for low-level lead induced haematogenesis inhibition and associations of childhood intelligences with ALAD activity and ALA levels. *Sci Total Environ*. 2011;409(10):1806–10.
310. Wang T, Tu Y, Zhang G, Gong S, Wang K, Zhang Y, et al. Development of a benchmark dose for lead-exposure based on its induction of micronuclei, telomere length changes and hematological toxicity. *Environ Int* [Internet]. 2020;145:106129. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106129>
311. Wildemann TM, Mirhosseini N, Siciliano SD, Weber LP. Cardiovascular responses to lead are biphasic, while methylmercury, but not inorganic mercury, monotonically increases blood pressure in rats. *Toxicology*. 2015;328:1–11.
312. Carpenter DO, Arcaro KF, Bush B, Niemi WD, Pang S, Vakharia DD. Human Health and Chemical Mixtures: An Overview. *Environ Health Perspect*. 1998;106(December):1263–70.
313. Mitra S, Chakraborty AJ, Tareq AM, Emran T Bin, Nainu F, Khusro A, et al. Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *J King Saud Univ - Sci* [Internet]. 2022;34(3):101865. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101865>
314. Spurgeon DJ, Jones OAH, Dorne JLCM, Svendsen C, Swain S, Stürzenbaum SR. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci Total Environ* [Internet]. 2010;408(18):3725–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.02.038>
315. Jadhav SH, Sarkar SN, Ram GC, Tripathi HC. Immunosuppressive effect of subchronic exposure to a mixture of eight heavy metals, found as groundwater contaminants in different areas of India, through drinking water in male rats. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2007;53(3):450–8.
316. Fortier M, Omara F, Bernier J, Brousseau P, Fournier M. 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 Heal - Part A Curr Issues*. 2008;71(19):1327–37.
317. Roney N, Abadin HG, Fowler B, Pohl HR. Metal ions affecting the hematological system. *Met Ions Toxicol Eff Interact Interdepend*. 2015;(June):143–55.
318. Chibueze Izah S, Srivastav AL. Level of arsenic in potable water sources in Nigeria and their potential health impacts: A review. *J Environ Treat Tech* [Internet]. 2015;3(1):15–24. Available from: <http://www.jett.dormaj.com>
319. El-Boshy ME, Risha EF, Abdelhamid FM, Mubarak MS, Hadda T Ben. Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. 2015;29:104–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.05.009>
320. Rice KM, Jr EMW, Wu M, Gillette C, Blough ER. Environmental Mercury and Its Toxic Effects. 2014;74–83.
321. Simsek N, Karadeniz A, Kalkan Y, Keles ON, Unal B. *Spirulina platensis* feeding inhibited the anemia- and leucopenia-induced lead and cadmium in rats. *J Hazard Mater*. 2009;164(2–3):1304–9.
322. Gonzalez M, Tejedor MC.  $\delta$ -ALAD activity variations in red blood cells in response to lead accumulation in rock doves (*Columba livia*). *Bull Environ Contam Toxicol*. 1992;49(4):527–34.
323. Hasegawa D, Kojima S, Tatsumi E, Hayakawa A, Kosaka Y, Nakamura H, et al. Elevation of the serum Fas ligand in patients with hemophagocytic syndrome and Diamond-Blackfan anemia. *Blood* [Internet]. 1998;91(8):2793–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1182/blood.V91.8.2793.2793\\_2793\\_2799](http://dx.doi.org/10.1182/blood.V91.8.2793.2793_2793_2799)
324. Nagata S, Golstein P. The Fas Death Factor. *Science* (80- ). 1995;267(5203):1449–56.
325. Tchounwou PB, Centeno JA, Patlolla AK. Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis - A health risk assessment and management approach. *Mol Cell Biochem*. 2004;255(1–2):47–55.
326. Rana T, Bera AK, Das S, Bhattacharya D, Bandyopadhyay S, Pan D, et al. Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on blood oxidative stress indices in cattle in an arsenic-affected zone. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2010;73(6):1327–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.06.002>
327. Al-Forkan M, Islam S, Akter R, Shameen Alam S, Khaleda L, Rahman Z, et al. A Sub-Chronic

- Exposure Study of Arsenic on Hematological Parameters, Liver Enzyme Activities, Histological Studies and Accumulation Pattern of Arsenic in Organs of Wistar Albino Rats. *J Cytol Histol.* 2016;07(02):1–7.
328. Hutton M. Human Health Concerns of Lead , Mercury , Cadmium and Arsenic. *Lead, Mercur Cadmium Arsen Environ.* 1987;53–68.
  329. Matovic V. Insight into the oxidative stress induced by lead and / or cadmium in blood , liver and kidneys. 2015;78:130–40.
  330. Ekawanti A, Krisnayanti BD. Effect of Mercury Exposure on Renal Function and Hematological Parameters among Artisanal and Small-scale Gold Miners at Sekotong, West Lombok, Indonesia. *J Heal Pollut.* 2015;5(9):25–32.
  331. Mahaffey KR, Fowlert BA. Effects of Concurrent Administration of Lead , Cadmium , and Arsenic in the Rat. 1977;19(August):165–71.
  332. Hounkpatin ASY, Alimba C, Ogunkanmi AL. Haematological evaluation of Wistar rats exposed to chronic doses of cadmium, mercury and combined cadmium and mercury. *African J Biotechnol.* 2013;12(23):3731–7.
  333. Schildroth S, Friedman A, Bauer JA, Claus Henn B. Associations of a metal mixture with iron status in U.S. adolescents: Evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey. *New Dir Child Adolesc Dev.* 2022;2022(181–182):67–89.
  334. Słota M, Wąsik M, Stołtny T, Machoń-Grecka A, Kasperczyk S. Effects of environmental and occupational lead toxicity and its association with iron metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2022;434(November 2021).
  335. Shah F, Kazi TG, Afridi HI, Baig JA, Khan S, Kolachi NF, et al. Environmental exposure of lead and iron deficit anemia in children age ranged 1-5years: A cross sectional study. *Sci Total Environ* [Internet]. 2010;408(22):5325–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.091>
  336. Fournié GJ, Mas M, Cautain B, Savignac M, Subra JF, Pelletier L, et al. Induction of autoimmunity through bystander effects. Lessons from immunological disorders induced by heavy metals. *J Autoimmun.* 2001;16(3):319–26.
  337. Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC. Expansion or elimination of B cells in vivo: Dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell.* 1996;87(2):319–29.
  338. Gupta S, Belle VS, Kumbarakeri Rajashekhar R, Jogi S, Prabhu RK. Correlation of Red Blood Cell Acetylcholinesterase Enzyme Activity with Various RBC Indices. *Indian J Clin Biochem.* 2018;33(4):445–9.
  339. Kelner MJ, Montoya MA. Structural organization of the human glutathione reductase gene: Determination of correct cDNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269(2):366–8.
  340. Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett* [Internet]. 2013;328(2):222–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.014>
  341. Demeter J, Messer G, Schrezenmeier H. Clinical relevance of the TNF-alpha promoter/enhancer polymorphism in patients with aplastic anemia. *Ann Hematol.* 2002;81(10):566–9.
  342. Du W, Erden O, Pang Q. TNF- $\alpha$  signaling in Fanconi anemia. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2014;52(1):2–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.06.005>
  343. Moldawer LL, Manogue KR, Vlassara H, Lowry F. C achectin / tumor necrosis factor-alpha blood cell kinetics and induces alters red anemia in vivo. *FASEB J.* 2018;1637–43.
  344. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: Implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation.* 2008;5(1):1–13.
  345. Kontandrepoulou CN, Diamantopoulos PT, Tiblalex D, Giannakopoulou N, Viniou NA. PARP1 as a therapeutic target in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood Adv* [Internet]. 2021;5(22):4794–805. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004638>
  346. Storz G, Imlay JA. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2:188–94.
  347. Dumaswala UJ, Zhuo L, Jacobsen DW, Jain SK, Sukalski KA. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: Role of glutathione. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(9–10):1041–9.

348. Koralkova P, Van Solinge WW, Van Wijk R. Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia - pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(3):388–97.
349. Hao J, Xu W, Wei M, Wang L, Xu Q, Sun L. Correlation between Erythropoietin and Tumor Necrosis Factor Alpha in Children with Malignant Tumor Anemia. *Adv Clin Med*. 2020;10(04):555–61.
350. Bron D, Meuleman N, Mascaux C. Biological basis of anemia. *Semin Oncol*. 2001;28(2 SUPPL. 8):1–6.
351. Herz F, Kaplan E, Scheye ES. RED CELL ACETYLCHOLINESTERASE DEFICIENCY IN AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA AND IN PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA. *CLIKICA Chim ACTA*. 1971;38(2):301–6.
352. Balfourier A, Marty AP, Gazeau F. Importance of Metal Biotransformation in Cell Response to Metallic Nanoparticles: A Transcriptomic Meta-analysis Study. *ACS Nanosci Au*. 2023;3(1):46–57.
353. Qiao G, Shen Z, Duan S, Wang R, He P, Zhang Z, et al. Associations of urinary metal concentrations with anemia: A cross-sectional study of Chinese community-dwelling elderly. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2024;270(September 2023):115828. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115828>
354. Yadav S, Maurya PK. Recent advances in the protective role of metallic nanoparticles in red blood cells. *3 Biotech* [Internet]. 2022;12(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03087-x>
355. Barkur S, Lukose J, Chidangil S. Probing Nanoparticle-Cell Interaction Using Micro-Raman Spectroscopy: Silver and Gold Nanoparticle-Induced Stress Effects on Optically Trapped Live Red Blood Cells. *ACS Omega*. 2020;5(3):1439–47.
356. Skoda RC. Thrombocytosis. *Hematology* [Internet]. 2009;2009:159–67. Available from: <http://archinte.ama-assn.org/cgi/content/summary/114/4/497>
357. Romaniuk A, Lyndin M, Lyndina Y, Sikora V, Hrintsova N, Timakova O, et al. Changes in the hematopoietic system and blood under the influence of heavy metal salts can be reduced with vitamin E. *Turk Patoloji Derg*. 2018;34(1):73–81.
358. Kostić MM, Ognjanović B, Dimitrijević S, Zikić R V., ZSCtajn A, Rosić GL, et al. Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects. *Eur J Haematol*. 1993;51(2):86–92.
359. Vinaya Kumar S, Bhattacharya S. In vitro toxicity of mercury, cadmium, and arsenic to platelet aggregation: Influence of adenylate cyclase and phosphodiesterase activity. *Vitr Mol Toxicol J Basic Appl Res*. 2000;13(2):137–44.
360. Gonzalez-Villalva A, Piñon-Zarate G, Falcon-Rodriguez C, Lopez-Valdez N, Bizarro-Nevaras P, Rojas-Lemus M, et al. Activation of Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway involved in megakaryocyte proliferation induced by vanadium resembles some aspects of essential thrombocythemia. *Toxicol Ind Health*. 2016;32(5):908–18.
361. Vainchenker W, Plo I, Marty C, Varghese LN, Constantinescu SN. The role of the thrombopoietin receptor MPL in myeloproliferative neoplasms: recent findings and potential therapeutic applications. *Expert Rev Hematol* [Internet]. 2019;12(6):437–48. Available from: <https://doi.org/10.1080/17474086.2019.1617129>
362. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(9):673–83.
363. Chi J, Nicolaou KA, Nicolaidou V, Koumas L, Mitsidou A, Pierides C, et al. Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia*. 2014;28(5):1152–4.
364. Fetit R, Price DJ, Lawrie SM, Johnstone M. Understanding the clinical manifestations of 16p11.2 deletion syndrome: a series of developmental case reports in children. *Psychiatr Genet*. 2020;30(5):136–40.
365. Giannuzzi G, Schmidt PJ, Porcu E, Willemin G, Munson KM, Nuttle X, et al. The Human-Specific BOLA2 Duplication Modifies Iron Homeostasis and Anemia Predisposition in Chromosome 16p11.2 Autism Individuals. *Am J Hum Genet*. 2019;105(5):947–58.
366. Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat*

Rev Genet. 2007;8(2):93–103.

367. Cagnan I, Keles M, Keskus AG, Tombaz M, Sahan OB, Aerts-Kaya F, et al. Global miRNA expression of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells derived from Fanconi anemia patients. *Hum Cell [Internet]*. 2022;35(1):111–24. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13577-021-00626-9>
368. Degan P, Cappelli E, Longobardi MG, Pulliero A, Cuccarolo P, Dufour C, et al. A Global MicroRNA Profile in Fanconi Anemia: A Pilot Study. *Metab Syndr Relat Disord*. 2019;17(1):53–9.
369. Mi Z, Gong L, Kong Y, Zhao P, Yin Y, Xu H, et al. Differential expression of exosomal microRNAs in fresh and senescent apheresis platelet concentrates. *Platelets [Internet]*. 2022;33(8):1260–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/09537104.2022.2108541>
370. Formosa A, Acton E, Lee A, Turgeon P, Izhar S, Plant P, et al. Validation of reference gene stability for miRNA quantification by reverse transcription quantitative PCR in the peripheral blood of patients with COVID-19 critical illness. *PLoS One [Internet]*. 2023;18(8 August):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0286871>
371. Casabonne D, Benavente Y, Seifert J, Costas L, Armesto M, Arestin M, et al. Serum levels of hsa-miR-16-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p and hsa-miR-223-3p and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia in the EPIC study. *Int J Cancer*. 2020;147(5):1315–24.
372. Ludwig LS, Lareau CA, Bao EL, Liu N, Utsugisawa T, Tseng AM, et al. Congenital anemia reveals distinct targeting mechanisms for master transcription factor GATA1. *Blood [Internet]*. 2022;139(16):2534–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2021013753>
373. Harigae H. GATA transcription factors and hematological diseases. *Tohoku J Exp Med*. 2006;210(1):1–9.
374. Rainis L, Toki T, Pimanda JE, Rosenthal E, Machol K, Strehl S, et al. The proto-oncogene ERG in megakaryoblastic leukemias. *Cancer Res*. 2005;65(17):7596–602.
375. Aly M, Ramdzan ZM, Nagata Y, Balasubramanian SK, Hosono N, Makishima H, et al. Distinct clinical and biological implications of CUX1 in myeloid neoplasms. *Blood Adv*. 2019;3(14):2164–78.
376. Boultswood J. CUX1 in leukemia: Dosage matters. *Blood*. 2013;121(6):869–70.
377. Chen P, Miah MR, Aschner M. Metals and Neurodegeneration. *F1000Research*. 2016;5(0):1–12.
378. Ikrar T, Steenblock DA, Putranto TA. Pathology and Clinical Research Atypical Levels of Heavy Metals , Creatinine , Haptoglobin , and Ferritin Found in Amyotrophic Lateral Sclerosis Outpatients vs . Healthy Controls : Possible Utility as a Diagnostic Biomarker. *Int J Pathol Clin Res*. 2019;5(1):1–9.
379. Ashok A, Rai NK, Tripathi S, Bandyopadhyay S. Exposure to As-, Cd-, and Pb-mixture induces A $\beta$ , amyloidogenic APP processing and cognitive impairments via oxidative stress-dependent neuroinflammation in young rats. *Toxicol Sci*. 2015;143(1):64–80.
380. Zhou F, Xie J, Zhang S, Yin G, Gao Y, Zhangab Y, et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Lead , cadmium , arsenic , and mercury combined exposure disrupted synaptic homeostasis through activating the Snk-SPAR pathway. *Ecotoxicol Environ Saf [Internet]*. 2018;163(July):674–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.116>
381. Shen T, You Y, Joseph C, Mirzaei M, Klistorner A, Stuart L, et al. BDNF Polymorphism : A Review of Its Diagnostic and Clinical Relevance in Neurodegenerative Disorders. *Aging Dis*. 2018;9(3):523–36.
382. Schipper HM, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D. Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J Neurochem*. 2009;110(2):469–85.
383. Strang KH, Golde TE, Giasson BI. MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration. *Lab Investig*. 2020;99(7):912–28.
384. Fischer R, Maier O. Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease : Role of TNF. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015.
385. Kuz M, Jamrozik Z, Baran A. Activity and expression of glutathione S-transferase pi in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Chim acta*. 2006;364:217–21.
386. Mazzetti AP, Fiorile MC, Primavera A, Bello M Lo. Neurochemistry International Glutathione

- transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* [Internet]. 2015;82:10–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2015.01.008>
387. Hussain A, Bashir K, Anees S, Afzal M, Masood A, Ahmad M, et al. ScienceDirect Oxidative stress , mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases ; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother*. 2015;74:101–10.
388. Flynn JM, Melov S. Free Radical Biology and Medicine SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2013;62:4–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027>
389. Fox DA, Grandjean P, De Groot D, Paule MG. Developmental origins of adult diseases and neurotoxicity: Epidemiological and experimental studies. *Neurotoxicology*. 2012;33(4):810–6.
390. Xu Z, Liu J, Wu X, Huang B, Pan X. Nonmonotonic responses to low doses of xenoestrogens: A review. *Environ Res*. 2017;155(727):199–207.
391. Zhu XW, Liu SS, Qin LT, Chen F, Liu HL. Modeling non-monotonic dose-response relationships: Model evaluation and hormetic quantities exploration. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2013;89:130–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.022>
392. Chang JR, Ghafouri M, Mukerjee R, Bagashev A, Chabrashvili T, Sawaya BE. Role of p53 in neurodegenerative diseases. *Neurodegener Dis*. 2012;9(2):68–80.
393. Szybinska A, Lesniak W. P53 dysfunction in neurodegenerative diseases - The cause or effect of pathological changes? *Aging Dis*. 2017;8(4):506–18.
394. Esposito L, Raber J, Kekonius L, Yan F, Yu GQ, Bien-Ly N, et al. Reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer’s disease-like pathology and accelerates the onset of behavioral changes in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*. 2006;26(19):5167–79.
395. Li F, Calingasan NY, Yu F, Mauck WM, Toidze M, Almeida CG, et al. Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice. *J Neurochem*. 2004;89(5):1308–12.
396. Melov S, Adlard PA, Morten K, Johnson F, Golden TR, Hinerfeld D, et al. Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS One*. 2007;2(6):e536.
397. Shacka JJ, Roth KA. Regulation of neuronal cell death and neurodegeneration by members of the Bcl-2 family: Therapeutic implications. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005;4(1):25–39.
398. Azzouz M, Hottinger A, Paterna JC, Zurn AD, Aebischer P, Büeler H. Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum Mol Genet*. 2000;9(5):803–11.
399. Akhtar RS, Ness JM, Roth KA. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2004;1644(2–3):189–203.
400. Houseweart MK, Cleveland DW. Bcl-2 overexpression does not protect neurons from mutant neurofilament- mediated motor neuron degeneration. *J Neurosci*. 1999;19(15):6446–56.
401. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals , oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*. 2010;345(1):91–104.
402. Cheignon C, Tomas M, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer ’ s disease. *Redox Biol* [Internet]. 2018;14(September 2017):450–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
403. Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS : Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010;48(5):629–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.018>
404. Wang Z, Bai Z, Qin X, Cheng Y. Aberrations in Oxidative Stress Markers in Amyotrophic Lateral Sclerosis : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
405. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I : Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. *Curr Top Med Chem*. 2001;1(6):529–39.
406. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox - and non - redox - metal - induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol*. 2016;90(1):1–37.
407. Akram Z, Riaz S, Kayani MA, Jahan S, Ahmad MW, Ullah MA, et al. Lead induces DNA damage and alteration of ALAD and antioxidant genes mRNA expression in construction site workers. *Arch*

- Environ Occup Health [Internet]. 2018;74(4):171–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/19338244.2018.1428523>
408. Karri V, Ramos D, Bauzá J, Odena A, Oliveira E, Coort SL, et al. Differential protein expression of hippocampal cells associated with heavy metals ( Pb , As , and MeHg ) neurotoxicity : Deepening into the molecular mechanism of neurodegenerative diseases. *J Proteomics* [Internet]. 2018;187(March):106–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.06.020>
  409. Mendieta-Wejebe JE, Miliar-García Á, Correa-Basurto J, Sánchez-Rico C, Ramírez-Rosales D, Trujillo-Ferrara J, et al. Comparison of the effect of chronic cadmium exposure on the antioxidant defense systems of kidney and brain in rat. *Toxicol Mech Methods*. 2013;6516(5):329–36.
  410. Trist BG, Davies KM, Cottam V, Genoud S, Ortega R. associated with neuronal loss in Parkinson ' s disease brain Amyotrophic lateral sclerosis - like superoxide dismutase 1 proteinopathy is associated with neuronal loss in Parkinson ' s disease brain. *Acta Neuropathol*. 2017;134(1):113–27.
  411. Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, Federici L. Glutathione transferases : substrates , inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis* [Internet]. 2018;7(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>
  412. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. 2003;26(3):137–46.
  413. Wu Y, Yang X, Li X, Wang H, Wang T. Elevated cerebrospinal fluid homocysteine is associated with blood-brain barrier disruption in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Sci*. 2020;41:1865–1872.
  414. Coppede F. One-Carbon Metabolism and Alzheimer ' s Disease : Focus on Epigenetics. *Curr Genomics*. 2010;11(4):246–60.
  415. De Lau LML, Koudstaal PJ, Wittteman JCM, Hofman A, Breteler MMB. Dietary folate , vitamin B 12 , and vitamin B 6 and the risk of Parkinson disease. *Neurology*. 2006;67(2):315–8.
  416. Han P. Effects of adjuvant folic acid + vitamin b12 therapy on Hcy metabolism , neurotrophin and nerve injury in patients with Alzheimer ' s disease. *J Hainan Med Univ*. 2017;23(24):138–41.
  417. Drenth H, Zuidema SU, Krijnen WP, Bautmans I, Schans C Van Der, Hobbelen H. Advanced Glycation End-Products Are Associated With the Presence and Severity of Paratonia in Early Stage Alzheimer Disease. *Journals Gerontol Ser A* [Internet]. 2018;73(11):1545–1551. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamda.2017.04.004>
  418. Miller MC, Tavares R, Johanson CE, Hovanesian V, Donahue JE, Gonzalez L, et al. Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2008;1230:273–80.
  419. Xu XY, Deng CQ, Wang J, Deng XJ, Xiao Q, Li Y, et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer ' s disease Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer ' s disease. *Int J Neurosci*. 2016;127(5):454–8.
  420. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt ANNM, Wautier JL, et al. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Metab*. 2001;280(5):E685–94.
  421. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- k B activation by reactive oxygen species : Fifteen years later. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(11):1493–505.
  422. Prasad K. AGE – RAGE stress : a changing landscape in pathology and treatment of Alzheimer ' s disease. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2019;459(1–2):95–112. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03553-4>
  423. Mohammed AM, Syeda K, Hadden T, Kowluru A. Upregulation of phagocyte-like NADPH oxidase by cytokines in pancreatic beta-cells: Attenuation of oxidative and nitrosative stress by 2-bromopalmitate. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2013;85(1):109–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.09.024>
  424. Yang D, Elnor SG, Bian Z, Till GO, Petty HR, Elnor VM. Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. *Exp Eye Res*. 2007;85(4):462–72.
  425. Maguire G. Amyotrophic lateral sclerosis as a protein level, non-genomic disease: Therapy with S2RM exosome released molecules. *World J Stem Cells*. 2017;9((11)):187–202.
  426. Mannervik B. Molecular enzymology of the glyoxalase system. *Drug Metabol Drug Interact*.

2008;23(1/2):13.

427. Yamagishi S, Takeuchi M, Unoki H. Can we identify genes for susceptibility to diabetic microangiopathies using stroke-prone spontaneously hypertensive rat models? *Med Hypotheses*. 2001;56(4):510–2.
428. Casula M, Iyer AM, Spliet WGM, Anink JJ, Steentjes K, Sta M, et al. Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Neuroscience* [Internet]. 2011;179(April):233–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.02.001>
429. Ray R, Juranek J, Rai V. RAGE axis in neuroinflammation, neurodegeneration and its emerging role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2015;62:48–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.12.006>
430. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial Physiology : Unique Stimuli , Specialized Responses. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):119–145.
431. Derk J, MacLean M, Juranek J, Schmidt AM. The Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) and Mediation of Inflammatory Neurodegeneration. *J Alzheimer's Dis Park*. 2018;8(1).
432. Gorman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases : recurring themes around protein handling. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6):2263–80.
433. Lossi L, Merighi A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol*. 2003;69(5):287–312.
434. Nagata S. Apoptotic DNA Fragmentation. 2000;256(1):12–8.
435. Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, et al. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol*. 2002;9(9):680–4.
436. Chi H, Chang H, Sang T. Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):3082.
437. Haiyan H, Yiyu W, Yihui Z, Wenhua W, Dongmei X, Zhiyu C, et al. Effect of Qingxinkaiqiao compound on cortical mRNA expression of the apoptosis-related genes Bcl-2, BAX, caspase-3, and A $\beta$  in an Alzheimer's disease rat model. *J Tradit Chinese Med* [Internet]. 2016;36(5):654–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0254-6272\(16\)30086-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0254-6272(16)30086-3)
438. Campanella C, Id AP, Caruso C, Id B, Marzullo P, Gammazza AM, et al. Heat Shock Proteins in Alzheimer ' s Disease : Role and Targeting. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2603.
439. Srikanth R, Bowser R. p53 and Cell Cycle Proteins Participate in Spinal Motor Neuron Cell Death in ALS. *Open Pathol J*. 2011;4:11–22.
440. Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders : Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(April):1–22.
441. Shanker Sharma H, Sharma A. Neurotoxicity of Engineered Nanoparticles from Metals. *CNS Neurol Disord - Drug Targets*. 2012;11(1):65–80.
442. Tian FY, Everson TM, Lester B, Punshon T, Jackson BP, Hao K, et al. Selenium-associated DNA methylation modifications in placenta and neurobehavioral development of newborns: An epigenome-wide study of two U.S. birth cohorts. *Environ Int* [Internet]. 2020;137(January):105508. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105508>
443. Ellwanger JH, Molz P, Dallemole DR, Pereira dos Santos A, Müller TE, Cappelletti L, et al. Selenium reduces bradykinesia and DNA damage in a rat model of Parkinson's disease. *Nutrition*. 2015;31(2):359–65.
444. Kabir MT, Uddin MS, Zaman S, Begum Y, Ashraf GM, Bin-Jumah MN, et al. Molecular Mechanisms of Metal Toxicity in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2020;58(1):1–20.
445. Ahmad A, Patel V, Xiao J, Khan MM. The Role of Neurovascular System in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2020;57(11):4373–93.
446. Petrillo S, Schirinzi T, Di Lazzaro G, D'Amico J, Colona VL, Bertini E, et al. Systemic activation of Nrf2 pathway in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2020;35(1):180–4.
447. Bento-Pereira C, Dinkova-Kostova AT. Activation of transcription factor Nrf2 to counteract mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Med Res Rev*. 2020;(June):1–18.

448. Kaur D, Sharma V, Deshmukh R. Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2019;27(4):663–77. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00580-x>
449. Young DA, Lowe LD, Booth SS, Whitters MJ, Nicholson L, Kuchroo VK, et al. IL-4, IL-10, IL-13, and TGF- $\beta$  from an Altered Peptide Ligand-Specific Th2 Cell Clone Down-Regulate Adoptive Transfer of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 2000;164(7):3563–72.
450. Kawahara K, Suenobu M, Yoshida A, Koga K, Hyodo A, Ohtsuka H, et al. Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces  $\beta$ -amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice. *Neuroscience* [Internet]. 2012;207:243–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.01.049>
451. Jeong JY, Chung YC, Jin BK. Interleukin-4 and interleukin-13 exacerbate neurotoxicity of prothrombin kringle-2 in cortex in vivo via oxidative stress. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):1927.
452. Zuccarello E, Acquarone E, Calcagno E, Argyrousi EK, Deng SX, Landry DW, et al. Development of novel phosphodiesterase 5 inhibitors for the therapy of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2020;176(January):113818. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113818>
453. Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD. Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature*. 1995;376(6535):74–80.
454. Contestabile A, Ciani E. Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem Int*. 2004;45(6):903–14.
455. Choi YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HSV, et al. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci*. 2000;3(1):15–21.
456. Fuso A, Scarpa S. One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: Is it all a methylation matter? *Neurobiol Aging* [Internet]. 2011;32(7):1192–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.01.012>
457. Tangney CC, Aggarwal NT, Li H, Wilson RS, DeCarli C, Evans DA, et al. Vitamin B12, cognition, and brain MRI measures: A cross-sectional examination. *Neurology*. 2011;77(19):1773.
458. Vogiatzoglou A, Refsum H, Johnston C, Smith SM, Bradley KM, De Jager C, et al. Vitamin B12 status and rate of brain volume loss in community-dwelling elderly. *Neurology*. 2008;71(11):826–32.
459. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett*. 2006;580(13):2994–3005.
460. Ioannides ZA, Ngo ST, Henderson RD, McCombe PA, Steyn FJ. Altered metabolic homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: Mechanisms of energy imbalance and contribution to disease progression. *Neurodegener Dis*. 2016;16(5–6):382–97.
461. Hattoria N, Wanga M, Taka H, Fujimura T, Yoritaka A, Kubo S ichiro, et al. Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Park Relat Disord*. 2009;15(1):35–8.
462. Dreiem A, Shan M, Okoniewski RJ, Sanchez-Morrissey S, Seegal RF. Methylmercury inhibits dopaminergic function in rat pup synaptosomes in an age-dependent manner. *Neurotoxicol Teratol* [Internet]. 2009;31(5):312–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2009.05.001>
463. Masato A, Plotegher N, Boassa D, Bubacco L. Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. *Mol Neurodegener*. 2019;14(1):1–21.
464. Baralić K, Jorgovanović D, Živančević K, Miljković EA, Antonijević B, Djordjevic AB, et al. Safety assessment of drug combinations used in COVID-19 treatment : in silico toxicogenomic data-mining approach. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2020;406(September):115237. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115237>
465. Davis AP, Murphy CG, Saraceni-Richards CA, Rosenstein MC, Wieggers TC, Mattingly CJ. Comparative Toxicogenomics Database : a knowledgebase and discovery tool for chemical – gene – disease networks. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(suppl\_1):D786–92.
466. Mazziotta C, Tognon M, Martini F, Torreggiani E, Rotondo JC. Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells* [Internet]. 2023;12(1):184. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/1/184>
467. Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. Immunomodulation of Human Blood Cells Following the Ingestion of Lactic Acid Bacteria. *J Dairy Sci*. 1995;78(3):491–7.

468. Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr.* 2000;54(3):263–7.
469. Balabekova MK, Kairanbayeva GK, Stankevicius E, Tokusheva AN, Sycheva YS, Myrzagulova SE, et al. Toxic Effects of Heavy Metals on the Immune System and New Approaches to Restoring Homeostasis. 2024;7:1411–21.
470. Singh P, Pandey RK, Paswan VK, Yadav SP, Bhinchhar BK, Singh CS. Effect of supplementation of *L. plantarum* and *L. casei* based probiotic milk powder on hematology, blood biochemistry and lipid profile of Charles Foster rats. *Indian J Anim Res.* 2019;53(3):332–5.
471. Bibi Z, Fatima N, Qadeer Sarwar M, Arifullah, Younas S, Manzoor T, et al. Effect of probiotics on hematology and histopathology of organs associated with immune system in male and female Wistar rats. *J King Saud Univ - Sci* [Internet]. 2024;36(9):103375. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103375>
472. Shehzadi A, Bibi Z, Qadeer Sarwar M, Ullah A, Rehman A, Abbas Bukhari D. Effect of probiotics on hematological parameters of male and female Wistar rats. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2023;30(10):103794. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103794>
473. Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients.* 2017;9(5).
474. Zhu Q, Chen B, Zhang F, Zhang B, Guo Y, Pang M, et al. Toxic and essential metals: metabolic interactions with the gut microbiota and health implications. *Front Nutr.* 2024;11(July):1–21.
475. Irvani Saadi M, Ramzi M, Fooladivanda N, Afshinpour S, Ghahramani Z, Ahmadyan M, et al. Probiotics: Potential Benefits and Safety in Hematological Malignancies. *Galen Med J.* 2024;13:e3149.
476. Chen R, Tu H, Chen T. Potential Application of Living Microorganisms in the Detoxification of Heavy Metals. *Foods.* 2022;11(13):1–24.
477. Geyik MF, Aldemir M, Hosoglu S, Ayaz C, Satilmis S, Buyukbayram H, et al. The effects of *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in rats with obstructive jaundice. *Ann R Coll Surg Engl.* 2006;88(2):178–80.
478. Maslennikov R, Efremova I, Ivashkin V, Zharkova M, Poluektova E, Shirokova E, et al. Effect of probiotics on hemodynamic changes and complications associated with cirrhosis: A pilot randomized controlled trial. *World J Hepatol.* 2022;14(8):1667–77.
479. Skrypnik K, Bogdański P, Schmidt M, Suliburska J. The Effect of Multispecies Probiotic Supplementation on Iron Status in Rats. *Biol Trace Elem Res.* 2019;192(2):234–43.
480. Tian N, Li L, Ng JKC, Li PKT. The Potential Benefits and Controversies of Probiotics Use in Patients at Different Stages of Chronic Kidney Disease. *Nutrients.* 2022;14(19):1–12.
481. Corrales D, Alcántara C, Clemente MJ, Vélez D, Devesa V, Monedero V, et al. Phosphate Uptake and Its Relation to Arsenic Toxicity in *Lactobacilli*. *Int J Mol Sci.* 2024;25(9).
482. Neuman H, Debelius JW, Knight R, Koren O. Microbial endocrinology: The interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiol Rev.* 2015;39(4):509–21.
483. Shu Q, Kang C, Li J, Hou Z, Xiong M, Wang X, et al. Effect of probiotics or prebiotics on thyroid function: A meta-analysis of eight randomized controlled trials. *PLoS One* [Internet]. 2024;19(1 January):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0296733>
484. Nasser EK, Majeed KR, Ali HI. Effect of some strains of lactic acid bacteria and their mixture on the level of fats and cholesterol in albino rats (*Rattus norvegicus*) male with hypothyroidism induced using carbimazole. *Basrah J Agric Sci.* 2021;34(1):139–46.
485. Baralić K, Živančević K, Javorac D, Djordjevic AB, Anđelković M, Jorgovanović D, et al. Multi-strain probiotic ameliorated toxic effects of phthalates and bisphenol A mixture in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2020;143(May).
486. Ljunggren L, Butler E, Axelsson J, Åström M, Ohlsson L. Effects of probiotic supplementation on testosterone levels in healthy ageing men: A 12-week double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial. *Contemp Clin Trials Commun.* 2024;39(April).
487. Jain M, Anand A, Sharma N, Shamim MA, Enioutina EY. Effect of Probiotics Supplementation on Cortisol Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutr.* 2024;16(20).

488. Mohmmad Monadi Al-Enazi A, Virk P, Hindi A, Awad MA, Elobeid M, Qindeel R. Protective effect of probiotic bacteria and its nanoformulation against cadmium-induced oxidative stress in male Wistar rat. *J King Saud Univ - Sci* [Internet]. 2020;32(7):3045–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.08.011>
489. Jafarpour D, Shekarforoush SS, Ghaisari HR, Nazifi S, Sajedianfard J, Eskandari MH. Protective effects of synbiotic diets of *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus plantarum* and inulin against acute cadmium toxicity in rats. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):1–8.
490. Tian F, Zhai Q, Zhao J, Liu X, Wang G, Zhang H, et al. *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 alleviates lead toxicity in mice. *Biol Trace Elem Res*. 2012;150(1–3):264–71.
491. Saeed Alahmari A. Immunotoxic and Genotoxic Effects of Arsenic and Ameliorative Potential of Quercetin and Probiotics in Wistar Rat. *Am J Life Sci*. 2017;5(4):108.
492. Banwo K, Alonge Z, Sanni AI. Binding Capacities and Antioxidant Activities of *Lactobacillus plantarum* and *Pichia kudriavzevii* Against Cadmium and Lead Toxicities. *Biol Trace Elem Res*. 2021;199(2):779–91.
493. Ojekunle O, Banwo K, Sanni AI. In vitro and in vivo evaluation of *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum* for their protective effect against cadmium and lead toxicities. *Lett Appl Microbiol*. 2017;64(5):379–85.
494. Li B, Jin D, Yu S, Evivie SE, Muhammad Z, Huo G, et al. In Vitro and in Vivo evaluation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* KLDS1.0207 for the alleviative effect on lead toxicity. *Nutrients*. 2017;9(8).
495. Jahromi MF, Liang JB, Ebrahimi R, Soleimani AF, Rezaeizadeh A, Abdullah N, et al. Protective potential of *Lactobacillus* species in lead toxicity model in broiler chickens. *Animal* [Internet]. 2017;11(5):755–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1017/S175173111600224X>
496. Zhai Q, Wang G, Zhao J, Liu X, Tian F, Zhang H, et al. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* ccfm8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(5):1508–15.
497. Roy Sarkar S, Mitra Mazumder P, Banerjee S. Probiotics protect against gut dysbiosis associated decline in learning and memory. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2020;348(April):577390. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577390>
498. Zhai Q, Yang L, Zhao J, Zhang H, Tian F, Chen W. Protective effects of dietary supplements containing probiotics, micronutrients, and plant extracts against lead toxicity in mice. *Front Microbiol*. 2018;9(SEP):1–11.
499. Eddine D, Adli H, Benreguieg M, Brahmi M, Ziani K, Arabi W. THE THERAPEUTIC EFFECT OF A *Lactobacillus Rhamnosus* PROBIOTIC AGAINST CHRONIC LEAD-INDUCED NEUROTOXICITY IN DEVELOPING WISTAR RATS ( GESTATION AND LACTATION ) THE THERAPEUTIC EFFECT OF A *Lactobacillus Rhamnosus* PROBIOTIC AGAINST CHRONIC LEAD-INDUCED NEURO. *Fresenius Environ Bull*. 2023;32(May):2350–62.
500. Zhang Z, Li J, Jiang S, Xu M, Ma T, Sun Z, et al. *Lactobacillus fermentum* HNU312 alleviated oxidative damage and behavioural abnormalities during brain development in early life induced by chronic lead exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2023;251(November 2022):114543. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114543>
501. Durmaz S, Kurtoglu T, Barbarus E, Çetin NK, Yılmaz M, Rahman ÖF, et al. Probiotic *saccharomyces boulardii* alleviates lung injury by reduction of oxidative stress and cytokine response induced by supraceliac aortic ischemia-reperfusion injury in rats. *Brazilian J Cardiovasc Surg*. 2021;36(4):515–21.
502. Gupta N, Abd EL-Gawaad NS, Osman Abdallah SA, Al-Dossari M. Possible modulating functions of probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* in particulate matter-associated pulmonary inflammation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13(January):1–9.
503. Lutgendorff F, Trulsson LM, Van Minnen LP, Rijkers GT, Timmerman HM, Franzén LE, et al. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295(5):1–45.
504. El- Kewawy H. The protective effect of kefir as a probiotic on reproductive potential of male rats. *Bull Natl Nutr Inst Arab Repub Egypt*. 2018;51(1):39–68.
505. Aditi Ghosh. Evaluation of therapeutic efficacy of fecal microbiota transplantation on cadmium-

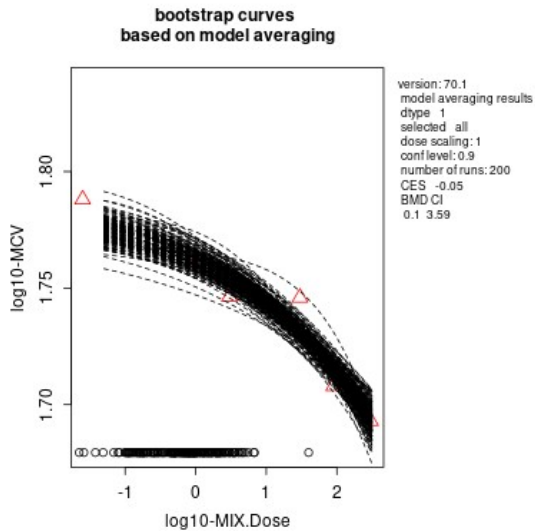
induced testicular degeneration in rats. Vol. 132001. 2023.

506. Ferreira GK, Carvalho-Silva M, Gonçalves CL, Vieira JS, Scaini G, Ghedim F V., et al. L-Tyrosine administration increases acetylcholinesterase activity in rats. *Neurochem Int* [Internet]. 2012;61(8):1370–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.09.017>
507. Long X, Wu H, Zhou Y, Wan Y, Kan X, Gong J, et al. Preventive Effect of *Limosilactobacillus fermentum* SCHY34 on Lead Acetate-Induced Neurological Damage in SD Rats. *Front Nutr*. 2022;9(April):1–16.
508. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res* [Internet]. 2018;1693:128–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>
509. Nimgampalle M, Yellamma K. Anti-Alzheimer properties of probiotic, *Lactobacillus plantarum* MTCC 1325 in Alzheimer's disease induced albino rats. *J Clin Diagnostic Res*. 2017;11(8):KC01–5.
510. Peng X, Meng J, Chi T, Liu P, Man C, Liu S, et al. *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 alleviates the learning and memory ability in aging rats by reducing mitochondrial dysfunction. *Exp Ther Med*. 2014;8(6):1841–6.
511. Baralić K, Živančević K, Bozic D, Đukić-Ćosić D. Probiotic cultures as a potential protective strategy against the toxicity of environmentally relevant chemicals: State-of-the-art knowledge. *Food Chem Toxicol*. 2023;172(December 2022).
512. Mirza Alizadeh A, Hosseini H, Mollakhalili Meybodi N, Hashempour-Baltork F, Alizadeh-Sani M, Tajdar-oranj B, et al. Mitigation of potentially toxic elements in food products by probiotic bacteria: A comprehensive review. *Food Res Int* [Internet]. 2022;152(7):110324. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110324>
513. Pop OL, Suharoschi R, Gabbianelli R. Biodetoxification and Protective Properties of Probiotics. *Microorganisms*. 2022;10(7):1–20.
514. Abdel-Megeed RM. Probiotics: a Promising Generation of Heavy Metal Detoxification. *Biol Trace Elem Res*. 2021;199(6):2406–13.
515. Karamese M, Aydin H, Gelen V, Sengul E, Karamese SA. The anti-inflammatory, anti-oxidant and protective effects of a probiotic mixture on organ toxicity in a rat model. *Future Microbiol*. 2020;15(6):401–12.
516. Virk MS, Virk MA, He Y, Tufail T, Gul M, Qayum A, et al. The Anti-Inflammatory and Curative Exponent of Probiotics: A Comprehensive and Authentic Ingredient for the Sustained Functioning of Major Human Organs. *Nutrients*. 2024;16(4).
517. Petrariu OA, Barbu IC, Niculescu AG, Constantin M, Grigore GA, Cristian RE, et al. Role of probiotics in managing various human diseases, from oral pathology to cancer and gastrointestinal diseases. *Front Microbiol*. 2023;14(January):1–23.
518. Feng P, Yang J, Zhao S, Ling Z, Han R, Wu Y, et al. Human supplementation with *Pediococcus acidilactici* GR-1 decreases heavy metals levels through modifying the gut microbiota and metabolome. *npj Biofilms Microbiomes*. 2022;8(1).
519. Bisanz JE, Enos MK, Mwanga JR, Chagalucha J, Burton JP, Gloor GB, et al. Randomized Open-Label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in Tanzanian pregnant women and school children. *MBio*. 2014;5(5).

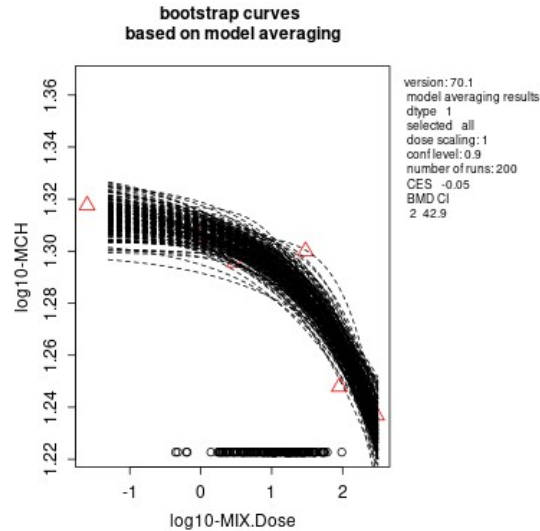
## 8. PRILOZI

### 8.1. PRILOG 1 - Dodatak rezultati

A

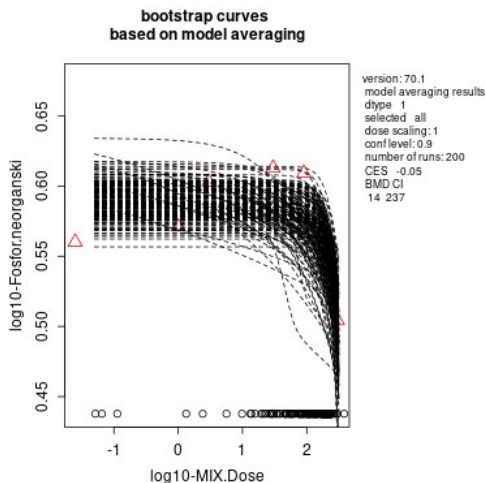


B



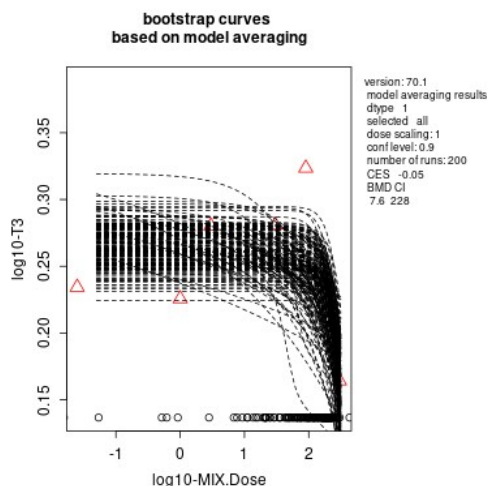
Slika 1. Grafički prikazi modelovanja odnosa arbitrarno odabrane eksterne doze smeše (MIX: Pb+Cd+Hg+As) u odnosu na primenjene opsege doza i: (A) nivo MCV (B) nivo MCH. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija i veličine kritičnog efekta (engl. critical effect size, CES) od 5%. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju. MCV: srednji korpuskularni volumen, MCH: srednji korpuskularni haemoglobin.

A



Slika 2. Grafički prikazi modelovanja odnosa arbitrarno odabrane eksterne doze smeše (MIX: Pb+Cd+Hg+As) u odnosu na primenjene opsege doza i: (A) nivo  $PO_4^{3-}$ . Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija i veličine kritičnog efekta (engl. critical effect size, CES) od 5%. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.  $PO_4^{3-}$ : neorganski fosfor.

A



**Slika 3. Grafički prikazi modelovanja odnosa arbitrarno odabrane eksterne doze smeše (MIX: Pb+Cd+Hg+As) u odnosu na primenjene opsege doza i: (A) nivo T3.** Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija i veličine kritičnog efekta (engl. critical effect size, CES) od 5%. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju. T3: trijodtironin.

**Tabela 1. Indeks oksidativnog stresa (OSI) u plazmi pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)**

OSI		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
	Medijana	0,1144	0,05243	0,08233	0,02571	0,01106*	0,1030 <sup>#ψ</sup>
	Opseg	(0,1056-0,1231)	(0,03368-0,1034)	(0,03693-0,1161)	(0,01627-0,05433)	(0,006144-0,0659)	(0,05704-0,2434)

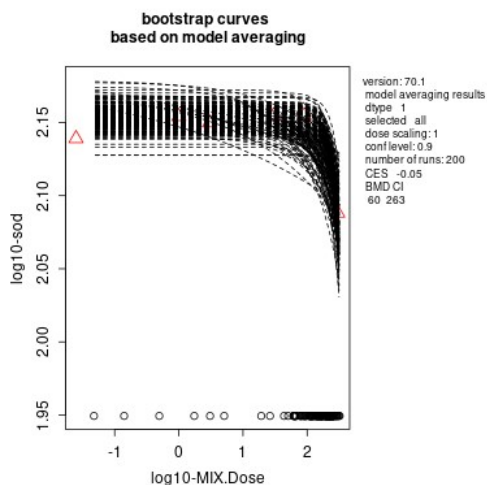
Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0.05 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0.05 (u poređenju sa MIX 1); #p < 0.05 (u poređenju sa MIX 3); ψp < 0.05 (u poređenju sa MIX 4).

**Tabela 2. Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u plazmi pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)**

		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
DS	Medijana	-0,01174	18,29**	13,27*	4,535*	6,903*	13,98**
	Opseg	(-0,4337-0,2431)	(9,025-26,27)	(2,197-19,94)	(2,703-18,12)	(5,49-8,832)	(5,99-23,26)
PS	Srednja vrednost	-0,1248	2,602	1,417	4,459	4,066	1,366
	SD	0,5362	2,138	0,9716	2,270	2,241	3,568
OXY skor	Medijana	0,06448	13,77**	11,53*	1,878 <sup>†</sup>	1,878	16,52*
	Opseg	(-0,5172-0,6499)	(7,858-23,2)	(1,394-18,07)	(-1,153-12,15)	(0,4586-6,21)	(3,175-21,39)

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (u poređenju sa kontrolom); <sup>†</sup> $p < 0.05$  (u poređenju sa MIX 1).

A



**Slika 4. Grafički prikazi modelovanja odnosa arbitrarno odabrane eksterne doze smeše (MIX: Pb+Cd+Hg+) u odnosu na primenjene opsege doza i: (A) nivo SOD u krvi.** Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija i veličine kritičnog efekta (engl. critical effect size, CES) od 5%. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju. SOD: aktivnost enzima superoksid dismutaze.

**Tabela 3. Indeks oksidativnog stresa (OSI) u jetri pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)**

OSI		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
	Medijana	0,07358	0,1672*	0,1860*	0,2669**	0,2098*	0,2400*
	Opseg	(0,04403-0,1171)	(0,119-3,057)	(0,1628-0,3109)	(0,1505-0,481)	(0,1947-0,4641)	(0,1184-0,3008)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (u poređenju sa kontrolom).

**Tabela 4. Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u jetri pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)**

		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
DS	Srednja vrednost	0,03741	0,9036	0,5691	1,359	0,9547	0,6824
	SD	0,7322	0,7027	0,6082	1,192	0,4606	0,7078

PS	Srednja vrednost	-0,09814	-0,3984	-0,5403	-0,5369	-0,8368**	-0,6138
	SD	0,2865	0,2344	0,2194	0,3926	0,2357	0,1527
OXY skor	Srednja vrednost	0,1356	1,302	1,109	1,895**	1,791**	1,296
	SD	0,5357	0,5559	0,6076	0,8614	0,4578	0,7783

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (u poređenju sa kontrolom).

**Tabela 5.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u bubregu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
DS	Srednja vrednost	-0,03705	-0,4317	0,5642	1,246	1,617	0,4970
	SD	0,6940	1,892	1,379	0,4008	0,6816	1,047
PS	Srednja vrednost	0,0002024	0,6375	1,149	0,9070	1,560	0,6332
	SD	0,6445	2,412	1,149	0,4562	0,5957	1,924
OXY skor	Srednja vrednost	-0,03725	-1,069	-0,5851	0,3389	0,05698	-0,1362
	SD	0,6363	0,7280	1,124	0,4314	0,9209	0,9598

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).

**Tabela 6.** Indeks oksidativnog stresa (OSI) u mozgu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

OSI		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
	Srednja vrednost	0,03882	0,2205	0,3530*	0,2891	0,8620****†††‡##	0,1907 <sup>ψψψ</sup>
	SD	0,01392	0,07579	0,08120	0,1332	0,4577	0,03712

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*\*\* p < 0,0001 (u poređenju sa kontrolom); ††† p < 0,001, †††† p < 0,0001 (u poređenju sa MIX 1); ‡ p < 0,01 (u poređenju sa MIX 2); ## p < 0,01 (u poređenju sa MIX 3); <sup>ψψψ</sup> p < 0,001 (u poređenju sa MIX 4).

**Tabela 7.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u mozgu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
DS	Srednja vrednost	-0.0002630	13.72*	19.87***	12.82*	13.66*	20.55***
	SD	0.1918	4.861	4.706	8.453	15.07	7.321
PS	Srednja vrednost	0.01865	6.199	7.055	8.844*	11.33**	16.95***††
	SD	0.7335	1.141	2.072	2.410	11.68	9.317
OXY skor	Srednja vrednost	-0.01891	7.520*	12.81***	3.972 <sup>‡</sup>	2.324 <sup>††</sup>	3.595 <sup>††</sup>
	SD	0.8779	5.216	3.534	6.847	4.086	7.050

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001 (u poređenju sa kontrolom); †p < 0,05, ††p < 0,01 (u poređenju sa MIX 1); ‡p < 0,05, ††p < 0,01 (u poređenju sa MIX 2).

**Tabela 8.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u plućima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
DS	Srednja vrednost	-1,580e-005	-0,7699	-1,103	-1,006	-0,2579	-0,07428
	SD	0,8414	0,7848	0,5624	0,7220	1,340	0,5798
PS	Srednja vrednost	0,003583	-0,1160	0,4657	0,04773	0,05542	-0,1942
	SD	0,6286	0,3414	0,4466	0,5656	0,8569	0,2325
OXY skor	Srednja vrednost	-0,003597	-0,6539	-1,568**	-1,054*	-0,3133 <sup>‡</sup>	0,1199 <sup>††</sup>
	SD	0,6209	0,5842	0,4283	0,8055	1,196	0,5591

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (u poređenju sa kontrolom); ‡p < 0,05, ††p < 0,01 (u poređenju sa MIX 2). #p < 0,05 (u poređenju sa MIX 3).

**Tabela 9.** Indeks oksidativnog stresa (OSI) u pankreasu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

OSI		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
	Medijana	0,1473	0,05076	0,7681 <sup>†</sup>	0,1047	0,2788	0,2468
	Opseg	(0,1463-0,1991)	(0,0494-0,117)	(0,172-1,364)	(0,09184-0,1175)	(0,03529-0,8279)	(0,075-0,4255)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal-Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6). †p < 0,05 (u poređenju sa MIX 1).

**Tabela 10.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u pankreasu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
DS	Srednja vrednost	-0,1007	0,7160	-0,4407	-0,3694	-0,2802	-0,2866
	SD	0,3532	0,7591	1,026	1,028	0,3714	0,2665
PS	Medijana	-0,3861	1,281	-0,4241	-1,130	-0,1127	-0,4981
	Opseg	(-0,6193-0,7166)	(-0,6867-2,005)	(-1,349--0,02002)	(-1,239-0,4129)	(-1,027-0,3943)	(-0,9881--0,2851)
OXY skor	Srednja vrednost	-0,06238	-0,1503	0,1918	0,1870	-0,004509	0,3038
	SD	0,7433	0,9033	1,014	0,4205	0,6062	0,6037

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).

**Tabela 11.** Indeks oksidativnog stresa (OSI) u testisima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

OSI		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
	Medijana	0,01126	0,06032	0,008832	0,02160	0,01686	0,009508
	Opseg	(0,008591-0,0128)	(0,01716-0,121)	(0,002787-0,02544)	(0,02006-0,05073)	(0,01019-0,01999)	(0,00541-0,01322)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).

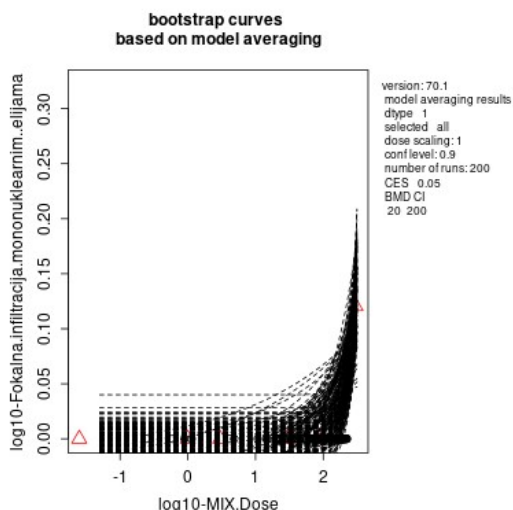
**Tabela 12.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u testisima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja rastućim niskim dozama smeše toksičnih metala (MIX)

		Kontrola	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
DS	Medijana	0,09396	-1,026	0,4422	-0,2512	0,9049	0,7277
	Opseg	(-0,4858-0,3435)	(-1,697-4,349)	(-0,6787-1,15)	(-1,426-1,787)	(-0,2605-3,374)	(-2,025-3,601)
PS	Srednja vrednost	-6,060e-005	-0,9390	-0,4038	-1,247	-0,1055	-0,1212
	SD	0,9061	0,4691	1,284	1,138	1,012	2,283
OXY skor	Medijana	0,002228	-0,1712	0,7534	0,8230	0,9224	0,6086
	Opseg	(-0,5917-0,4954)	(-0,5623-5,177)	(-0,06767-1,393)	(0,4932-2,536)	(0,0684-3,3)	(-1,1-3,158)

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg

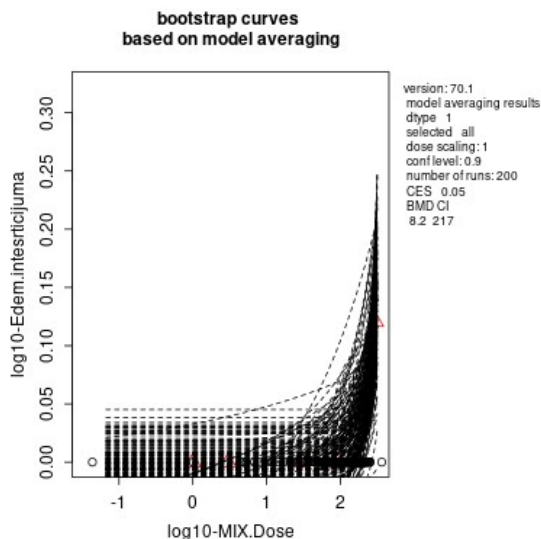
(neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; od najnižeg nivoa doze - MIX 1 do najvišeg nivoa doze - MIX 5 (mg/kg t.m./dan)(Pb: 0,003, 0,01, 0,1, 0,3, 1; Cd: 0,01, 0,03, 0,3, 0,9, 3; Hg: 0,0002, 0,0006, 0,006, 0,018, 0,06; As: 0,002, 0,006, 0,06, 0,18, 0,6).

A



**Slika 5. Grafički prikazi modelovanja odnosa arbitrarno odabrane eksterne doze smeše (MIX: Pb+Cd+Hg+As) u odnosu na primenjene opsege doza i: (A) fokalne infiltracije mononuklearnim celijama u jetri.** Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija i veličine kritičnog efekta (engl. critical effect size, CES) od 5%. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

A



**Slika 6. Grafički prikazi modelovanja odnosa arbitrarno odabrane eksterne doze smeše (MIX: Pb+Cd+Hg+As) u odnosu na primenjene opsege doza i: (A) edem intersticijuma u testisima.** Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija i veličine kritičnog efekta (engl. critical effect size, CES) od 5%. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

**Tabela 13.** Indeks oksidativnog stresa (OSI) u krvi pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

OSI		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
	Medijana	0,1401	0,2935	-0,2164	-0,2113
	Opseg	(-1,08-1,36)	(-0,769-2,882)	(-0,6618-0,1118)	(-0,3338-0,04935)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii*).

**Tabela 14.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u krvi pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
DS	Srednja vrednost	-0,07858	14,50**	7,089	9,720
	SD	0,4133	10,05	3,164	5,451
PS	Medijana	-0,2721	-0,07937	-2,427	-0,6572
	Opseg	(-0,5356-0,4332)	(-1,668-5,123)	(-4,195--0,6359)	(-1,277-0,7496)
OXY skor	Srednja vrednost	0,06572	13,13**	9,506*	10,06*
	SD	0,6044	9,770	1,224	5,434

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii*). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (u poređenju sa kontrolom).

**Tabela 15.** Indeks oksidativnog stresa (OSI) u jetri pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

OSI		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
	Medijana	0,07358	0,2400*	0,05678 <sup>##</sup>	0,07399 <sup>#</sup>
	Opseg	(0,04403-0,1171)	(0,1184-0,3008)	(0,05118-0,07524)	(0,04761-0,116)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii*). \*p < 0.05 (u poređenju sa kontrolom); #p < 0.05, ##p < 0.01 (u poređenju sa MIX 5).

**Tabela 16.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u jetri pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
DS	Srednja vrednost	0,03741	0,6824	-0,2756	0,3137
	SD	0,7322	0,7078	0,3379	0,4230
PS	Srednja vrednost	-0,09814	-0,6138	1,230 #####	2,027 #####+
	SD	0,2865	0,1527	0,7102	0,4946
OXY skor	Srednja vrednost	0,1356	1,296**	-1,505 #####	-1,713 #####
	SD	0,5357	0,7783	0,4048	0,5694

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii*). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 (u poređenju sa kontrolom); ##### p < 0.0001 (u poređenju sa MIX 5); + p < 0.05 (u poređenju sa MIX 5 + P).

**Tabela 17.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u bubregu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
DS	Srednja vrednost	-0,03705	0,4970	-0,02228	1,583
	SD	0,6940	1,047	1,550	0,6823
PS	Srednja vrednost	0,0002024	0,6332	-0,6032	2,382
	SD	0,6445	1,924	1,891	1,514
OXY skor	Srednja vrednost	-0,03725	-0,1362	0,5810	-0,7989 <sup>+</sup>
	SD	0,6363	0,9598	0,5098	1,174

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii*). <sup>+</sup>p < 0.05 (u poređenju sa MIX 5 + P).

**Tabela 18.** Indeks oksidativnog stresa (OSI) u mozgu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

OSI		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
	Medijana	0,03844	0,1737	0,4300***	0,1887*
	Opseg	(0,02626-0,05156)	(0,1652-0,2333)	(0,2137-0,8358)	(0,0954-0,2657)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii*). \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 (u poređenju sa kontrolom).

**Tabela 19.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u mozgu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
DS	Medijana	0,1021	21,21	22,88	25,69**
	Opseg	(-0,1955-0,1438)	(14,95-25,81)	(11,89-28,43)	(21,63-41,58)
PS	Srednja vrednost	0,01865	16,95*	13,53	24,44**
	SD	0,7335	9,317	6,941	13,30
OXY skor	Srednja vrednost	-0,01891	3,595	7,181	5,986
	SD	0,8779	7,050	10,75	8,434

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 \cdot 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii*). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (u poređenju sa kontrolom).

**Tabela 20.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u plućima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
DS	Srednja vrednost	-1,580e-005	-0,07428	0,1246	-3,385*****
	SD	0,8414	0,5798	1,334	0,6432
PS	Medijana	0,04905	-0,06429	-0,04628	-2,127
	Opseg	(-0,6144-0,5989)	(-0,4234--0,02998)	(-0,4039-0,4457)	(-2,385--1,612)
OXY skor	Srednja vrednost	-0,003597	0,1199	0,4550	-1,344
	SD	0,6209	0,5591	1,527	0,2904

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD))/medijana i opseg

(neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 * 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 * 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii*). \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001 (u poređenju sa kontrolom); ###p < 0,001 (u poređenju sa MIX 5); \*\*\*p < 0,001 (u poređenju sa MIX 5 + P).

**Tabela 21.** Indeks oksidativnog stresa (OSI) u pankreasu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

OSI		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
	Medijana	0,1473	0,2468	1,451	0,1425
	Opseg	(0,1463-0,1991)	(0,075-0,4255)	(0,7073-2,195)	(0,05536-1,821)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 * 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 * 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii*).

**Tabela 22.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u pankreasu pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
DS	Medijana	-0,2272	-0,3556	-0,6072	0,003134
	Opseg	(-0,4037-0,2656)	(-0,4984--0,005882)	(-0,8891-0,08172)	(-0,8372-2,186)
PS	Medijana	-0,3861	-0,4981	-0,3668	0,1914
	Opseg	(-0,7516-0,7166)	(-0,9881--0,2851)	(-1,12-0,9588)	(-1,093-3,804)
OXY skor	Medijana	0,1589	0,06154	-0,1961	-0,07583
	Opseg	(-0,7996-0,5642)	(-0,08118-0,931)	(-1,419-0,7504)	(-2,37-0,952)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 * 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 * 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomiscetes cerevisiae* var. *boulardii*).

**Tabela 23.** Indeks oksidativnog stresa (OSI) u testisima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

OSI		Kontrola	MIX 5	MIX 5 + P	MIX 5 + SB
	Srednja vrednost	0,01081	0,009378	0,008745	0,01184
	SD	0,002468	0,003905	0,006378	0,001965

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši

nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 * 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 * 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii*).

**Tabela 24.** Skor oksidativnog oštećenja (DS), skor antioksidativne zaštite (PS) i skor oksidativne ravnoteže (OXY skor) u testisima pacova nakon subakutnog (28 dana) oralnog izlaganja najvišoj dozi smeše Pb, Cd, Hg i As (MIX 5), MIX 5 i multikomponentnom probiotiku (MIX 5 + P) i MIX 5 i monokomponentnom probiotiku (MIX 5 + SB)

		<b>Kontrola</b>	<b>MIX 5</b>	<b>MIX 5 + P</b>	<b>MIX 5 + SB</b>
DS	Medijana	0,09396	0,7277	-1,053	0,4055
	Opseg	(-0,4858-0,3435)	(-2,025-3,601)	(-1,575--0,3284)	(-1,387-2,393)
PS	Medijana	-6,060e-005	-0,1212	-1,087	-0,1454
	Opseg	0,9061	2,283	0,7252	1,443
OXY skor	Medijana	0,002228	0,6086	-0,1209	0,2525
	Opseg	(-0,5917-0,4954)	(-1,1-3,158)	(-0,4162-0,763)	(0,09055-1,505)

Rezultati su prikazani kao medijana i opseg (neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test). MIX: Pb+Cd+Hg+As; najviši nivo primenjene doze smeše - MIX 5 (mg/kg t.m./dan) (Pb: 1; Cd: 3; Hg: 0,06; As: 0,6); P: multikomponentni probiotik ( $8,78 * 10^8$  CFU/kg/dan: *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* LP 6595 + *Lactobacillus plantarum* HEAL9); SB: monokomponentni probiotik – kvasac ( $5.16 * 10^8$  CFU/kg/dan *Saccharomisces cerevisiae* var. *boulardii*).