

**UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Departman za hemiju
Studijski program doktorske studije hemije**

Milena M. Krsmanović

**Uticaj intoksikacije teškim metalima (Cu, Cd, Pb) na aktivnost
oksono-reduktaza sa Mo kao mikroelementom**

-Doktorska disertacija-

Niš, 2013



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Милена М. Крсмановић
Ментор, МН:	Ружица С. Николић
Наслов рада, НР:	Утицај интоксикације тешким металима (Cu, Cd, Pb) на активност оксидо-редуктаза са Mo као микроелементом
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публиковања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2013
Издавач, ИЗ:	авторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/	8 поглавља; 201 страна, 174 цитата; 18 табела; 29 слика; 13 граф. приказа
Научна област, НО:	хемија, , бионеорганскa хемија
Научна дисциплина, НД:	неорганскa хемија, биохемија, токсикологија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> испитивања, тешки метали (Cu, Cd, Pb), липонска киселина, глутатион, ксантин оксидаза, ксантин дехидрогеназа, малондиалдехид, хиперурикемија
УДК	616-099 + [546.4 + 546.8] : 577.152.1 + 669.28
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Виваријум, биохемијска лабораторија Медицинског факултета у Нишу и лабораторија неорганске хемије Природно-математичког факултета у Нишу

Извод, ИЗ:

Путеви изложености утицају токсичних метала кадмијума (Cd), олова (Pb) и бакра (Cu) су врло различити од воде за пиће, преко ланца исхране до ваздуха.

У овој дисертацији извршена су *in vitro* испитивања ефекта токсичних метала (Cd, Pb и Cu) као и протективна улога суплемената α -липонске киселине и глутатиона, на активност ксантин оксидазе. Такође су вршена испитивања ефеката хроничне и акутне интоксикације тешких метала и протективна улога суплемената на концентрацију секундарног продукта липидне пероксидације MDA (малондиалдехида) и на активност ксантин оксидазе (ХО) и ксантин дехидрогеназе (XDН), као и у условима експерименталне хиперурикемије, у јетри и бубрегу. Студија је извршена на експерименталним животињама (Wistar албино пацови).

Резултати ове студије показују да тешки метали утичу на незнатно смањење активности ХО ($Pb^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$), и повећавају концентрацију малондиалдехида у јетри. Протективна улога α -липонске киселине је најизраженија код олова, а затим код кадмијума и скоро потпуно елиминише токсично дејство ових метала. Глутатион као суплемент елиминише токсично дејство олова и бакра. У условима експерименталне хиперурикемије, алопуринол као инхибитор ХО смањује активност исте и помера равнотежу система у корист XDН што смањује могућност за продукцију реактивних кисеоничних врста.

Датум прихватања теме, ДП:

11.07.2012. – Наставно–научно Веће факултета
10.09.2012. – Научно-стручно Веће Универзитета

Датум одbrane, ДО:

}

Чланови комисије,

Председник:

Члан:

Члан,

Члан,

Члан ментор:

Образац Q4.09.13 - Издање 1



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	monograph
Type of record, TR:	textual / graphic
Contents code, CC:	doctoral dissertation
Author, AU:	Milena M. Krsmanović
Mentor, MN:	Ružica S. Nikolić
Title, TI:	Influence of intoxication by heavy metals (Cu, Cd, Pb) on the activity of oxido-reductase with Mo as a trace element
Language of text, LT:	Serbian
Language of abstract, LA:	English
Country of publication, CP:	Serbia
Locality of publication, LP:	Serbia
Publication year, PY:	2013
Publisher, PB:	author's reprint
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD: (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendices)	8 chapters; 201 pages; 174 reference; 18 tables, 29 figures; 13 graphs
Scientific field, SF:	Chemistry, Bioinorganic chemistry
Scientific discipline, SD:	Inorganic chemistry, Biochemistry, Toxicology
Subject/Key words, S/KW:	In vitro and in vivo research, heavy metals (Cu, Cd, Pb), lipoic acid, glutathione, xanthine oxidase, xanthine dehydrogenase, malondialdehyde, hyperuricemia
UC	616-099 + [546.4 + 546.8] : 577.152.1 + 669.28
Holding data, HD:	library
Note, N:	Vivarium, Biochemical laboratory of the Medical Faculty in Nis and laboratory for inorganic chemistry of the Faculty of Science and Mathematics in Nis

Abstract, AB:	<p>Routes of exposure to the effects of toxic metals cadmium (Cd), lead (Pb) and copper (Cu) are varied in drinking water, via food chain, and through the air.</p> <p><i>In vitro</i> effects of toxic metals were performed in this dissertation (Cd, Pb and Cu) as well as the protective role of supplements α-lipoic acid and glutathione to the activity of xanthine oxidase. Also, we investigated the effects of chronic and acute toxicity of heavy metals and the protective role of supplements in concentration of secondary product of lipid peroxidation, MDA (malondialdehyde) and the activity of xanthine oxidase (XO) and xanthine dehydrogenase (XDH), in experimental conditions hyperuricaemia, in liver and kidneys. The study was conducted on experimental animals (Wistar albino rats).</p> <p>The results of this study indicate that heavy metals affect the slight reduction in activity XO ($Pb^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$), and increased concentrations of malondialdehyde in the liver. The role of α-lipoic acid was the most significant in lead and cadmium and it almost completely eliminates the toxic effects of these metals. Glutathione as a supplement eliminates the toxic effects of lead and copper. In terms of experimental hyperuricemia, allopurinol as an inhibitor of XO reduces the activity of the same system and shifts the balance in favor of XDH which reduces the production of reactive oxygen species.</p>								
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	11.07.2012. – Faculty Academic Board 10.09.2012. – University Academic Board								
Defended on, DE:									
Defended Board, DB:	<table border="0"> <tr> <td>President:</td><td></td></tr> <tr> <td>Member:</td><td></td></tr> <tr> <td>Member:</td><td></td></tr> <tr> <td>Member, Mentor:</td><td></td></tr> </table>	President:		Member:		Member:		Member, Mentor:	
President:									
Member:									
Member:									
Member, Mentor:									

Образац Q4.09.13 - Издање 1

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije rađen je u Laboratoriji za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu i Laboratoriji za neorgansku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Disertacija je urađena u okviru projekta TR 31060 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije.

Najsrdačnije se zahvaljujem mentoru, dr Ružici Nikolić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, na predloženoj temi doktorske disertacije, rukovođenju i izuzetnoj pomoći pri izradi iste.

Najtoplje se zahvaljujem dr Gordani Kocić, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Nišu, na stručnoj pomoći i konsultacijama oko realizacije pojedinih faza ovog rada.

Zahvaljujem se osoblju Laboratorije za biohemiju sa Medicinskog fakulteta u Nišu i Svetlani Stojanović, stručnom saradniku na pruženoj pomoći i saradnji

Zahvaljujem se svim kolegama iz Laboratorije za neorgansku hemiju sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu na pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem porodici za pruženu pomoć, podršku i razumevanje.

Sadržaj

1. Uvod	5
2. Teorijski deo	11
2.1.Biološki značaj d-metala	13
2.1.1. Biološki značaj bakra	15
2.1.2. Biološki značaj molibdena	18
2.2.Toksičnost teških metala	20
2.2.1. Toksičnost olova	21
2.2.2. Toksičnost kadmijuma	23
2.3. Antioksidansi u biološkim sistemima.....	26
2.3.1. Bioligandi.....	27
2.3.2.Glutation	28
2.3.3. Liponska kiselina	33
2.4. Slobodni radikali i mehanizam oksidativnog stresa	35
2.4.1. Lipidna peroksidacija.....	36
2.5. Purinske baze	39
2.5.2. Biosinteza purina	39
2.5.3. Razgradnja purinskih baza	40
2.6. Enzimi koji učestvuju u metabolizmu purinskih baza.....	41
2.6.1. Ksantin oksidaza	42
2.6.2. Ksantin dehidrogenaza.....	44
2.7. Alopurinol - inhibitor ksantin oksidaze.....	46
2.8. Hiperurikemija	47
2.9. Metode određivanja aktivnosti enzima.....	48
2.9.1. Spektrofotometrijske metode	48
2.9.2. Fluorimetrijske metode	49
2.9.3. Polarimetrijske metode	50
2.9.4. Viskozimetrijske metode.....	50
2.9.5. Hemijske metode	50
2.9.6. Radiohemijske metode.....	50

2.9.7. Hromatografske metode.....	51
3. Eksperimentalni deo	53
3.1. Program i metodika eksperimentalnog rada	55
3.2. <i>In vivo</i> ispitivanja.....	56
3.2.1. Intoksikacija teškim metalima i dodatak suplemenata.....	57
3.3. Preliminara ispitivanja lipidne peroksidacije, MDA	59
3.4. Tehnike i metode primenjene u procesu praćenja efekata intoksikacije teškim metalima	59
3.4.1. Uticaj temperature.....	59
3.4.2. Jedinice za izražavanje enzimske aktivnosti.....	61
3.5. Praćenje enzimske aktivnosti i određivanje vrednosti proteina	62
3.6. Hemikalije	64
3.7. <i>In vitro</i> ispitivanja.....	68
3.8. Merenje aktivnosti ksantin oksidaze u uslovima eksperimentalne hiperurikemije	69
3.9. Statistička analiza	69
4. REZULTATI I DISKUSIJA	71
4.1. Preliminarni rezultati ispitivanja toksičnog dejstva teških metala.....	73
4.2. Rezultati aktivnosti XO i XDH u <i>in vitro</i> uslovima	78
4.3. Rezultati <i>in vivo</i> ispitivanja.....	81
4.3.1. Rezultati merenja aktivnosti XO i XDH i vrednosti koncentracije proteina u prisustvu suplemenata u uslovima intoksikacije teškim metalima	81
4.3.2. Rezultati merenja aktivnosti XO i XDH i vrednosti koncentracija proteina u uslovima intoksikacije kadmijumom.....	83
4.3.3. Rezultati merenja aktivnosti XO i XDH i vrednosti koncentracija proteina u uslovima intoksikacije olovom	86
4.3.4. Rezultati merenja aktivnosti XO i XDH i vrednosti koncentracija protein u uslovima intoksikacije bakrom	89
4.3.6. Poredanje rezultata merenja aktivnosti XO/XDH jetre i bubrega u uslovima intoksikacije teškim metalima i protektivne uloge suplemenata (<i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> ispitivanja)	94
4.4. Merenje vrednosti proteina u ispitivanim organima.....	104

4.5. Rezultati merenja aktivnosti ksantin oksidaze i ksantin dehidrogenaze u uslovima eksperimentalne hiperurikemije	107
5. ZAKLJUČAK	111
6. SUMMARY	117
7. LITERATURA.....	123
8. PRILOG	137
9. Biografija i bibliografija.....	197

1. UVOD

Teški metali kao polutanti u radnoj i životnoj sredini su ozbiljan zdravstveni i ekološki problem. Putevi unosa Cd i Pb su od vazduha zagađenog produktima sagorevanja fosilnih goriva i cigaretног dima, do ambalaže za hranu koja je u nekoј fazi izrade bila u kontaktu sa ovim metalima. Iz atmosfere, zemljišta, voda (površinskih i podzemnih), Cd i Pb se unose i zadržavaju u biljkama, a dalje preko lanca ishrane i vode za piće dospevaju i u ljudski organizam. To nisu esencijalni metali, ali uneti u organizam mogu se naći u gotovo svim tkivima i organima sisara.

Kao metal sa kumulativnim dejstvom Pb je konkurentno esencijalnim metalima (Fe, Ca, Cu, Zn) za njihove brojne funkcije u organizmu. Oovo cirkuliše, najvećim delom, vezano za eritrocite, zatim za albumine plazme, a daleko manje vezano za niskomolekularне proteine i u jonskom obliku. Iz organizma se izlučuje preko urina, manje preko digestivnog trakta, a delom preko noktiju i kose.

Akutno trovanje kadmijumom kod laboratorijskih životinja dovodi do oštećenja jetre i testisa, dok hronično izlaganje dovodi do oštećenja bubrega, anemije, poremećaja imuniteta i oštećenja kostiju. Jedna od osnova kadmijumske toksičnosti je i njegov uticaj na enzimske sisteme ćelija, zbog zamene njihovih metalnih jona (uglavnom Zn^{2+} i Cu^{2+}) u metaloenzimima i veoma jak afinitet prema biološkim strukturama koje sadrže -SH grupe.

Bakar je esencijalni biometal za ljude, životinje i neke biljne vrste. Organizam odraslog čoveka sadrži 100-150 mg bakra, u većim količinama on postaje toksičan za organizam. Raznovrsne funkcije u organizmu vezane su za njegovu polivalentnost i sposobnost da gradi

stabilne kompleksne fragmente preko O-, N- ili S- donor atoma bioliganada delova biomolekula (proteina, enzima, nukleinskih kiselina, blokira –SH reaktivne centre nekih enzima).

Prema fizičko-hemijskim osobinama Cd i Pb lako inhibiraju fiziološku aktivnost enzima sa aktivnim –SH grupama, o čemu ima literaturnih podataka. Jedan od oblika toksičnog dejstva kadmijuma je njegov uticaj naenzimske sisteme ćelija i zamenu jona Zn^{2+} i Cu^{2+} u njima zbog velikog afiniteta za vezivanje preko sulfhidrilnih grupa. U literaturi nema dovoljno podataka o uticaju ovih metala na aktivnost enzima koja nije vezana za prisustvo –SH grupa.

Molibden kao mikroelement ima veoma važnu ulogu, međutim mnogo je nepoznanica o detaljima strukture i funkcije Mo-enzima. Glavni razlozi za to su veoma nizak sadržaj Mo (samo oko 0.01 %) i složenost strukture enzima. To su obično mnogi funkcionalni enzimi kod kojih se četiri funkcije - redukcija, oksidacija, prenos elektrona i akumulacija energije - mogu pojavljivati istovremeno, pri čemu komponenta koja sadrži molibden predstavlja komponentu elektron-transportnog lanca.

Ksantin oksidaza (XO) (EC 1.1.3.22) i ksantindehidrogenaza spadaju u grupu enzima koji sadrže pterin-molibdenski kofaktor, kod kojih Mo nosi S-ligande nepostojane prema cijanidima (S^{2-} ligand u obliku $Mo=S$).

Ksantin oksidaza katalizuje oksidaciju hipoksantina ksantina, jedinjenja koja nastaju deaminacijom adenina i guanina iz nukleinskih makroenergetskih jedinjenja i koenzimma, uz nastajanje urata (mokraćne kiseline). Pored toga ona katalizuje i oksidaciju aldehida u karboksline kiseline.

Opšta molekulska struktura ksantin dehidrogenaze (XDH) iz različitih izvora su veoma bliske svojstvima XO iz mleka, ali je specifičnost ovih enzima prema akceptorima elektrona veoma različita. Ksantin dehidrogenaza ne dopinosi stvaranju reaktivnih kiseoničnih vrsta i slobodnih radikala, zato je veoma bitna konverzija XDH u XO sa oštećenjima tkiva kiseoničnim radikalima.

Liponska kiselina (LA) je ciklični disulfid i ista je preko karboksilne grupe povezana sa proteinskim delom enzima kao amid. Učestvuje, pre svega, u oksidativnoj dekarboksilaciji 2-oksikiselina, a aktivni –SH centri u redukovanim oblicima su mesta na koja se lako vežu teški metali. Poznato je njeno antioksidativno dejstvo iz literaturnih podataka

Glutation kao helatni agens sadrži tiolnu grupu preko koje formira merkaptidnu vezu sa jonima teških metala: Zn, Cu, Cd, Pb i Ag. Najverovatnija struktura kompleksa glutationa sa

jonima teških metala je $M(GSH)_2$. Stabilnost kompleksa glutationa sa jonima teških metala zavisi od njihove veličine, kiselo-baznih osobina i afiniteta metalnih jona prema tiolnoj grupi koji opada u nizu: $Cd^{2+} > Pb^{2+} > Cu^+/Cu^{2+}$.

Alopurinol (3,5,7,8-tetrazabiciklo[4.3.0]nona-3,5,9,-trien-2-on) redukuje sintezu mokraćne kiseline inhibicijom ksantinoksidaze. On predstavlja analog hipoksantina i inhibiše enzime uglavnom putem kompeticije za supstrat. Alopurinol se konvertuje do aloksantina pomoću ksantinoksidaze. Aloksantin je metabolit koji ostaje u tkivu znatan deo vremena, i efikasan je nekompetitivni inhibitor enzima. Ovakon snažan inhibitor našao je kliničku primenu (farmakološku) u lečenju primarne i sekundarne hiperurikemije kao izvorni lek.

U ovoj disertaciji bila je ispitivana aktivnost XO i XDH, enzima sa Mo u uslovima hronične intoksikacije teškim metalima, kao i protektivna uloga suplemenata, liponske kiseline i glutationa, u uslovima hronične intoksikacije subletalnim dozama teškim metalima Cd, Pb i Cu. Ispitivana je i aktivnost XO/XDH u uslovima eksperimentalne hiperurikemije kao i uticaj inhibitora (alopurinola).

Model sistem za ispitivanje uticaja izloženosti bakru, olovu i kadmijumu je studija na belim pacovima Wistar soja, ženskog pola, starosti 6 nedelja, težine 230 ± 30 g. Eksperimentalne životinje su gajene u laboratorijskim uslovima na normalnom režimu ishrane u vivarijumu Medicinskog fakulteta u Nišu, u skladu sa pravilima Lokalnog etičkog komiteta.

Rad na doktorskoj disertaciji je obuhvatio sledeće faze:

- gajenje eksperimentalnih životinja i njihovu hroničnu intoksikaciju u određenim vremenskim intervalima u periodu od 3 nedelje,
- pripreme biomaterjala za ispitivanje i to jetre, bubrega, pankreasa i mozga (dekapsuliranje, konzervacija, čuvanje) i pravljenje homogenata, od kojih se uzimaju alikvoti za analize,
- meranje aktivnosti ksantinoksidaze spektrofotometrijski, koja se bazira na merenju količine oslobođene mokraćne kiseline i supstrata ksantina.
- izračunavanje aktivnosti ksantindehidrogenaze na bazi spektrofotometrijskih merenja,
- *in vitro* ispitivanja aktivnosti ksantin oksidaze u uslovima intoksikacije teškim metalima (Pb, Cd i Cu),
- Ispitivanje aktivnosti enzima XO/XDH u uslovima eksperimentalne hiperurikemije.

Rezultati istraživanja u okviru ove disertacije doprinose razjašnjavanju mehanizma toksičnog dejstva teških metalima (Pb, Cd i Cu) merenih preko aktivnosti enzima sa Mo u aktivnom centru, kao i mogući mehanizam protektivnog dejstva potencijalnih suplemenata α -liponske kiseline i glutationa).

Dobijeni rezultati istraživanja doprinose da se detaljnije objasne toksični efekti hronične intoksikacije olovom i kadmijumom i akutne intoksikacije subletalnim dozama bakra preko aktivnosti enzima oksidoreduktata (XO/XDH) i protektivna uloga suplemenata liganada sa prisutnim sulfidnim grupama (mekih Lewiss-ovih baza) koje stupaju u interakcije sa jonima metala, mekih Lewis-ovih kiselina.

2. TEORIJSKI DEO

2.1.Biološki značaj d-metala

Hemijски процеси у јивој природи vezani су за mnoge metale, bimetale. Uloga Na, K, Mg, Ca i Fe je odavno poznata ali su za живот потребни i mnogi drugi metali, bakar, molibden, kobalt. Životno važni procesi u јивом свету odvijaju se uz učešće brojnih enzima u kojima su biometali, joni d-elemenata, prisutni u tragovima, vezani preko biomolekula u obliku kompleksnih fragmenata makromolekulskih čestica.

Joni ovih metala imaju različitu postojanost i različito su stabilizovani u odnosu na uslove sredine. Joni d-metala, kao što su: Cu²⁺, Co²⁺ i drugi su slabo rastvorni u baznoj sredini i u slabo alkalnim tečnostima целиja ili krvi, nalaze se kao kompleksni joni značajni za odvijanje vitalnih funkcija na molekularnom nivou.

Ulogu liganda u organizmu ima voda, neki neorganski anjoni (Cl⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻, PO₄³⁻) koji se mogu naći slobodni ili vezani za složene biomolekule, biopolimere od kojih su najvažniji polisaharidi, proteini, nukleinske kiseline, lipidi, porfirini. Svojstvo bioliganada mogu imati različiti koenzimi, vitamini i drugi organski molekuli koji učestvuju u životnoj aktivnosti организма (askrobinska kiselina, riboflavin, nikotinamid, biotin, liponska kiselina i drugi). Bioligandi ostvaruju veze sa metalima preko atoma azota, kiseonika ili sumpora. Donor atomi liganada se oko jona metala u prostoru raspoređuje na strogo određeni način i zavisno od uslova (pH-sredine, koncentracije reaktanata, prisutnih elektrolita, broja d-elektrona jona metala), grade asocijacije različite geometrijske strukture. Prema vrednostima koordinacionog broja d-metala, ako se posmatra prva koordinaciona sfera metala, asocijata M-donor atomi bioliganada, formirani kompleksi su tetraedarske, kvadratno-planarne, kvadratno piramidalne ili oktaedarske strukture, koja je retko pravilna, a najčešće je deformisana.

Helatacija je veoma raširena pojava u biološkim sistemima i ima veliki biohemijski značaj. Helatni kompleksi su stabilniji i ta stabilnost raste sa porastom broja prstenova. Sposobnost biometala da grade helatne komplekse od velikog je značaja za njihovu resorpciju i transport u organizmu, kao i za njihovu fiziološko-biološku aktivnost, kao u slučaju detoksikacije.

Neki makrociklični ligandi su u izvesnoj meri selektivni u odnosu na jone metala, što je povezano sa elektronskim karakteristikama njihovih donor atoma (N, S, O) sa jedne strane i brojem d-elektrona jona metala i njegovom veličinom sa druge strane.

U biološkim sistemima d-metali se prevashodno nalaze kao integralna komponenta metaloporfirina i enzima. Rezerve biometala se u ljudskom organizmu popunjavaju preko hrane i vode koju čovek svakodnevno unosi, a samo u izuzetnim slučajevima neophodno je unošenje posebnih farmaceutskih preparata sa nekim bioelementom u hemijskom obliku koji organizam može da usvoji (R. Nikolić i sar., 2011).

Tabela 2.1. Prosečan sadržaj i neka od uloga d-elemenata u organizmu*

Element	Sadržaj	Neke od funkcija i najznačajniji enzimi
Fe	4 g	Transport kiseonika, transport elektrona, kataliza oksido-redukcionih reakcija i dr./peroksidaze i katalaze
Zn	3 g	Kofaktor hidrolaza i enzima koji učestvuju u transkripciji RNK i DNK/ karboksipeptidaza
Cu	0,10-0,15 g	Transport kiseonika, transport elektrona, kataliza oksido-redukcionih reakcija/superoksidizmutaza
Co	1 mg	Metilovanje, demetilacija/ metiltransferaza i superoksidizmutaza
Mo	< 1 mg	kataliza oksido-redukcionih reakcija/ ksantin oksidaze, sulfit oksidaze, DMSO reduktaze
Mn	10-20 mg	Kofaktor enzima katalaze i u metabolizmu ugljenih hidrata
V	<< 1 mg	Katalizuje oksidaciju hlorida/vanadijum-hloroperoksidaza
Ni	<< 1 mg	Katalizuje hidrolizu uree/ureaza

*Računato na masu odraslog čoveka od 70 kg

2.1.1. Biološki značaj bakra

Bakar ima veoma važnu ulogu u biološkim procesima živih organizama i to u vezivanju kiseonika, redoks procesima, elektron-transfer procesima i ulazi u sastav više od 15 enzima. Za niže organizme jedinjenja bakra su otrovna. On ima baktericidno dejstvo jer je kao težak metal irreverzibilno taloži proteine. Na rast viših biljaka utiče povoljno jer stimuliše sintezu hlorofila. Kod nižih životinjskih organizama, u procesu prenosa kiseonika učestvuje pigment hemocijanin sa Cu(I)-jom kao aktivnim centrom.

Čovek je uticaju bakra izložen putem kontakta sa vazduhom, vodom i zemljištem, i to preko respiratornog sistema udisanjem, preko digestivnog trakta hrana i voda i preko kože. Veći deo apsorpcije bakra je putem tankog creva i želuca (Turnlund i sar., 1997). Bakar kao esencijalni element u čovekovom organizmu nalazi se u malim količinama (75-150 mg) u različitim ćelijama i tkivima, sa najvećom koncentracijom u jetri, bubrežima, slezini, srcu, plućima, želucu, kosi i noktima (Turnlund i sar., 1998).

Raspoloživost bakra kod odraslih ljudi iznosi oko 80 mg. Resorbuje se u želucu i tankom crevu, u kompleksu sa aminokiselinama (histidin) ili malim peptidima (Pickard i sar., 1980). Za resorpciju bakra iz gastrointestinalnog trakta potreban je jedan specifičan mehanizam zbog toga što je jon bakra (Cu^{2+}) nerastvorljiv. Jedna neidentifikovana niskomolekulska supstanca iz želudačnog soka stvara kompleks sa Cu^{2+} koji je rastvorljiv na pH intestinalne tečnosti. U ćelijama sluznice tankog creva bakar se veže za niskomolekulske protein metalotionein, koji vezuje metale. Potom bakar ulazi u plazmu gde se veže za aminokiseline, naročito histidin i serum albumin (Turnlund i sar., 1998). Organizam odraslog čoveka sadrži 100-150 mg bakra, u većim količinama on postaje toksičan za organizam. Koncentracija bakra u serumu zdravih osoba iznosi od 11-20 $\mu\text{mol/l}$. Gotovo celokupna količina bakra u telu je vezana za proteine, tako da je koncentracija slobodnih bakarnih jona veoma niska, osim ako nema nekih drugih poremećaja u organizmu. Smatra se da čak 35% populacije ne unosi dovoljne količine bakra ishranom. Preporučen dnevni unos bakra je oko 2 mg (Tasić i sar., 2004).

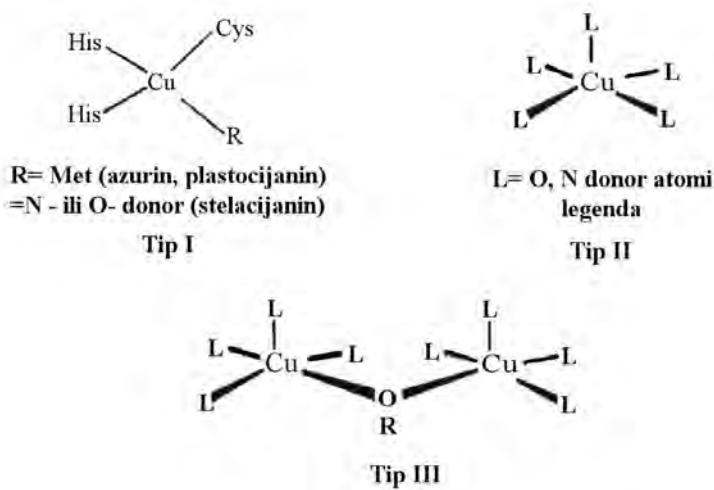
Raznovrsna uloga ovog biometala u živim organizmima vezana je za njegovu polivalentnost, kao i za sklonost njegovih jona da grade kompleksna jedinjenja. Cu(I)-jon se dobro vezuje sa ligandima preko -SH grupa i N-atoma imidazolovog prstena histidina iz

proteina. Jon Cu(II) ima veliki afinitet za kvadratno-planarnu koordinaciju Cu-N sa azotom iz -NH₂ grupa amino kiselina, proteina, RNK i DNK.

Bakar je aktivni centar brojnih metaloenzima i to:

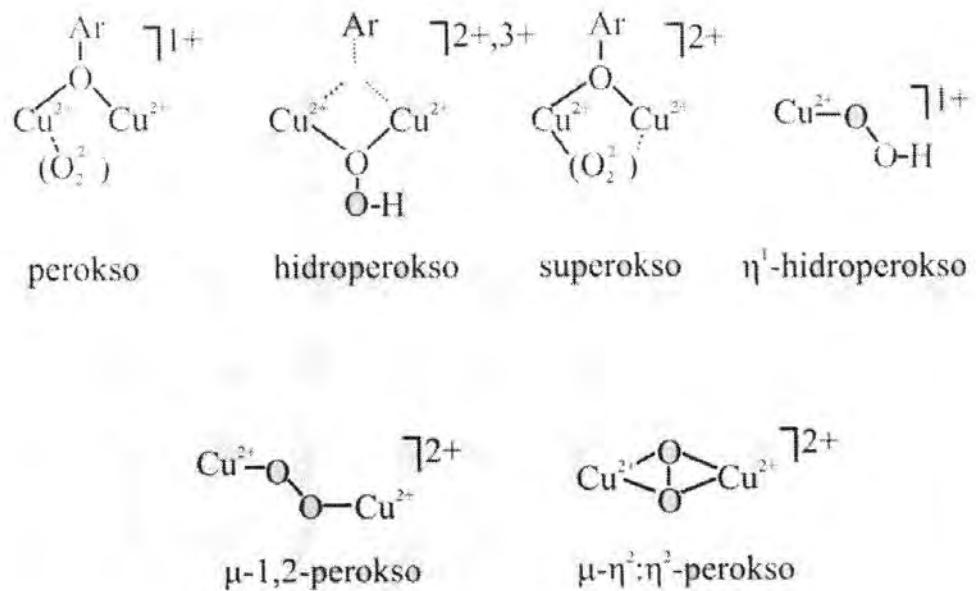
- U enzimima za transport elektrona (azurin, plastocijanin)
- U enzimima koji učestvuju u procesima oksidacije (tirozinaza, askorbat oksidaza, fenolaza)
- U enzimima za transport kiseonika (hemocijanin).

U enzimskim sistemima bakar može biti prisutan u deformisanoj Td koordinaciji preko N- i S-donor atoma biomolekula (tip I), u trigonalno bipiramidalnoj koordinaciji (tip II) i kao binuklearni centar Cu(II)-jona sa koordinacionim brojem 5 i kiseonikom kao most ligandom (tip III), slika 2.1. Ova klasifikacija je izvršena prema spektroskopskim podacima dobijenim iz VIS, UV i ESR spektara.



Slika 2.1. Tipovi aktivnih Cu-centara u enzimima sa odgovarajućom geometrijskom strukturuom (I,II, III).

Bakar je aktivni centar u enzimima oksidazama i oksigenazama pošto ima sposobnost da reverzibilno vezuje različite kiseonične ligande, slika 2.2. Bakar jon može da veže kiseonik, zatim peroksidni jon (O₂²⁻) kao monodentatni i bidentatni ligand, superoksidni jon (O²⁻), hidroperoksidni (HO₂⁻) što je detektovano u različitim fazama katalitičke aktivnosti određenih enzima.



Slika 2.2. vezivanje različitih kiseoničnih liganada za Cu-aktivni centar enzima

Različiti fragmenti enzima sa bakrom u kojima jedno koordinaciono mesto zauzima kiseonik u mononuklearnim, odnosno dva u binuklearnim kompleksima postoje u tirozinazi, catehol oksidazi tzv. „multibakaroksidazama“ koje sadrže veći broj Cu centara, tipa I, II, III u istom molekulu.

2.1.2. Biološki značaj molibdена

Ukupan sadržaj molibdена u Zemljinoj kori je $\sim 10^{-4}$ %. Najznačajniji minerali molibdена su molibdenit (MoS_2) i molibdati u obliku minerala vulfenita (PbMoO_4 i MgMoO_4) (Nikolić, 2001). To je prelazni metal koji se prema valentnoj elektronskoj konfiguraciji $\text{Mo}:[\text{Kr}] 5s^1 4d^5$ svojim jedinjenima javlja u različitim oksidacionim stanjima: +2, +3, +4, +6. Od ovih jedinjenja, najvažnija su ona sa oksidacionim stanjem +6 (Filipović i Lipanović, 1982).

Molibden je esencijalni mikroelement. Funkcija molibdена je vezana za više metaloenzima, uključujući ksantin oksidazu, aldehid oksidazu, i sulfat oksidazu (Hurley i sar., 1989). Sastojak je enzima nitratreduktaze, koji učestvuje u redukciji nitrata do amonijaka, koji učestvuju u sintezi proteina u biljkama. Molibden omogućava oksidaciju ksantina u purine u mleku i jetri.

Višak molibdена unet hranom u organizam dovodi smanjenja koncentracije nekih mikroelemenata u organizmu, kao sto su gvožđje, bakar, cink. Antagonističko delovanje je naročito izrazeno između bakra i molibdена u procesu apsorpcije u epitelu digestivnih organa uz neophodno prisustvo neorganskih sulfata. Referentne vrednosti Mo u organizmu su 1-15ng/mL za krv, 18ng/mL za eritrocite, 0,06-0,2 $\mu\text{g}/\text{g}$ za kosu, 10-16 $\mu\text{g}/\text{L}$ za urin (Tietz, 1987)

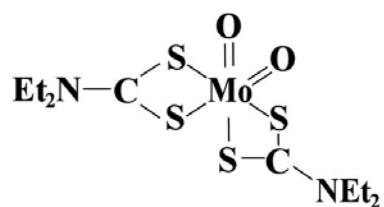
U praksi nije primećeno postojanje problema nedostatka problema u prirodnim uslovima ishrane, ni kod čoveka ni kod životinja. Međutim, veće koncentracije molibdена dovode do trovanja, koje se manifestuju u depresiji porasta i gubitka telesne mase, anemiji i depigmentaciji dlake (Obračević, 1990; Ensminger i sar., 1996) Toksičnost molibdена zavisi od odnosa Cu i Mo u obroku ali i od formi jedinjena u kojoj se nalazi Mo. Efekti toksičnosti Mo su verovatno u vezi sa smanjenjem metabolizma Cu (Hurley i sar., 1989). Količina Mo u hrani biljnog i životinjskog porekla zadovoljava čovekove potrebe u ovom esencijalnom elementu. Zbog toga se u praksi ne postavlja pitanje nedostatka već viška Mo u ishrani. Količina Mo u biljkama zavisi od vrste biljaka, uslova gajenja i geohemijskih parametara. Molibden igra važnu ulogu u azotnom metabolizmu biljaka, u procesu fiksacije azota, azotofiksacionim bakterijama. Pri nedostatku Mo u listovima biljaka se nakupljaju nitrati i sinteza proteina je oslabljena.

Molibden je biometal među metalima II prelazne serije. Uloga molibdена u biokatalizatorima zasnovana je na njegovoj sposobnosti da menja stepen oksidacije.

Enzimi molibdена mogu se podeliti u tri grupe:

1. Ksantin oksidaze
2. Sulfit oksidaze
3. DMSO reduktaze.

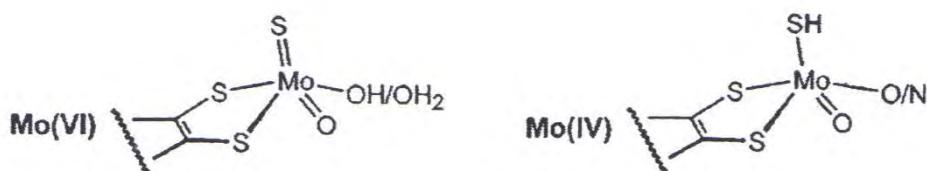
Model sistem za proučavanje bioloških funkcija ovog mikroelementa su različiti kompleksi Mo (VI) sa karboksilatnim anjonima i ditiokarbamatom koji su stabilni i lako dostupni jer je izvesno da je u metalo-enzimima Mo-jon vezan bar sa jednim atomom sumpora u prvoj koordinacionoj sferi (slika 2.5.)



Slika 2.5. Struktura $[\text{MoO}_2(\text{dtc})_2]$ kompleksa najpogodnijeg model sistema za ispitivanje enzima

Bezobzira na važnu ulogu molibdena kao mikroelementa, mnogo je nepoznanica o detaljima strukture i funkcije Mo-enzima. Glavni razlog za to su veoma nizak sadržaj Mo (samo oko 0.01%) i složenost strukture enzima. To su obično mnogo funkcionalni enzimi kod kojih se četiri funkcije, redukcija, oksidacija, prenos elektrona i akumulacija energije, mogu pojavljivati istovremeno, pri čemu komponenta koja sadrži Mo predstavlja komponentu elektron transportnog lanca (Boudin, 1978).

Aktivno mesto ovih enzima u oksidativnoj formi sadrži Mo (VI) dok u redukovanoj formi Mo (IV). Enzimi iz grupe oksidaza sadrže MoCo (molibden-piranopterinditiolat) – kofaktor, koji gradi petočlani 1,2 – ditiolatni helatni prsten sa cis-Mo (VI) OS grupom. Enzimi ove grupe kao što su aldehid oksidoreduktaza i ksantin oksidaza –dehidrogenaza katalizuju hidroksilaciju ugljenikovih centara, dok ugljenik monoksid dehidrogenaze katalizuju oksidacijom CO do CO_2 . Struktura ovih enzima sa prvom koordinacionom sferom molibdena prikazane su na slici 2.3.



Slika 2.3. Primeri aktivnih centara nekih enzima sa Mo, oksidaza/reduktaza

2.2.Toksičnost teških metala

Metalni koji imaju zapreminsку masu veću od 5 g/cm^3 svrstavaju se u grupu teških metala. Teški metali (olovo, kadmijum i bakar) su široko rasprostranjeni u životnoj i radnoj sredini (Walker i sar., 1995).

Životinje i ljudi dolaze u kontakt sa teškim metalima pre svega preko lanca ishrane ali i preko vazduha. Pri normalnim uslovima postoje tri načina ulaska teških metala u organizam: preko kože, preko gastrointestinalnog trakta i preko respiratornog trakta.

Za resorpciju teških metala iz vazduha najznačajniji je unos preko respiratornog trakta. Teški metali se inhalacijom unose u obliku aerosola ili pare u pluća gde se apsorbuju u krvotok. Putem kontaminirane hrane teški metali dospevaju u digestivni trakt, zatim apsorpcijom prelaze u krv i u pojedine organe gde se deponuju (npr. jetra, pankreas). Resorpcija preko kože se odvija prelaskom teškog metala iz vazduha na kožu i prolaskom kroz epidermis ili kroz folikule korena dlake ili kanale lojnih žlezda.

Teški metali se deponuju u ciljnim organima, kao što su, kosti, bubrezi, jetra ili mozak. Deo olova i kadmijuma se izlučuju preko respiratornog trakta, pljuvačnih žlezda, neki deo putem kože, znojnih i lojnih žlezda, a najznačajnije količine teških metala se izlučuju preko urina i digestivnog trakta.

Veliki značaj za prooksidativni efekat imaju metali kadmijum (Cd), olovo (Pb), živa (Hg), hrom (Cr), nikal (Ni), al i biometali, kao što su bakar (Cu), gvožđe (Fe), zink (Zn), mangan (Mn), kobalt (Co) i selen (Se). Toksično dejstvo teških metala je u tome što stimulišu formiranje slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta i biomolekula u organizmu što uzrokuje oksidativni stres i dovodi do lipidne peroksidacije membrane čime se narušava njena funkcionalnost i selektivnost pri transportu materija. Na taj način mogu da izazovu oštećenje ćelija, funkcije enzima ili genetičkog materjala (DNK) (David, 2001). Smatra se da teški metali predstavljaju kontinuiranu opasnost kao karcinogeni za organizam ljudi (Kokilavani, 2005).

Terapija za uklanjanje teških metala iz organizma ljudi je tzv. helataciona terapija koja se bazira na koordinacionoj sposobnosti jona metala sa jedne strane i posedovanja donor atoma bioliganda (O, N, S) preko kojih se formiraju stabilni asocijati tipa kompleksa i tako značajno smanjuje njihovo toksično dejstvo. Nastali produkti se mogu preko telesnih tečnosti eliminisati iz

organizma. Dobri helatori su vitamin C, E i A, α -liponska kiselina, glutation i drugi biomolekuli koji kao antioksidansi vezuju teške metale i time povećavaju zaštitu od oksidativnog stresa.

2.2.1. Toksičnost olova

U prirodi se olovo pretežno nalazi u obliku sulfidnih, karbonatnih i minerala galenita, cerusita i anglezita tako da zemljišta koja su nastala raspadanjem ovih minerala mogu sadržati veću koncentraciju olova. Vrlo često se pojavljuje u rudama zajedno s cinkom. Prosečne koncentracije olova u zemljištu su između 15 i 25 mg/kg (Radojević i sar., 1999). Olovo kao polutant se može detektovati u svim fazama životne sredine i biološkim sistemima. Od davnina je poznato toksično dejstvo olova u životnoj i radnoj sredini.

Svake godine industrija proizvodi oko 2,5 miliona tona olova u celom svetu. Stanovnici velikih gradova su pojačano izloženi štetnom dejstvu ovog metala koji danas predstavlja ključan ekološki problem. Akutno trovanje olova u radnoj sredini postaje važno pitanje, zbog poboljšanja uslova rada i zaštite osoba od izvora izloženosti ovog metala (Tong i sar., 1999).

Zagadjenje olovom je “bolest” životne sredine zbog njegove rastvorljivosti, pokretljivosti i akumulacije u zemljištu (Goyer, 1997). Glavni putevi unosa olova u organizam su respiratorni trakt, putem kože i digestivni trakt (Fischbein, 1992). Olovne boje su u 90% slučajeva uzroci trovanja kod dece koja se igraju igračkama obojenim tim bojama (Glotzer, 1994).

Olovo se najčešće unosi prljavim rukama, tok istovremenog jela i pušenja, iako je udisanje olovne prašine, dima i para opasnije. Unošenje olova preko kože je moguće samo kod tetraetil olova, koji se dodaje kao antidentalator benzину (etilizirani benzin). Mnogo važniji put apsorpcije olova je preko respiratornog trakta. Uneto olovo ovim putem direktno ulazi u sistemsku cirkulaciju. Cirkuliše najvećim delom vezano za eritrocite, manjim delom se vezuje za albumine plazme, a najmanje je u jonskom obliku ili vezano za niskomolekulske proteine. Deponuje se najvećim delom u kostima, zatim u jetri, bubregu, slezini, nervnom tkivu i mišićima. Iz organizma se izlučuje najvećim delom urinom, manje preko sluzokože digestivnog trakta, preko žući, kose, noktiju, znoja i mleka. Koncentracija olova u krvi od 60 $\mu\text{g}/\text{dL}$ je tokom šezdesetih godina smatrana bezopasnom. Vremenom, proučavanjem toksičnih efekata olova, prihvatljiv sadržaj u krvi je smanjen na 25 $\mu\text{g}/\text{dL}$ pa zatim i na 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 1991. god. Bez obzira na ove izmene, subklinički simptomi izloženosti olovu se javljaju i pri njegovom sadržaju manjem

od 10 µg/dL. Međutim “bezopasan” nivo olova u organizmu još uvek nije definisan (Ahamed, 2007).

Dnevne količine unetog olova, oralno i inhalacijom, mogu biti i oko 0,3 mg. Iste se delom eliminišu iz organizma ekskrecijom ali i akumuliraju, tako se u krvi normalno može naći oko 250 µg/dm³. Porast nivoa ovog metala u krvi je dalje umereno rizičan (250-490 µg/dm³), visokorizičan (500-690 µg/dm³) i urgentan, sa više od 700 µg/dm³ telesne tečnosti (Munoz i sar., 2006). Oovo nije esencijalni metal, ali uneto u organizam može se naći u gotovo svim tkivima i organima sisara. Nakon unošenja u organizam oovo ispoljava toksični efekat na jetru, bubrege i mozak, koji se i smatraju ciljanim organima za njegov uticaj (Sharma i sar., 2001). Kao metal sa kumulativnim dejstvom oovo je konkurentno esencijalnim metalima (gvožđu, kalcijumu, bakru i cinku) za njihove brojne funkcije u organizmu, posebno one vezane za prisustvo slobodnih –SH grupa u delovima biomolekula proteina i enzima. Prema fizičko-hemijskim osobinama Pb²⁺-jon može lako da zameni Ca²⁺-jon u kalcifikovanim tkivima (kostima i zubima), ali i u različitim rastvornim kompleksima ovog metala sa bioligandima u biološkim tečnostima i tkivima. Oovo u kostima doprinosi razvoju osteoporoze, smanjenju koštane mase, promeni strukture i povećanoj resorpciji kostiju kod starijih osoba (Kaličanin i sar., 2004; Kaličanin, Nikolić i sar., 2004).

Oovo ima visok afinitet za S-vezujuća mesta u tkivima, pa lako gradi nerastvoran sulfide i stupa u interakcije sa delovima biomolekula sa slobodnim –SH grupama. Primer blokade –SH grupe je u sintezi hema gde dolazi do povišene koncentracije delta-amino levulinske kiseline (D-ALA) protoporfirina u eritrocitima, plazmi i urinu. Oovo ometa normalan metabolizam gvožđa sprečavajući njegovo prodiranje u eritroblaste i retikulocite (Popović i sar., 1983). Jedan od razloga štetnog efekta olova je njegova sposobnost da se snažno vezuje za sulfhidrilne grupe proteina i kompetitivan je za vezivanje sa Ca²⁺-jom, i doprinosi stvaranju reaktivnih vrsta kiseonika *in vivo*, što dovodi do smanjenja unutrašnje antioksidativne odbrane, i izaziva poremećaje u razmeni jona elektrolita kroz ćelijske membrane (Flora i Flora, 2006; Ercali i sar., 1996). Na molekularnom nivou dejstvo olova se ogleda u povećanoj produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta (Gurer i sar., 2000) i stimulaciji lipidne paroksidacije (Patrick, 2006).

Mnoge *in vivo* i *in vitro* studije pokazuju da nakon tretmana olovom dolazi do povećanja malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije. Oovo može direktno da se vezuje za ćelijske membrane čime se povećava osetljivost membrane lipidne peroksidacije. Takođe, može da naruši biološku funkciju antioksidativnog sistema jer pojačano stvaranje

reaktivnih kiseoničnih vrsta može delovati toksično na sve biomolekule, pa i na enzime antioksidativne zaštite (Sandhir i sar., 1994).

Terapija kod trovanja olovom je davanje helatirajućih agenasa koji vezuju jone metala čime se postiže neznatno poboljšanje. Kod intoksikacije olovom kao antidoti u bolničkim uslovima koriste se natrijum citrat i natrijumove i kalcijumove soli etilen-diamino tetra-sirćetne kiseline (EDTA).

2.2.2. Toksičnost kadmijuma

Prema geohemijskim karakteristikama kadmijum se u prirodi nalazi zajedno sa cinkom, bakrom i olovom. Svake godine se proizvede oko 13000 tona ovog teškog metala (Valko i sar., 2005).

Kadmijum je prema geohemijskoj klasifikaciji hemijskih elemenata litofilni i halkofilni element. Do pH 8 je uvek prisutan kao dvovalentno pozitivan jon (pod uslovom da se u sredini ne nalaze fosfati i sulfati koji ga mogu istaložiti), kada se može lako sorbovati na suspendovanim česticama ili nagraditi kompleksna jedinjenja sa organskim ligandima. Tako, sa akvatičnim huminskim supstancama u zemljištu gradi humatne komplekse.

Kadmijum je označen kao jedan od 126 najvećih zagađivača životne sredine od strane Agencije za zaštitu životne sredine USA.

Najveći izvor inhalacione intoksikacije kadmijumom je pušenje. Preko duvanskog dima 50% kadmijuma se apsorbuje iz pluća u sistemsku cirkulaciju u toku aktivnog pušenja (Satarug i sar., 2003).

Kadmijum se unosi u organizam u obliku para i čestica prašine kao oksid, hlorid, fluorid, sulfid, karbonat i acetat. Apsorpcija se uglavnom odvija respiratornim putem, a manjim delom gastrointestinalnim traktom, dok je transkutani put neznatan. Maksimalne dozvoljene vrednosti kadmijuma za radnike su mnogo niže, po nemačkom zakonu npr. one iznose $15 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Poređenja radi, kod nepušača je prosečna koncentracija kadmijuma u krvi od $0,5 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Godt i sar., 2006).

Preko industrijskog otpada kadmijum ulazi u sastav površinskih voda. Oko 90% kadmijuma u biljkama dospeva iz zemljišta, a oko 10% iz atmosfere. Preko zagađenog zemljišta i vode biljke su polazna karika ishrane i osnovni izvor kadmijuma za životinje i ljude. Unos ovog

metala vazduhom je oko $0,5 \mu\text{g}/\text{dan}$, dok putem vode oko $1 \mu\text{g}/\text{dan}$. Najveća količina kadmijuma se unosi putem kontaminirane hrane (pirinač, iznutrice, gljive). Koncentracija kadmijuma u vodi za piće treba da bude manja od $1 \mu\text{g/l}$ (ATSDR, 1999.), a u zemljištu manja od 85 mg/kg . U Skandinaviji na primer, koncentracija kadmijuma u poljoprivrednom zemljištu se povećava za 0,2% godišnje.

Po ulasku u organizam, kadmijum se transportuje u krv pomoću crvenih krvnih zrnaca i visoko molekularnog proteina krvi-albumina (Goyer, 1991). Normalno nivo kadmijuma u krvi kod odraslih osoba manji je od $1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Iako se kadmijum širi putem krvi kroz ceo organizam, najveća akumulacija (od 50 do 60% telesnog opterećenja kadmijumom) je u bubrežima i u jetri. Opterećenje kadmijumom, naročito u bubrežima, uglavnom linearno raste sa godinama, do 50-60. godine starosti, nakon čega nivo kadmijuma u bubrežima ostaje konstantan ili vrlo malo opadne (Lauwerys, 1979). Visoko toksičan efekat kadmijuma, rezultat je njegovih interakcija sa neophodnim mikro i makro bioelementima, posebno sa gvožđem, kalcijumom, bakrom i cinkom (Brzoska i sar., 1997). Trovanje kadmijumom može biti akutno i hronično. Akutno trovanje nastaje inhalacijom para ili čestica soli kadmijuma (okside, hlorida, sulfide, sulfata, karbonata i acetata). Simptomi akutnog izlaganja kadmijumu su mučnina, povraćanje, gubitak mirisa, ukusa i apetita, abdominalni bol (Wentz, 2000).

Hronično profesionalno trovanje može da se javi posle dugotrajne izloženosti kadmijumom inhalacijom ili oralnim putem, a sistematsko izlaganje uticaju kadmijuma dovodi do povećane ekskrecije kalcijuma, što predstavlja povećan rizik za stvaranje kamena u bubrežima i oštećenje kostiju (Godt i sar., 2006). Za razliku od akutne hronična intoksikacija dovodi do razvoja nekih bolesti kao npr. hronične opstruktivne bolesti pluća, bolesti bubrega (nefrotoksičnost) i kostiju (artritis, osteoporoze), anemije, poremećaj rasta i drugih (ATSDR, 1999).

Akutno trovanje kadmijumom kod laboratorijskih životinja dovodi do oštećenja jetre i testisa, dok hronično izlaganje dovodi do oštećenja bubrega, anemije, poremećaja imuniteta i oštećenja kostiju (Goering i sar., 1995; Waalkes, 2000; Klaassen i sar., 1999; Nikolić i sar., 2011; Jovanović i sar., 2011.). Ekskrecija kadmijuma iz organizma je spora, a odvija se preko bubrega i biliarnim putem, mlekom i pljuvačkom (Popović i sar., 1983). Kao i većina drugih metala, i kadmijum veoma malo učestvuje ili ne učestvuje u direktnoj metaboličkoj razmeni, već se češće vezuje za različite biološke komponente, kao što su proteini, tiolne ($-SH$) grupe i anjonske grupe

različitih makromolekula (ATSDR, 1989). Prisustvo kadmijuma u ishrani smanjuje apsorpciju gvožđa, dok povećava apsorpciju cinka u gastrointestinalnom traktu (Friberg i sar., 1986). U nedostatku ovih elemenata apsorpcija Cd je povišena. Aktivna uloga kadmijuma u poremećaju metabolizma kalcijuma dovodi do osteomalacije (Ogoshi i sar., 1992). Kao i većina drugih metala, i kadmijum veoma malo učestvuje ili ne učestvuje u direktnoj metaboličkoj razmeni, već se češće vezuje za različite biološke komponente, kao što su proteini, tiolne (–SH) grupe i anjonske grupe različitih makromolekula (ATSDR, 1989).

In vivo i *in vitro* ispitivanja su ukazala na indirektno dejstvo kadmijuma dovodi do produkcije slobodnih radikala i oksidativnog stresa svojim inhibitornim dejstvom na antioksidativni zaštitni sistem (Vesna Matović i sar., 2004). Ne postoji medicinski helatni metod koji je u potpunosti efikasan za lečenje kadmijumove toksičnosti.

Dodaci ishrani kao što su melatonini (N-acetil-5-metoksi-triptamin), N-acetilcistein (NAC), tiamin i metionin su se pokazali kao jaki antioksidansi koji povećavaju efikasnost helatirajućeg efekta u tretmanu intoksikacije kadmijumom (Flora i sar., 2008). Poznato je da helatori i antioksidansi štite od potencijalnog štetnog efekta reaktivnog kiseonika i lipidnih peroksida (Gupta i sar., 2005).

2.3. Antioksidansi u biološkim sistemima

Antioksidansi su sve supstance koje, prisutne u maloj koncentraciji u odnosu na supstance koje se oksiduju, mogu da spreče ili značajno smanje njihovu oksidaciju (Hallivell, 1990).

Prema prirodi i načinu delovanja, antioksidansi se dele na enzimske i neenzimske. Enzimi (katalaza, glutation, peroksidaza, glutation reduktaza, glutation S – transferaza) čine takozvanu prvu liniju antioksidativne zaštite koji u potpunosti sprečavaju endogeno stvaranje slobodnih radikala. Ovaj nivo zaštite je obezbeđen prostornom razdvojenošću procesa u kojima se stvaraju slobodni radikali.

Neenzimski antioksidansi predstavljaju sekundarnu liniju odbrane koja podrazumeva angažovanje sistema u uslovima normalnog i pojačanog stvaranja slobodnih radikala (Hallivell i sar., 1992). U neenzimskie antioksidante spadaju: vitamini E i C, tiolova jedinjenja (glutation, liponska kiselina, metionin, cistein), koenzim Q, albumin, bilirubin, flavonoidi i druga fenolna jedinjenja biljnog porekla .

L-askorbinska kiselina (vitamin C) je najefikasniji hidrosolubilni antioksidant. Stvara se u biljkama, nekim životinjama, dok kod čoveka se ne može sintetisati. Lako se redukuje (Bendich i sar., 1986). Prisustvo L-askorbinske kiseline u krvnoj plazmi efikasno sprečava oksidaciju lipidova plazme, pri čemu su antioksidativni efekti ovog vitamina i brzina njegove reakcije sa peroksi radikalom veći u odnosu na druge antioksidante (Sies i sar., 1992). Antioksidativna aktivnost vitamina C bazirana je na njegovoj sposobnosti da neutrališe mnoge intermedijere i produkte slobodno radikalnih procesa. L-askorbinska kiselina pokazuje i prooksidativna svojstva jer redukuje metale promenljive valence (Halliwell, 1983; Davison i sar., 1986).

Vitamin E je neenzimski lipofilni antioksidant široko rasprostranjen u prirodi, kako u biljkama tako i u životinjama. Čovek ne može da sintetiše vitamin E tako da je on esencijalni antioksidant koji se unosi hranom. Najveću aktivnost i najzastupljeniju formu vitamina E u hrani poseduje d- α -tokoferol. To je najefikasniji lipofilni antioksidant u biološkim membranama jer omogućava njihovu stabilnost, a modulacijom puteva signalne transdukcije modificuje ćelijski odgovor na oksidativni stres. Antioksidativna svojstva vitamina E dolaze do izražaja u prevenciji i smanjenju komplikacija kod mnogih bolesti (Stampfer i sar., 1993; Tagami i sar., 1999).

Farmakološki aktivne supstance su: nesteroidni antiinflamatori lekovi, blokatori kalcijuma, allopurinol, N-acetilcistein, ACE inhibitori, desferoksamin, takođe ostvaruju neenzimsku antioksidativnu zaštitu preko različitih mehanizama (Đorđević, 2000).

Treći nivo antioksidativne zaštite ostvaruju enzimski antioksidanti koji učestvuju u reparaciji nastalog oksidativnog oštećenja lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina. Enzimi odgovorni za reparaciju i uklanjanje oksidisanih supstrata su: endo- i egzonukleaze, DNK-ligaze, DNK polimeraze, klasična i fosfolipid-zavisna glutation peroksidaza, fosfolipaza A2, razni proteolitički enzimi, metionin-sulfoksid-reduktaza, glikozilaze i drugi (Ursini i Bindoli, 1984; Sevanian Kim, 1985; Davies, 1986; Cotgreave i sar., 1988; Linn, 1998).

2.3.1. Bioligandi

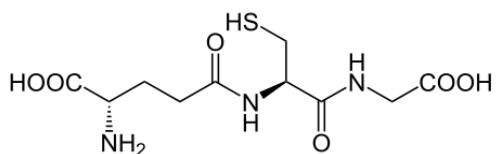
Za biometale i metale slične po fizičko-hemijskim osobinama njima. Karakteristična je sposobnost da lako grade kordinaciona jedinjenja sa molekulima iz neposrednog okruženja, okružujući se najčešće sa četiri ili šest donor atoma –O, –N ili –S (najčešće), preko kojih se ostvaruje kordinacija M-L (metal-ligand) i građenje kompleksnih čestica tipa [MLn].

Prosti ligandi sa jednim donor atomom su monodentatni: H_2O , Cl^- , ROR, RSH i drugi. Tipično bidentatni ligandi su NO_3^- , CO_3^{2-} , RCOO^- , aminkseline i drugi. Kiseonik i reaktivne kiseonične vrste mogu da se vezuju i kao monodentatni i bidentatni ligandi (HO^- , H_2O_2 , O_2^-) (Nikolić, 2011). Bioligandi, proteini, nukleinske kiseline imaju više donor atoma i mesta preko kojih ostvaruju koordinaciju sa metalima. Stabilnost nagrađenih kompleksa zavisi od jačine interakcije M-L i različita je za O-, N-ili S- donor atome.

2.3.2. Glutation

Sinteza glutationa

Glutation (GSH) je tripeptid L- γ -glutanol-L-cistenil-glicin, (slika 2.5.). Glutation je glavni neproteinski tiol. Ovaj peptid karakteriše neobična peptidna veza (neobičnost se ogleda u tome što u reakciju građenja peptidne veze sa cisteinom ne stupa α -COOH, već γ -COOH glutaminske kiseline) koja sprečava nespecifičnu desaturaciju hidrolitičkim enzimima koji napadaju normalnu peptidnu vezu.



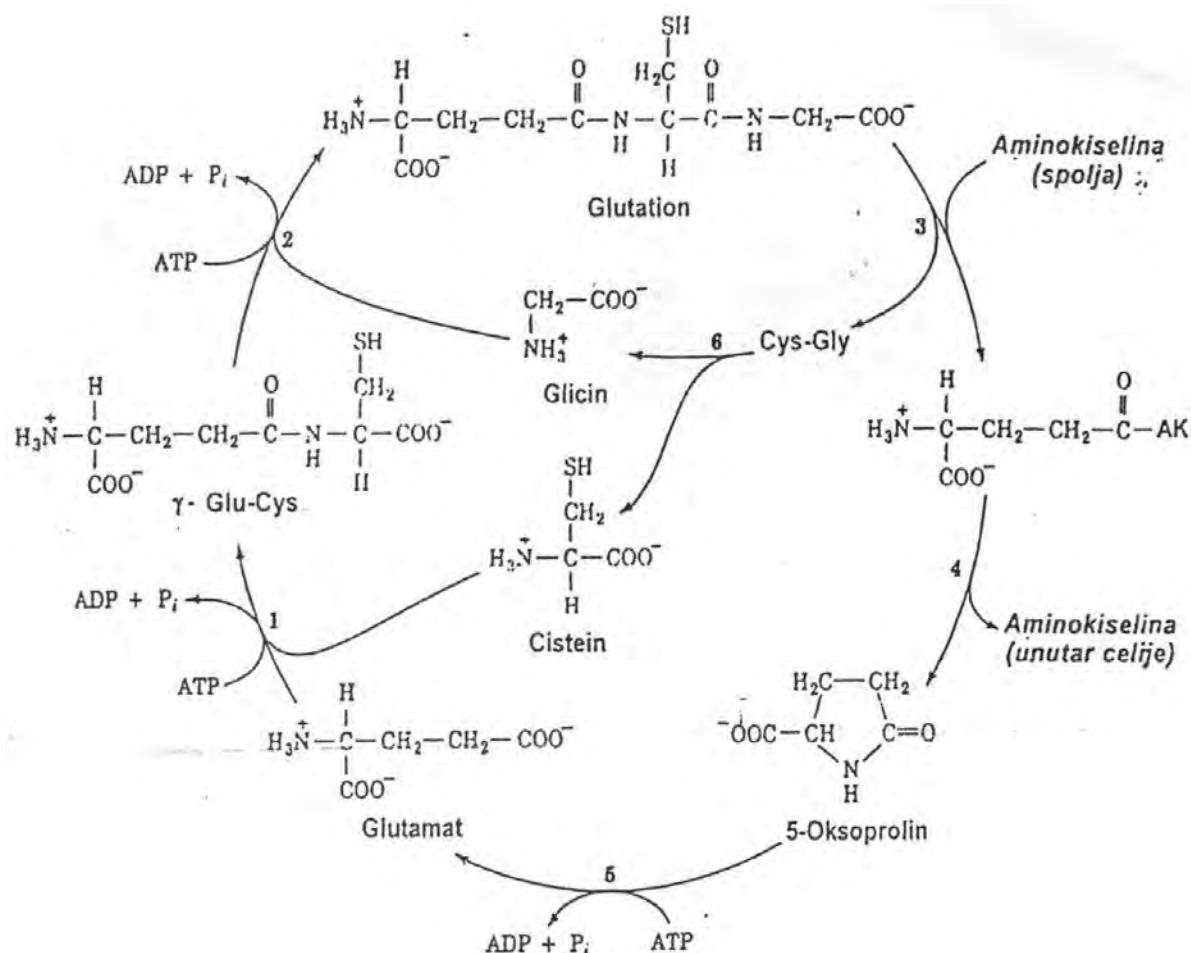
Slika 2.5. Glutation

U γ -glutamilskom ciklusu glutation se sintetiše iz glutamata, cisteina i glicina uzastopnim dejstvom γ -glutamilcistein-sintetaze i GSH sintetaze (slika 2.6.). Za ove sintetske reakcije potrebna su dva molekula ATP-a. Njihovom hidrolizom obezbeđuje se potrebna energija pri čemu se karboksilna grupa aktivira za sintezu peptidne veze stvaranjem acil-fosfatnog intermedijera. Degradacija glutationa do amino kiselina iz kojih se sastoji odigrava se katalitičkim dejstvom više enzima: γ -glutamil transpeptidaze (reakcija 3), γ -glutamil ciklotransferaze (reakcija 4), 5-oksoprolinaze (reakcija 5) i intracelularne proteaze (reakcija 6). Glutation omogućava transport amino kiselina u γ -glutamilskom ciklusu kroz ćelijsku membranu u bubrežima. Glutation se najpre transportuje na spoljašnju stranu membrane gde se amino kiselina koja se unosi u ćeliju vezuje za glutation i nastaje γ -glutamil-aminokiselinski-dipeptid. U ovoj reakciji stvara se peptidna veza između α -amino-grupe i γ -glutamil ostatka glutaminskog dela glutationa (reakcija 3).



Reakciju katalizuje enzim γ -glutamil-transpeptidaza. Kompleks γ -glutamil-aminokiselina prolazi kroz membranu i ulazi u citozol ćelije. Za ovaj proces neophodni su enzimi koji oslobađaju aminokiselinu iz ovog kompleksa i resintetišu glutation održavajući potreban nivo

njegove koncentracije u ćeliji. Iz γ -glutamil-aminokiselinskog kompleksa oslobađa se transportovana amino kiselina i 5-oksoprolin kao intermedijer. Poslednji stepen hidroliza 5-oksoprolina vrši se u prisustvu ATP-a dejstvom 5-oksiprolinaze.



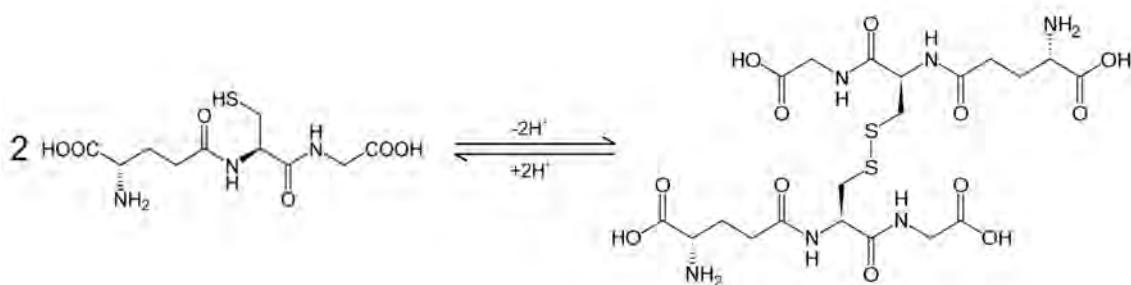
Slika 2.6. Sinteza i regeneracija glutationa kao dela γ -glutamilskog ciklusa AK

Biološki značaj glutationa

Glutation čini 90% ukupnih neproteinskih sulfidnih jedinjenja ćelije i esencijalni je kofaktor nekih enzima (glutation-peroksidaza, glutation S-transferaza, glutation transhidrogenaza, glutation reduktaza). Glutation je takođe esencijalni kofaktor mnogih enzima, kao što su: formaldehid dehidrogenaza, glioksalaza, prostaglandin endoperoksid izomeraza, dehidrochlorinaza. GSH je biološki redoks u metabolizmu eritrocita, a ima ulogu i u transportu aminokiselina. Eritrociti predstavljaju svojevrstan transportni sistem za glutation i njegove konjugate (Dass i sar., 1992). U procesu konjugacije sa GSH vrši se njihova ekskrecija u plazmu, odakle se netoksična jedinjenja preko žući ili urina izlučuju u spoljašnju sredinu.

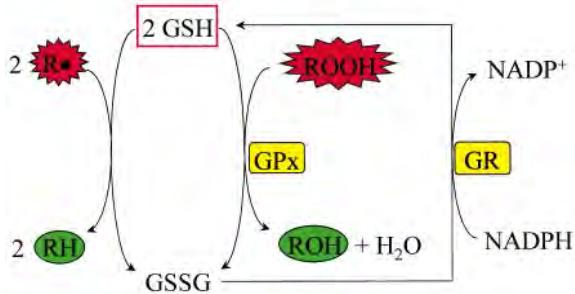
Široko je rasprostranjen u humanim i životinjskim tkivima, biljkama i mikroorganizmima. Glavni izvori glutationa u namirnicama su: brokoli, spanać, avokado, prokelj, karfiol, kupus i kelj. Glutation kao tiolno jedinjenje deluje kao antioksidans u ćeliji (Parke i sar., 1996). Ovaj tripeptid se nalazi u visokim koncentracijama u skoro svim ćelijama. Nalazi se u citoplazmi, jedru i mitohondrijama i glavni je rastvorni antioksidans u ovim delovima ćelije.

Koncentracija u ćeliji od 0,1-10 mmol svrstava glutation u red najzastupljenijih tiolnih jedinjenja (Meister, 1988). U ćeliji postoje dva puta glutationa: citoplazmatski i mitohondrijalni u koje dospeva iz citoplazme. Intracelularna koncentracija glutationa regulisana je preko aktivnosti enzima uključenih u sintezu (Meister i Anderson, 1983), zatim preko dostupnosti aminokiselina, posebno cisteina (Bannai, 1984), intenziteta trošenja u procesu detoksifikacije u ćeliji kao i preraspodelom GSH između organa.



Slika2.7. Redoks sistem GSH-GSSG

Glutation služi kao redukujući agens u mnogim enzimskim i neenzimskim reakcijama. On se koristi kao kosupstrat u enzimskoj reakciji koju katalizuje glutation peroksidaza, pri čemu u reakciji nastaje GSSG. Oksidisani glutation, pomoću glutation reduktaze, ponovo regeneriše GSH u prisustvu NADPH. Ovaj redoks-ciklus sprečava gubitak GSH.



Slika 2.8. Šematski prikaz funkcije GSH kao antioksidansa

Glutation se može naći u ćelijama, kao učesnik metabolizma, transporta i zaštite u ćeliji. On učestvuje u redukciji disulfidnih i drugih molekula, kao i konjugaciji sa jedinjenjima egzogenog i endogenog porekla. Na taj način on štiti ćeliju od štetnog dejstva slobodnih kiseoničnih radikala. Osnovna uloga glutationa kao značajnog antioksidansa ostvaruje se direktnim uklanjanjem slobodnih radikala kroz neenzimsku reakciju, glutation zavisnom redukcijom H_2O_2 i drugih hidroperoksida uz glutation peroksidazu i detoksifikacijom ksenobiotika i elektrofila uz glutation S-transferazu. H_2O_2 stvoren u polimorfonuklearnim ćelijama kao odgovor na stimulus ima sposobnost destrukcije endotelnih ćelija, fibroblasta, epitelnih ćelija pluća, što uslovjava razvijanje antioksidativnog odgovora, aktivaciju katalaze i glutation redoks sistema.

Zbog prisutne reaktivne sulfhidrilne grupe iz molekula, glutation spada među osnovne učesnike u ćelijskom antioksidativnom sistemu. Atom sumpora u sulfhidrilnoj grupi se lako prilagođava gubitku jednog elektrona i dužina života tiol radikala može biti dosta duža od života drugih slobodnih radikala.



Pri fiziološkim uslovima za oderđeni pH, sulfhidrilne grupe mogu i da se delimično ionizuju, stvarajući na taj način tiolatni anjon koji je reaktivniji nukleofil (odgovoran je za reakcije tiola u metabolizmu ksenobiotika). Reakcije sulfhidrilnih grupa u toku oksidativnog stresa uključuju slučajeve u kojima su važni i sumporni radikalni i tiolatni anjoni.

Antioksidativna uloga glutationa ogleda se u usporavanju procesa starenja, aterogeneze, mutageneza i kancerogeneze. GSH je značajan faktor prevencije mutagenog dejstva raznih kancerogena. Stoga je glutation jedan od najmoćnijih antioksidanata, a ujedno je i regulator drugih antioksidanata. Na osnovu rezultata određivanja GSH, kod komarca, mušice, miševa, pacova i čoveka, postoje pretpostavke da sa starenjem dolazi do opadanja koncentracije istog što predstavlja mogući ključ starenja i pojave raznih patoloških stanja (Sohal i sar., 1996). Smatra se da nivo glutationa u toku starenja opada između ostalog, i zbog povećanog unosa polinezasićenih i delimično hidrogenizovanih biljnih masti i preterane izloženosti toksičnim supstancama kao što su lekovi i pesticidi.

Glutation učestvuje i u drugim metaboličkim funkcijama ćelije kao što su: redukcija i izomerizacija disulfidnih veza u strukturnim i funkcionalnim proteinima, održavanje redoks puferskog sistema ćelije, sinteza leukotriena i prostaglandina, sinteza cisteina, održavanje integriteta ćelijske membrane (aktivni transport supstrata i jona, homeostaza Ca^{2+} , stabilizacija receptora, aktivnost citoskeleta), (Meister, 1973), transport aminokiselina kroz ćelijsku membranu (bubrežni tubuli, sluzokoža tankog creva i moždani horionski pleksusi) (Wendel i sar., 1981).

Iako se uloga glutationa najčešće vezuje za zaštitu ćelije od aktivnih slobodnih radikala, glutation učestvuje i u regulaciji različitih drugih procesa, na primer u detoksikaciji ksenobiotika, sintezi eikosanoida, sintezi nukleinskih kiselina i belančevina, u ćelijskoj signalizaciji, proliferaciji i diferencijaciji (Shan i sar., 1990; Meister 1988; Pavlović i sar., 1994). Glutation je prisutan samo u aerobnim organizmima.

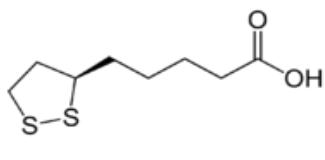
Nivo GSH u različitim organima određen je dinamikom međuorganske preraspodele GSH i njegovih intermedijera (Bannai i sar., 1986; Mimić, 1994). Sposobnost ekskretovanja GSH iz različitih organa, posebno iz jetre (Anderson i sar., 1980; Okhtens i sar., 1998) determiniše veću koncentraciju GSH u intersticijumu u odnosu na koncentraciju u plazmi, što predstavlja esencijalni faktor u zaštiti ćelijske membrane od oksidanata u njenom neposrednom okruženju. Ekskrecijom GSH u perifernu krv omogućeno je ponovno korišćenje prekusora za njihovu sintezu. S obzirom da je jetra značajan izvor GSH za druga periferna tkiva, intezivan metabolizam ksenobiotika u ovom organu, koji dovodi do pada koncentracije GSH, rezultira i opadanjem koncentracije GSH u drugim perifernim tkivima (Pavlović i sar., 1993).

Bubreg predstavlja primarni organ koji omogućava prihvatanje GSH iz periferne krvi (McIntyre i sar., 1983; Orrenius i sar., 1983). U bubregu se aktivno i sintetiše i sekretuje GSH. Pored bubrega i druga tkiva, npr. pluća i epitel intestinalnog trakta učestvuju resintezi i međuorganskim protokom GSH. U uslovima intezivnog oksidativnog stresa, intezivnija je ekskrecija GSH iz jetre u perifernu krv (Lu i sar., 1990). Na ovaj način se obezbeđuje dostupnost GSH za druge organe.

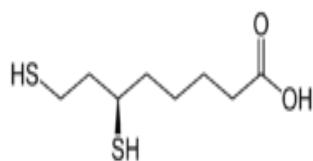
2.3.3. Liponska kiselina

Liponska kiselina u biološkim sistemima

α -Liponska kiselina (LA), 6,8-ditiooktanska kiselina, je ciklični disulfid, i ista je preko karboksilne grupe povezana sa proteinским delom enzima kao amid. LA je prvi put izolovana 1951. god. od strane Reed i saradnika, kao katalitički agens poznat po različitim imenima i povezana sa piruvat dehidrogenazom (Reed i sar., 1951).



Slika 2.8. Liponska kiselina



Slika 2.9. Dihidroliponska kiselina

LA je široko zastupljena u hrani životinjskog i biljnog porekla, vezana sa proteinima preko lizina u lipolizin. Životinjska tkiva koja su bogata lipolizinom su bubrezi, srce i jetra, dok su jestive biljke koje sadrže lipolizin spanać i brokoli. Male količine lipolizina su izmerene u paradajzu, grašku i kelju (Lodge i sar., 1997). U manjem procentu zabeleženo je njeno prisustvo i u namernicama biljnog porekla (krompir) (Kataoka, 1998). Ona predstavlja značajan izvor antioksidanasa u ljudskoj ishrani, tako da se primenjuje kao dodatak hrani zbog protektivne uloge u prevenciji nastanka nekih bolesti u koji su uključeni slobodni radikali (Hagen i sar., 1999; Packer i sar., 2001; Packer i sar., 1997). LA se primenjuje u prehrabenoj industriji i u industriji pića.

Ona je kofaktor multienzimskog kompleksa piruvat-dehidrogenaze i α -ketoglutarat dehidrogenaze.Učestvuje u procesu oksidativne dekarboksilacije α -ketokiselina. Liponska kiselina-tiooksična kiselina naziva se i protogen i faktor prenosa acetata.

Liponska kiselina u čistom stanju ima neprijatan miris i ukus. Ispoljava veliku aktivnost u vrlo malim količinama. Dejstvo α -liponske kiseline ogleda se u intenziviranju sinteze ATP-a (Harris i sar., 2005), učestvuje u asimilaciji mlečne kiseline, aktivira enzime ciklusa trikarbonske kiseline, stimuliše rast bakterija mlečno-kiselinskog vrenja zamenom acetata (faktor prenosa acetata), stimulativno deluje na sintezu CoA (utilizacija masnih kiselina), sprečava oštećenje jetre raznim toksinima, normalizuje nivo aldolaze i transferaze.

α -Liponska kiselina spada u najefikasnije do sad poznate antioksidanse zbog svoje lipo- i hidrosolubilnosti što joj omogućava lak prođor u citoplazmu gde učestvuje u zaštiti od slobodnih reaktivnih radikala, energetskom metabolizmu, regulaciji genske ekspresije itd. U telu ALA može postojati intracelularno, ekstracelularno i u membranama. α -Liponska (lipoinska) kiselina je antioksidans koji se relativno široko upotrebljava.Koristi se u terapiji mnogih bolesti (Ziegler i sar., 1995).

Suplementacija liponskom kiselinom može delovati kao antioksidans i smanjiti oksidativni stres u ćeliji, zapažena je u *in vitro* i *in vivo* studijama (Suzuki i sar., 1991). Neke od studija govore o biološkom značaju primene liponske kiseline u slučajevima oksidativnog stresa ili razlikama između antioksidativne aktivnosti liponske kiseline i njenih derivata (Arivazhagan i sar., 2002; Matsugo i sar., 1997). Takođe, postoje i podaci, dobijeni spektroskopskim i hromatografskim analizama, o ponašanju (LA) i njenih derivata u različitim model sistemima (Chen i sar., 2005; Schepkin i sar., 1996). U biološkim sistemima ona može biti i helator jona biometala (Cu, Fe), kao i toksičnih metala (Cd, Pb, Hg) (Wolff i sar., 1995). Literaturni podaci govore i o njenom efektu na druge antioksidanse, tj. povećava nivo glutationa u ćeliji i poboljšava aktivnost vitamina C i E. Ovaj antioksidans smanjuje oštećenja izazvana izlaganjem radijaciji, a može se koristi, prema nekim navodima, i u terapiji dijabetesa (Jacob i sar., 1996), kao i prevenciji komplikacija ove (kardimiopatije, neuropatije, retinopatije i dr.) i drugih bolesti.

2.4. Slobodni radikali i mehanizam oksidativnog stresa

Prisustvo slobodnih radikala u biološkim materijalima je otkriveno pre više od 50 godina. Slobodni radikali su hemijske vrste sa jednim ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, što ih čini veoma reaktivnim te mogu da reaguju međusobno ili sa drugim manje reaktivnim vrstama i time izazovu niz lančanih reakcija. Kontinuirano se stvaraju u malim količinama u ćelijama kao nusprodukti metabolizma tokom fizioloških procesa (oksidativna fosforilacija u mitohondrijama tzv. tkivno disanje, autooksidacija različitih molekula, oksido-redukcioni procesi u prisustvu metala promenljive valence, u procesu metabolizma etanola, u procesu lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina i kao posledica zračenja).



Slika 2.10. Endogeni i egzogeni izvori slobodnih radikala

U biološkim sistemima slobodni radikali su uglavnom kiseonične vrste: superoksid anjon radikal (O_2^-), hidroksi radikal ($\cdot OH$), alkoxi radikal ($RO\cdot$), peroksi radikal ($ROO\cdot$) i drugi.

Nastajanje hidroksi radikala ($\cdot OH$), najreaktivnijih kiseoničnih radikala, vezano je za Haber-Weissovu reakciju u kojoj reaguje H_2O_2 i O_2^- , kao i Fenton-ovu reakciju koja se odnosi na razlaganje H_2O_2 u prisustvu metala sa promenljivom valencijom (Fe^{2+}/Fe^{3+} i Cu^+/Cu^{2+}) (Sodeman i sar., 2000).

Metali sa promenljivom valencijom (gvožđe i bakar) su uglavnom vezani za transportne, deponujuće i funkcionalne proteine. Kada se njihova koncentracija povećava, stupaju u reakciju sa vodonik peroksidom i daju hidroksi radikal. U fiziološkim uslovima Haber-Weissova reakcija se sporo odvija, ali se u prisustvu metala odvija Fentonova reakcija uz produkciju reaktivnog hidroksi radikala i posledičnu toksičnost.

Fentonova reakcija:



Haber-Weiss-ova reakcija objedinjuje nastanak hidroksi radikala sledećom reakcijom:



Slobodni radikali imaju sposobnost oštećenja gotovo svih biomolekula u ćeliji, narušavanja međumolekulskih veza, poremećaja fluidnosti i propustljivosti ćelijske plazme membrane (Cross i sar., 1987.). U reakcijama sa drugim biomolekulima npr. proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama dolazi do promena u strukturi i funkciji ovih jedinjenja tako da nastaje oštećenje i smrt ćelije (Halliwell, 1991). Antioksidativni sistem omogućava eliminaciju slobodnih radikala iz organizma.

Oksidativni stres nastaje zbog povećane proizvodnje reaktivnih oblika kiseonika (Parkinsonova i Alchajmerova bolest) ili smanjenje sposobnosti ćelija da ga neutrališu preko svojih unutrašnjih antioksidanasa. Jedna od najprihvaćenijih teorija starenja koju je 1956. godine postavio Harman jeste teorija „slobodnih radikala“ koja podrazumeva akumulaciju oksidativnih oštećenja biomolekula sa starenjem, što dovodi do narušavanja ravnoteže između prooksidanasa i antioksidanasa u korist prooksidanasa koji dovode do oksidativnog stresa (Harman, 1956).

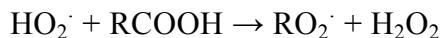
Na molekularnom nivou, koncentracije reaktivnih jedinjenja kiseonika se mogu povećati do visokih nivoa u nekim patološkim procesima. Tamo gde su radikali prisutni mogu reagovati sa ćelijskim sastojcima i izazvati oštećenja, poremećaj funkcija ili propadanje ćelija. U literaturi, kao najizraženiji negativni efekat delovanja slobodnih radikala se navodi oksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina sadržanih u ćelijskim membranama, poznata kao *lipidna peroksidacija*, tokom koje se oštećuje plazma membrane. Krajnji proizvod lipidne peroksidacije je *malondialdehid (MDA)*, biohemski marker stepena oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana.

2.4.1. Lipidna peroksidacija

Lipidi su estri viših masnih kiselina i glicerola. To je heterogena grupa jedinjenja koja u organizmu ima nekoliko važnih uloga: važan su izvor energije, konstituenti su membrana i nervog tkiva, termički su i električni provodnici itd.

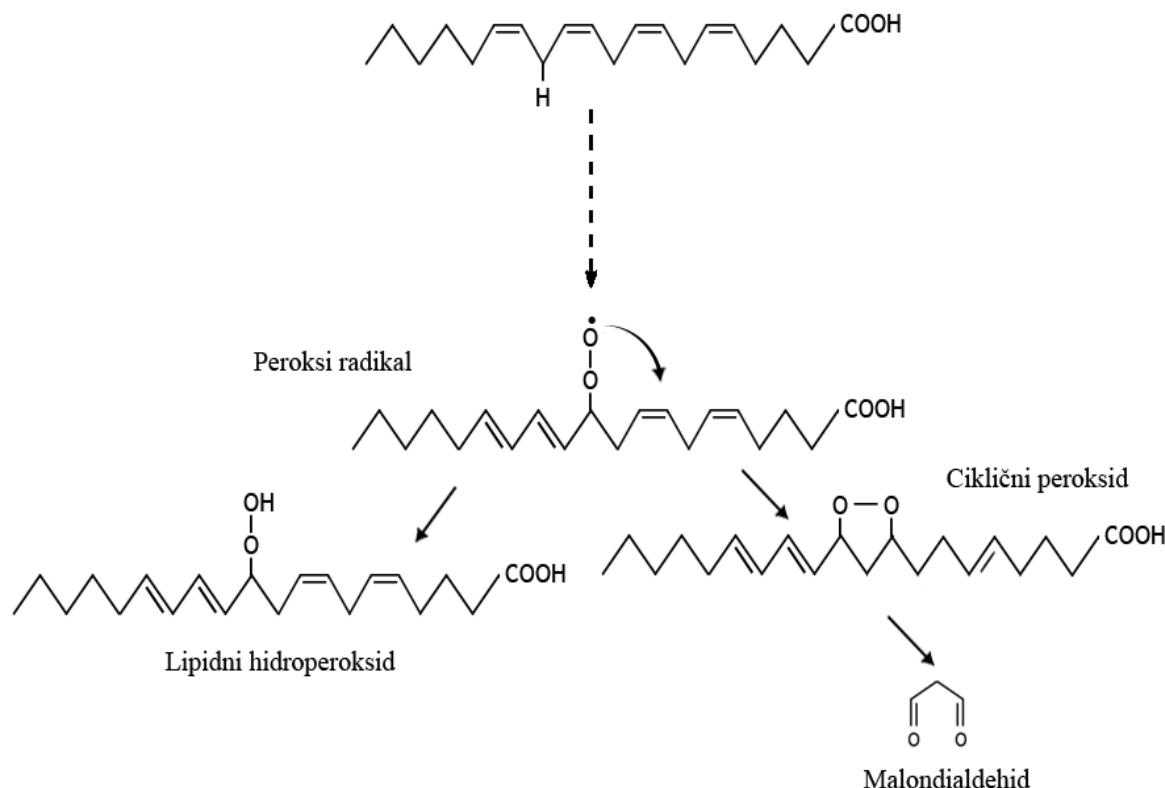
U procesu oksidacije lipida, nezasićene masne kiseline podležu oksidativnom oštećenju. Slobodni radikali su inicijatori i terminatori procesa lipidne peroksidacije (naročito superoksid anjon radikal) (McCord, 1995).

Lipidnu peroksidaciju izazivaju slobodni radikali, između ostalog i hidroksi radikal (OH^\cdot), koji mogu da pokrenu proces oksidacije nezasićenih masnih kiselina.



Jednom pokrenuta reakcija peroksidacije nastavlja se autokatalitički, a za krajnju posledicu ima strukturno-funkcionalne promene supstrata (Kagan, 1988; Farber i Kyle, 1990)

Lipidna peroksidacija ima tri faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju (Halliwell i Gutterduge, 1984).



Slika 2.11. Inicijacija i propagacija procesa lipidne peroksidacije

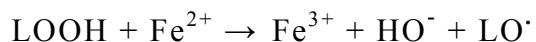
Inicijacija procesa lipidne peroksidacije podrazumeva oduzimanje atoma vodonika iz metilenske grupe ($-\text{CH}_2-$) u α položaju od mesta dvogube veze ugljovodoničnog lanca nezasićene masne kiseline (LH), od strane radikala kiseoničnog porekla visokog oksidacionog potencijala (najčešće OH^\cdot i O_2^\cdot), početna reakcija na slici 4.2.

Najčešće je to masna kiselina koja je estarskom vezom vezana za drugi C-atom alkohola u fosfolipidima ili glikolipidima (Shatma i Riyat, 2007). Kako vodonikov atom sadrži samo 1 elektron, njegovo izdvajanje uzrokuje prisustvo nesparenog elektrona na ugljeniku ($-\text{CH}-$) i nastajanje lipid radikala (L^\cdot). U cilju dalje stabilizacije dolazi do intramolekulskog premeštanja dvogubih veza u lipidnim radikalima i produkcije konjugovanih diena (Horton i Fairhurs, 1987). Adicijom molekula kiseonika na konjugovane diene formira se peroksi-

radikal (LOO^{\cdot}). Peroksi radikali mogu dalje da iniciraju oduzimanje vodonika sa susednih molekula lipida, čime reakcija lipidne peroksidacije ulazi u drugu fazu propagacije i autooksidacije, koja rezultuje formiranjem lipidnih hidroperoksida (LOOH) i novih lipidnih (alkil) radikala (Kagan, 1988; Horton i Fairhurs, 1987; Halliwell i Gutterduge, 1985).

Druga sudbina peroksi radikala je njihova transformacija u ciklične perokside i ciklične endoperokside, koji se daljom hidrolizom i intramolekulskim preuređivanjem dvogubih veza prevode u kratkolančane ugljovodonike tipa alkena, alkana i karbonilnih intermedijera.

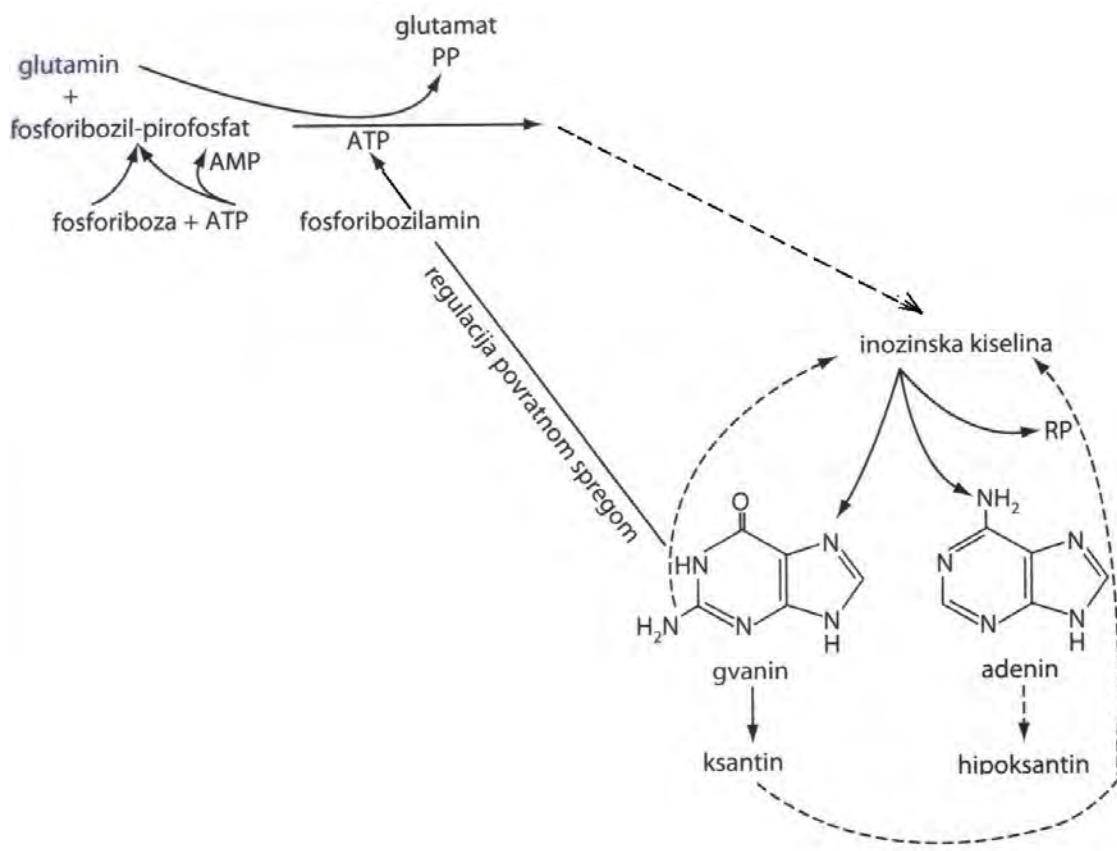
Lipidni hidroperoksi (LOOH), kao primarni molekulski produkti procesa lipidne peroksidacije, analogno H_2O_2 , predstavljaju dalje potencijalne izvore za nastajanje visokoreaktivnog OH^{\cdot} . U prisustvu Fe^{2+} u klasičnoj Fentonovoj reakciji, razgradnjom LOOH nastaje OH^{\cdot} i alkoxi radikal (LO) (Halliwell i Gutterduge, 1985.):



2.5. Purinske baze

2.5.2. Biosinteza purina

Sinteza purina u čovekovom organizmu započinje reakcijom riboze-5-fosfata i ATO-a pri čemu nastaje fosfo-ribozil-pirofosfat. fosfo-ribozil-pirofosfat dalje reaguje sa amidnom grupom glutamina, pri čemu se oslobađaju glutamat i pirofosfat. Na taj se način nastali fosforibozilamin veže sa molekulom glicina u fosforibozil-glicinamid daljim reakcijama s jednim C-atomom koji se prenosi sa formil-tetrahidrofolne kiseline, azotovom grupom, karbonatnom kiselinom u obliku bikarbonata i asparaginskom kiselinom, nastaje inozinat iz kojeg nastaje adenozin-5'-fosfat i gvanozin – 5'-fosfat (slika 2.13.).

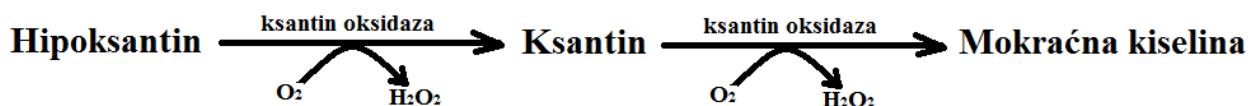


Slika 2.13. Biosinteza purina

2.5.3. Razgradnja purinskih baza

Purinska baza (adenin, guanin i hipoksantin) oslobođena hidrolizom nukleozida može reagovati s 5-fosforibozil-1-pirofosfatom i ponovo se dobijaju mononukleotidi. Tu reakciju katalizuje hipoksantingvanin-fosforibozil-transferaza. Suvišni purini se prevode u mokraćnu kiselinu. Pri tome se od gvanozina prvo odvoji riboza i oslobođeni se guanin deaminira u ksantin, dok se adenosin prvo deaminira u inozinu, koji zatim gubi ribozu i prelazi u hipoksantin. Nastali hipoksantin i ksantin delovanjem flavoproteinskog enzima ksantin oksidaze oksiduju se u mokraćnu kiselinu (slika 2.14.). Čovek izlučuje mokraćnu kiselinu kao konačni produkt metabolizma purina (slika 2.13.).

Hranom se purini unoše najvećim delom preko mesa, što je posledica da je koncentracija mokraćne kiseline u serumu veća kod stanovništva razvijenijih zemalja koji troše više hrane od mesa nego li kod stanovništva siromašnjih zemalja. (Dubravka Č. i Ivana Č., 2009).



Slika 2.14. Reakcije katalizovane ksantinoksidazom

2.6. Enzimi koji učestvuju u metabolizmu purinskih baza

U klasu oksidoreduktaza spadaju enzimi koji katalizuju oksidoredukcione procese u ćelijama. U živim organizmima se oksidacija organskih materija u najvećoj meri ostvaruje odvajanjem vodonika ili elektrona od supstrata (donatora ili davaoca) i njihovim prenošenjem na odgovarajuće primaoce (akceptore). Kao primaoci vodonika ili elektrona mogu da služe različiti koenzimi (NAD, NADP, FAD, FMN), citochromi, kiseonik, vodonik peroksid, disulfidna jedinjenja itd.

Prema trivijalnoj (radnoj) nomenklaturi, oksidoreduktaze koje odvajaju atome vodonika, ili elektrone, od supstrata i prenose ih na neki akceptor, izuzev kiseonika i vodonik peroksid, zovu se **dehidrogenaze**. Takođe, saglasno trivijalnoj nomenklaturi, oksidoreduktaze koje koriste kiseonik kao akceptor vodonika ili elektrona, nose naziv **oksidaze**, a one koje koriste vodonik peroksid kao oksidaciono sredstvo zovu se **vodonikperoksidaze**. Izvesne oksidoreduktaze koje imaju izraženo redukujuće dejstvo zovu se **reduktaze**.

Oksidaze su enzimi koji katalizuju oduzimanje vodonika od supstrata ali kao akceptor vodonika upotrebljavaju samo kiseonik. Sve oksidaze sadrže bakar i daju vodu kao produkt reakcije, sa izuzetkom urikaze i monoaminooksidaze koje daju H_2O_2 . Najpoznatije oksidaze su citochrom-oksidaza, fenolaza, oksidaza askrobinske kiseline i dr. (Harper i sar. 1982).

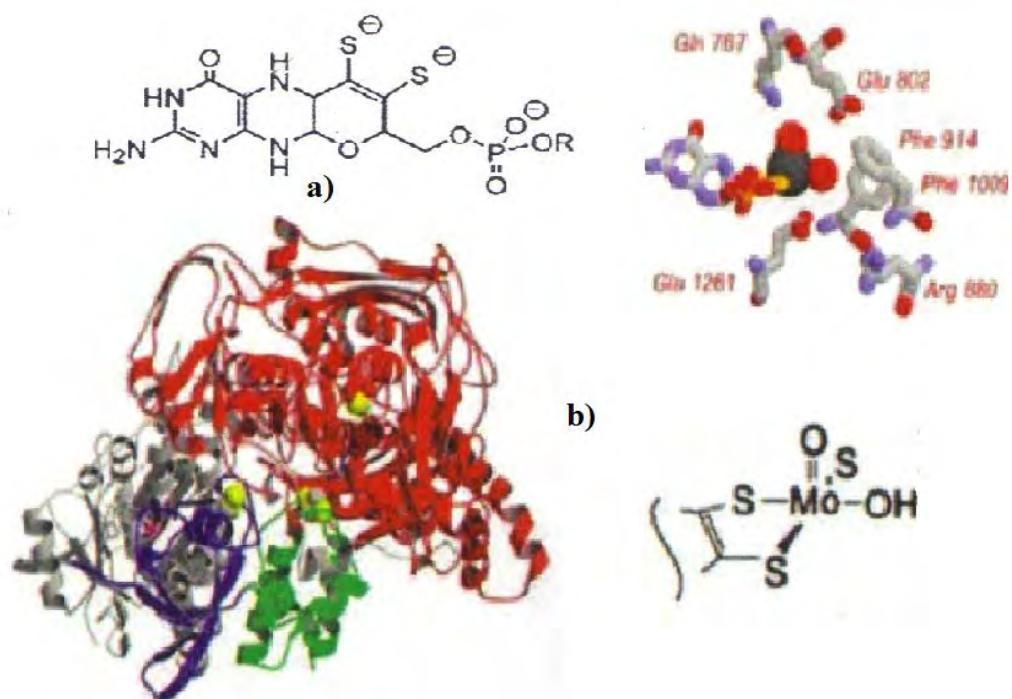
U *anaerobne dehidrogenaze* spade veliki broj enzima koji prenose vodonik od jednog do drugog supstrata u spregnutim oksidoredukcionim reakcijama van respiratornog niza omogućuju oksidacionih procesa u odsustvu kiseonika.

Aerobne dehidrogenaze su enzimi koji katalizuju oduzimanje vodonika od supstrata i koriste kao acceptore vodonika bilo kiseonik bilo veštačke supstance kao što je metilensko plavo. U aerobne dehidrogenaze spadaju ksantin dehidrogenaza, aldehid dehidrogenaza i dr.

U *vodonikperoksidaze* spadaju dva enzima: proksidaza, nađena u mleku i u biljkama, i katalaza, nađena u životinjama i biljkama.

2.6.1. Ksantin oksidaza

Ksantin oksidaza (XO), EC 1.1.3.22, je flavoprotein koji sadrži Fe, S i Mo i u visokim koncentracijama se nalazi u endotelnim ćelijama, slika 2.18. Postoji u 2 oblika: ksantin dehidrogenaza-XDH i ksantin oksidaza-XO. Dominantan oblik u fiziološkim uslovima je XDH. Kada se za reakciju u kojoj se hipoksantin ili ksantin oksidaju do mokraćne kiseline koristi NAD⁺ kao akceptor elektrona u reakciji nastaje NADH (XDH). Ako je akceptor e-molekulski O₂ onda nastaje O₂⁻ (XO). U uslovima ishemije dominira XO kao i u uslovima povećanog nivoa oksidativnog stresa.



Slika 2.18. a) Co-faktor ksantin oksidaze, piranopterinditiolat, b) aktivno mesto i struktura ksantin oksidaze(Fe-S fragment – zelena i plava, FAD fragment- siva, Mo obavezujući fragment – crvena) (Crichton, 2008.)

Ksantin oksidaza katalizuje oksidaciju hipoksantina i ksantina, jedinjenja koja nastaju deaminacijom adenina i guanina iz nukleinskih kiselina uz nastajanje urata (mokraćne kiseline). Pored toga ona katalizuje i oksidaciju aldehida u karboksilne kiseline. U oba slučaja se proces može formalno predstaviti kao hidroksilovanje, pri čemu se -OH grupa odvaja od molekula

rastvarača. Značaj ksantin oksidaze leži u opasnosti koju produkti reakcije izazivaju, bilo da je u pitanju mokraćna kiselina, koja je nerastvorljiva, ili slobodni kiseonikovi radikali, aktivacija renin-angiotenzin sistema, hipertenzija ili mikro i makrovaskularne promene, koje su opisane u literaturi (Brown i sar., 1988; Borges i sar., 2002).

Aktivni centar enzima sadrži molibden sa koordinacionim brojem 5 formira kompleksan fragment deformisane kvadratnopiramidalne strukture preko kiseonika, dva donor atoma sumpora iz en-ditiolata, i kiseonika OH grupe (poglavlje 2.1.2.). Kao posledica sterne bliskosti, glutaminske kiseline 1261, mehanizam dejstva enzima uključuje nikelofilni napad Mo – OH grupe na supstrat sa pratećim transferom hidrida na Mo = S fragment, uz dvoelektronsku redukciju molibdenovog centra. Dvostepenom reoksidacijom, enzim uspostavlja početno oksidaciono stanje sa ugradnjom hidroksilne grupe u supstrat. Verovatno je u ovom procesu voda glavni izvor kiseonika, a ne molekulski kiseonik (slika 2.14).

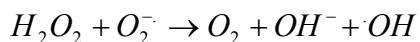
XO je široko rasprostranjena u organizmu sisara, najviše u mleku i u jetri. Konačni akceptor elektrona u fiziološkim uslovima kod XO je molekulski kiseonik, mada to može da bude i citohrom c, feritin ili metilensko plavo. U svojstvu redukujućih supstrata XO može da koristi više od stotinu različitih jedinjenja: purine i njima slična heterociklična jedinjenja, aldehyde, NADH. Kiseonik koji se uključuje u proizvod reakcije potiče od molekula rastvarača, a ne od molekulskog kiseonika, tako da prema tome XO spada u elektron-transportne oksidaze fakultativne u odnosu na kiseonik (Crichton, 2008.)

Ispitivanje ligadnog okruženja atoma metala kod XO je otežano time što se ni Mo ni Fe ne mogu zameniti drugim metalima koji bi se lakše spektroskopsi detektovali. Metodom EPR je pokazano da se kod XO inaktivirane metanolom Mo nalazi u obliku Mo(V), dok se oksidovani enzim u aktivnom obliku sadrži Mo(VI) (Боуден, 1978). Enzim iz koga je uklonjena flavinska komponenta zadržava dehidrogenaznu aktivnost u odnosu na supstrat ali nije u stanju da redukuje kiseonik. Na osnovu ovoga je zaključeno da flavin obrazuje centar za vezivanje kiseonika. Uloga Fe se sastoji u tome da akumulira redukujuće ekvivalente ili da učestvuje u njihovom prenosu između Mo i flavina.

Smatra se da enzim sadrži dva nezavisna katalitička centra. Molibden obrazuje centar za vezivanje redukujućih supstrata i u toku reakcije Mo(VI) se redukuju do Mo(V) i Mo(IV). Elektron se prenosi na krajnji elektron-donorski flavinski centar neposredno ili preko Fe-S fragmenta. Iako je flavin osnovni centar koji vezuje kiseonik (fiziološki konačni akceptor

elektrona), drugi akceptori elektrona se mogu vezivati na drugim mestima, fanazinmetosulfat se vezuje sa Mo, fericijanid sa Fe (Bouden, 1978).

U toku reakcije katalizovane sa XO kiseonik se redukuje do O_2^- i H_2O_2 (Mid, 1979; Halliwell i Gutteridge, 1984; Puttfareken i sar., 1993; Coudray i sar., 1993; Javouheydonzel i sar., 1993; Fujimoto i sar., 1995) koji preko reakcije Haber-Vajsa daju veoma reaktivan ·OH radikal (Gonzalezflecha i sar., 1993).



Neka ispitivanja su pokazala da u toku oksidacije sa XO dolazi i do stvaranja singletnog kiseonika (Steinbeck i sar., 1993). Superoksidni anjon radikal (O_2^-) sa NO (koji nastaje iz arginina delovanjem NO-sintetaze) daje veoma reaktivni peroksinitrit (Hogg i sar., 1993; Sies, 1993). Od svih ovih reaktivnih oblika kiseonika organizam se štiti odgovarajućim enzimima (superoksiddismutaza, katalaza, peroksidaze i dr.) i antioksidansima. Kada dođe do disbalansa između prooksidanasa (favorizuje ih enzim NADPH-oksidaza i NO-sintetaza (Sies, 1993) i antioksidanasa, tada dolazi do „oksidativnog stresa“ koji dovodi do oštećenja svih vrsta biomolekula, uključujući nukleinske kiseline, lipide, proteine i ugljene hidrate (Sies, 1993; Fukuzawa i sar., 1995; Lunch i Frei, 1993). Postoje podaci da se kiseonični radikal generisan u reakciji hipoksantina sa XO mogu uspešno primeniti kao agensi u terapiji kancera (Yoshikawa i sar., 1995).

2.6.2. Ksantin dehidrogenaza

Opšta molekulska struktura ksantin dehidrogenaze (XDH), iz različitih izvora, je veoma bliska strukturi XO iz mleka, razlika je u prisustvu –SH grupe. Njihova razlika u strukturi je odgovorna i za različito ponašanje ovih enzima u procesima transfera elektrona. Kod XO sisara u prvom redu je to kiseonik, dok kod XDH kiseonik uopšte nije akceptor elektrona.

NAD-zavisna ksantin dehidrogenaza (tip D), prisutna u zdravom tkivu sadrži Mo(V), elektrone uzete od supstrata predaje NAD^+ -u, pre nego molekulskom kiseoniku (Hiller i sar., 1995) koji predstavlja akceptor elektrona pri delovanju oksidazne forme enzima. Prevođenje dehidrogenazne u oksidaznu formu vrši se oksidacijom sulfidnih grupa (reverzibilna oksidacija i

aktivacija) (Kehrer i sar., 1987), kao i na račun porasta koncentracije intracelularnog Ca^{2+} koji aktivira kalcijum zavisne proteaze (kalpain) (McCord, 1985). Reverzibilna konverzija dehidrogenaze (XDH) u oksidaznu formu (XO) veoma je bitna i dešava za veoma kratko vreme (Jablonski i sar., 1983; Stripe i sar., 1969).

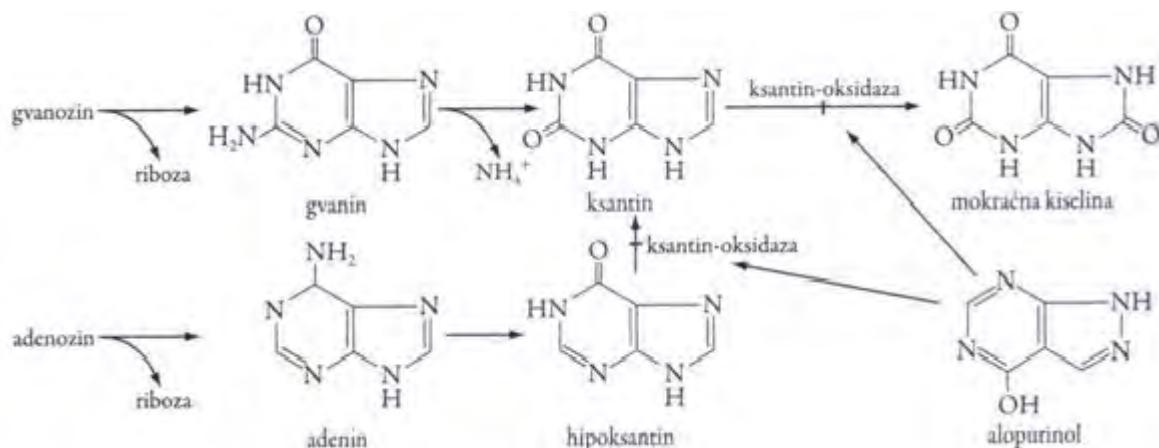
Enzim u jetri *in vivo* egzistira uglavnom u dehidrogenizovanom obliku ali se može prevesti u XO stajanjem na -20°C , tretiranjem sa proteolitičkim agensima u neorganskom rastvaraču ili sa tiolnim reagensima kao što su Cu^{2+} , N-etilmaleamid, 4-hidroksi-merkuribenzoat. Efekat tiolnih reagenasa se može anulirati sa tiolima kao što su 1,4-ditioerititol. Irreverzibilni proces podrazumeva odvajanje proteina koji sadrži 14 –SH grupa.

XDH se može prevesti u XO i pomoću enzima E.C.1.8.4.7. u prisustvu oksidovanog glutationa. Kod drugih životinjskih tkiva enzim se nalazi skoro potpuno u obliku XO ali se može prevesti u XDH sa 1,4-ditioerititolom. Konverzije XDH u XO u organizmu sa oštećenjima tkiva kiseoničnim radikalima veoma je bitna u metabolizmu purinskih baza i mokraćne kiseline (Demiling i sar., 1993; Gibson i sar., 1993; Cighetti i sar., 1993).

2.7. Alopurinol - inhibitor ksantin oksidaze

Alopurinol (1,5-dihidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-on), kompetitivni inhibitor ksantin oksidaze, je veoma značajan u metabolizmu purunskih baza, pa je otuda i dodeljena Nobelova nagrada za njegovo otkriće. Od tog vremena, giht i hiperurikemija predstavljaju oboljenje, tj stanje koje se može uspešno lečiti.

Od momenta otkrića, alopurinol je postao prototip inhibitora ksantin oksidaze i suvereni lek za terapiju gihta i drugih vidova primarnih i sekundarnih hiperurikemija. Alopurinol se metaboliše preko enzima ksantin oksidaze do aktivnog metabolita oksipurinola, koji je kompetitivni inhibitor ksantin oksidaze (slika 2.20.). Oxitipurinol pokazuje osobinu da se vrlo čvrsto vezuje za redukovana formu enzima, koju, takođe, inaktivira. U pogledu farmakokinetike leka, alopurinol se skoro kompletno metaboliše do oksipurinola, već nakon 2 časa od oralnog uzimanja, dok je eksrecija oksipurinola daleko sporija, on se ekskretuje putem bubrega već nakon 18–30 časova, kao posledica reapsorpcije na nivou tubula bubrega. Stoga se smatra da je oksipurinol odgovoran za većinu farmakološko-terapijskih efekata alopurinola. Terapijska doza se postiže nakon nekoliko dana tretmana (Bieberi i Terkeltaub, 2004; Borges i sar., 2002; Akdemir i sar., 2001).



Slika 2.20. Mehanizam dejstva alopurinola

2.8. Hiperurikemija

Hiperurikemija (povećani nivo mokraćne kiseline u krvi) je veoma čest poremećaj, koji može biti prouzrokovana nizom endogenih i egzogenih faktora. Klinički i patofiziološki se opisuje primarna i sekundarna hiperurikemija. Primarna hiperurikemija nastaje kao posledica urođenih metaboličkih grešaka sinteze purinskih baza, kada nema mogućnosti da se regulišu alosterijskim mehanizmima ključni enzimi sinteze purinskih nukleotida. Jedan od najznačajnijih predstavnika primarne hiperukemije (ali ne i najdramatičnijih) je giht, koji dovodi do degenerativno-zapaljenjskih promena na sitnim zglobovima šake i stopala. Nastaje kao posledica poremećaja u regulaciji sinteze purinskih baza. Sledеća urođena metabolička greška nastaje u slučaju nemogućnosti da se dostupne purinske baze ponovo iskoriste za sintezu purinskih nukleotida („salvage put“), kada dolazi do teških poremećaja u energetskom i purinskom metabolizmu, naročito mozga, pa se javlja teška i dramatična bolest- Lych-Nychan sindrom, takođe praćena hiperurikemijom (Khosla i sar., 2005; Alderman, 1999, Aldreman i Aiyer, 2004; Brown i sar., 1988). U hemijskom smislu mokraćna kiselina, bilo da je prisutna u keto ili enol formi, veoma je loše rastvorljiva u vodi. Lako se taloži u formi naranđastih kristala, u vidu soli urata („tophi urici“), a predilekcija taloženja prati zemljinu težu.

U poslednje vreme, pogotovo kada je ustanovljeno da su i granične vrednosti udružene sa pojavom hipertenzije, kardiovaskularnih oboljenja i taloženja mokraćne kiseline u aterosklerotičnim plakovima, definicija hiperurikemije se pomera ka nižim vrednostima mokraćne kiseline u krvi. Čak i evolucija pokušava da razgradnju purina dovede u vezu sa uspravnim hodom čoveka i direktnim efektima mokraćne kiseline na porast krvnog pritiska. Veza je u činjenici da je čovek jedini primat kod koga nema dalje razgradnje mokraćne kiseline do alantoina. Enzim koji neposredno dovodi do produkcije mokraćne kiseline u dvostepenoj reakciji katabolizma hipoksantina i ksantina je ksantin oksidaza (Alderman, 1999; Aldreman i Aiyer, 2004).

2.9. Metode određivanja aktivnosti enzima

Sve metode određivanja enzimskih aktivnosti u osnovi se temelje na istim principu. Enzim deluje na svoj specifični supstrat i nakon toga se meri koncentracija nastalog produkata reakcije ili smanjenje koncentracije supstrata. U praksi se najčešće meri nastali produkt jer je to lakše i uočljivije i osetljivost je veća. Time se zapravo određuje brzina enzimske reakcije odnosno aktivnost enzima ili katalitička koncentracija enzima.

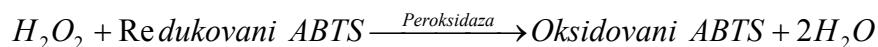
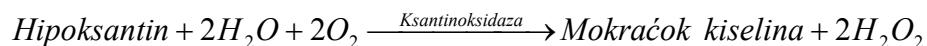
U odnosu na princip postoje dve grupe metoda za određivanje enzimske aktivnosti. U prvoj grupi metoda, koje su starije, serum ili neki drugi biološki materijal koji sadrži enzim inkubira se određeno vreme sa supstratom, onda se inkubacija prekida dodatkom nekog reagensa koji inaktivira enzim, a zatim sledi hemijska reakcija kojom se određuje koncentracija nastalog produkta reakcije. Kod ovakvih metoda se merenje vrši jedanput nakon tačno određenog vremena inkubacije tako da se nazivaju metodama jedne tačke.

Kod druge grupe metoda, koje imaju prednost, meri se početna brzina delovanje enzima i nazivaju se još i kinetičkim metodama. Ispravnije je reći da su to metode kontinuiranog merenja jer se merenje vrši kontinuirano tokom prvih nekoliko minuta delovanja enzima. Ove metode su se mogle razviti tek posle pronalaska odgovarajućih sintetičkih supstrata iz kojih nastaju reakcioni produkti koji se mogu odmah meriti bez ikakvih daljih hemijskih reakcija.

2.9.1. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode se široko primenjuju u biohemiskim ispitivanjima. Mnogi supstrati i proizvodi enzimskih reakcija apsorbuju svetlost, bilo u UV ili VIS oblasti spektra. Prisustvo dvostrukih veza, aromatskog prstena ili drugih hromoformnih grupa u molekulu se jasno uočava na spektru date supstance. Retko se dešava da supstrati i proizvodi date enzimske reakcije imaju identične apsorpcione spekture, nije teško naći takvu talasnu dužinu na kojoj dolazi do značajne promene apsorpcije u toku reakcije. Merenje veličine takve promene omogućava kvantitativno proučavanje takve enzimske reakcije. Za merenje je potreban spektrofotometar za UV ili VIS oblast. Spektrofotometrijskim metodama se mogu lako pratiti aktivnosti svih enzima iz grupe oksidoreduktaza (Jark, 1989; Smith i sar., 1992; Chatt i sar., 1980; Hardi i sar., 1978).

Pri određivanju aktivnosti oksidaza se veoma često u indikatorskoj reakciji koristi akceptor elektrona koji je u redukovanim oblicima bezbojan, a pri oksidaciji prelazi u obojeno jedinjenje ili obrnuto. Oksidaze koje kao akceptor koriste O_2 grade H_2O_2 koji se može odrediti u prisustvu hromogena pomoću reakcije koju katalizuje peroksidaza ili katalaza. Aktivnost ksantin oksidaze se može odrediti sa urikazom kao pomoćnim i peroksidazom kao indikatorskim enzimom (Majkić – Singh i sar., 1987).



Ovom prilikom nastaje plavo-zeleni obojeni katjon-radikal ABTS-a (3-etilbenztiazolin-6-sulfonska kiselina), čija je apsorpcija izmerena na 410 nm direktno proporcionalna aktivnosti enzima. Aktivnost peroksidaze se može odrediti u prisustvu H_2O_2 , fenola i 4-aminoantipirina merenjem apsorpcije na 500 nm, pri čemu se stvara purpurno obojeni hinonimin. Prednost ove metode je u tome što je 4-aminoantipirin ne škodljiv za razliku od hromogena tipa *o*-anizidina koji su kancerogeni (Zaharova i sar., 1988, Kocić i sar., 2010; Kocić i sar., 2003).

2.9.2. Fluorimetrijske metode

Fluorescencija ili fosforescencija je apsorpcija svetlosti od strane molekula u jednom delu spektra, koja je praćena emitovanjem svetlosti u opsegu većih talasnih dužina (manjih energija) (Freifelder, 1976). U mnogim slučajevima fluorimetrijski metod (metod fluorescentne spektroskopije) (Dixon i sar., 1979; Freifelder, 1976; Cantor i sar., 1980; Ngo i sar., 1985) je osjetljiviji i ima niz prednosti u odnosu na spektrofotometrijskim. Jedna od prednosti je u tome što je za registrovanje parametara fluoroscencije potrebna manja količina supstance. Pošto flavinska jedinjenja samo fluoresciraju u oksidovanom obliku, a gube fluorescenciju u redukovanim oblicima, dok NAD i NADP ne fluoresciraju u oksidovanom obliku ali imaju plavu fluorescenciju u redukovanim oblicima, ovaj osjetljivi metod se može koristiti za praćenje toka enzimskih oksidoredukcionih reakcija.

2.9.3. Polarimetrijske metode

Kod polarimetrijskih metoda se meri skretanje ravni polarizovane svetlosti (α)D20. Do promene veličine skretanja ravni polarizovane svetlosti tokom reakcije dolazi kada u enzimskim reakcijama nastaju optički aktivni produkti. (Meyer i sar., 1994)

2.9.4. Viskozimetrijske metode

Viskozimetrijske metode za određivanje aktivnosti enzima i praćenja toka enzimskih reakcija se mogu primeniti u slučajevima kada u toku reakcije dolazi do izražene promene viskoziteta. Do toga dolazi kod reakcija hidrolize jedinjenja velike molekulske mase, polisaharida, proteina, nukleinskih kiselina i dr. (u toku reakcije se viskozitet smanjuje) ili kod reakcija siteze ovakvih jedinjenja (kod ovih reakcija dolazi do povećanja viskoziteta). (Wolfe i sar., 1994; Brittain i sar., 1992).

2.9.5. Hemijske metode

Hemijske metode zasnivaju se na kvantitativnom određivanju promene količine reaktanata ili proizvoda reakcije. Kod hemijskih metoda u užem smislu se količina supstrata ili proizvoda određuje se najčešće volumetrijskim metodama. U širem smislu kod hemijskih metoda se supstrat ili proizvod pomoću različitih hemijskih reakcija prevode u takva jedinjenja koja se lako i brzo direktno određuju kolorimetrijskim, spektrofotometrijskim ili drugim instrumentalnim metodama određivanja.

2.9.6. Radiohemijijske metode

Kod radiohemijijskih metoda za određivanje aktivnosti se kao jedan od supstrata koristi reagens sa radioaktivnim izotopom obeleženim delom molekula, koji se inkorporira u jedan od proizvoda reakcije. Najvažnija faza kod ovih metoda je razdvajanje obeleženih radioaktivnih proizvoda reakcije od zaostalog radioaktivnog supstrata i ova faza najduže traje i unosi najveću

grešku u konačni rezultat. Da bi se koristile dosta skupe i složene radiohemiske metode, potrebno je da one imaju značajne prednosti u odnosu na druge metode koje se isto mogu upotrebiti.

2.9.7. Hromatografske metode

Nekada nema adekvatnih metoda za kvantitativno određivanje jednog od reaktanata ili proizvoda reakcije zbog smetnji od strane drugog reaktanta ili proizvoda prisutnog u reakcionaloj smeši u datom trenutku. U tom slučaju potrebno je izvršiti odvajanje supstance koja će se kasnije kvantitativno određivati od drugih komponenata reakcione smeše. Za odvajanje se najčešće koriste hromatografske metode, papirna ili tankoslojna hromatografija.

Hromatografske metode spadaju u grupu periodičnih metoda (metode sa uzimanjem proba). U određenom vremenskim intervalima, od početka reakcije, iz reakcione smeše uzimaju se probe, nanose na hromatografski papir, suše i hromatografiraju. Glavni nedostatak klasičnih hromatografskih metoda je u tome što čitava procedura zahteva dosta vremena, naročito sam proces hromatografiranja. Zbog toga se (klasične) hromatografske metode primenjuju samo u slučajevima kada nema drugih pogodnih metoda. Savremene hromatografske metode uključuju primenu veoma osetljivih, efikasnih i brzih automatskih uređaja. To su visoko-efikasna tečna hromatografija (HCLP).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Program i metodika eksperimentalnog rada

Efekti hronične intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb, Cu) i protektivna uloga suplemenata S–donor liganada proučavani su preko aktivnosti ksantin oksidaze jetre i bubrega na model sistemu beli pacovi Wistar soja, ženskog pola.

Eksperimentalni rad obuhvatio je sledeće faze:

I faza:

- *in vivo* ispitivanja na model sistemu eksperimentalnih životinja, belih pacova Wistar soja, ženskog pola, starost 6 nedelja i njihova hronična intoksikacija u određenim vremenskim intervalima u periodu od 3 nedelje,
- priprema biomaterijala za ispitivanje jetre i bubrega (dekapsuliranje, konzervacija, čuvanje) i pravljenje homogenate, supernatanta, od kojih se uzimaju alikvoti za analize
- preliminarna ispitivanja lipridne peroksidacije, određivanje koncentracija TBA regujućih supstanci u homogenatu, po spektrofotometrijskom metodom po Andreevoj i sar. (Andreeva i sar., 1988),
- meranje aktivnosti ksantin oksidaze/dehidrogenaze spektrofotometrijski po metodi Hashimoto i sar. (Hashimoto i sar., 1974),
- merenje sadržaja proteina u tkivima unutrašnjih organa po metodi Lowrey-a i sar. (Lowry i sar., 1951) spektrofotometrijski,

II faza:

- *In vitro* ispitivanja intoksikacije teškim metalima (Pb, Cd i Cu) sa komercijalnim preparatima (ksantin oksidaza),

III faza:

- Merenje aktivnosti ksantin oksidaze u tkivu jetre i bubrega, u uslovima eksperimentalne hiperurikemije.

3.2. In vivo ispitivanja

Model sistem za ispitivanje uticaja izloženosti kadmijumu, olovu i bakru bila je studija na belim (albino) Wistar pacovima ženskog pola, starosti 2 meseca, prosečne težine 200-300 grama. Životinje su čuvane u grupama u metalnim kavezima ($55 \times 35 \times 30$ cm) i aklimatizovane na laboratorijske uslove sa ventilacionim sistemom i ambijentalnom temperaturom $T=22 \pm 2^\circ\text{C}$ (Sayeda i sar., 2009). Vlažnost vazduha $50 \pm 5\%$ i 12:12 h ciklus svetlosti: tama sa početkom svetlog perioda u 8.00h održavani su konstantno.

Eksperimentalne životinje su gajene u laboratorijskim uslovima, u kojima su im hrana i voda bili dostupni *ad libitum*, u vivarijumu Medicinskog fakulteta u Nišu, Srbija, podeljene u 12 grupa od po 6 životinja.

Tabela 3.1.. Pregled grupa eksperimentalnih životinja

Grupe	Metali/suplementi					
	Cd	Pb	Cu	LA	GSH	Kontrola
I	+					
II				+		
III					+	
IV		+				
V				+		
VI					+	
VII			+			
VIII				+		
IX					+	
X				+		
XI					+	
XII						+

Grupa XII (kontrolna grupa) je bila na normalnom režimu ishrane i života. Grupe životinja I, IV i VII su intoksicirane bakar(II)-sulfatom $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, olovo(II)-acetatom $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, odnosno kadmijum(II)-hloridom CdCl_2 . Grupe II, III, V, VI, VII i IX su uz

bakar(II)-sulfat, odnosno olovo(II)-acetat, ili kadmijum(II)-hlorid dobijale i odgovarajući suplemente liponsku kiselinu, odnosno, glutataion. Grupa životinja X je uz normalnu ishranu dobijala suplement liponsku kiselinu. Grupa XI je uz normalan režim ishrane dobijala suplement glutation. Pri eksperimentalnom radu u potpunosti je poštovan Etički kodeks naučnoistraživačkog rada Medicinskog fakulteta u Nišu.

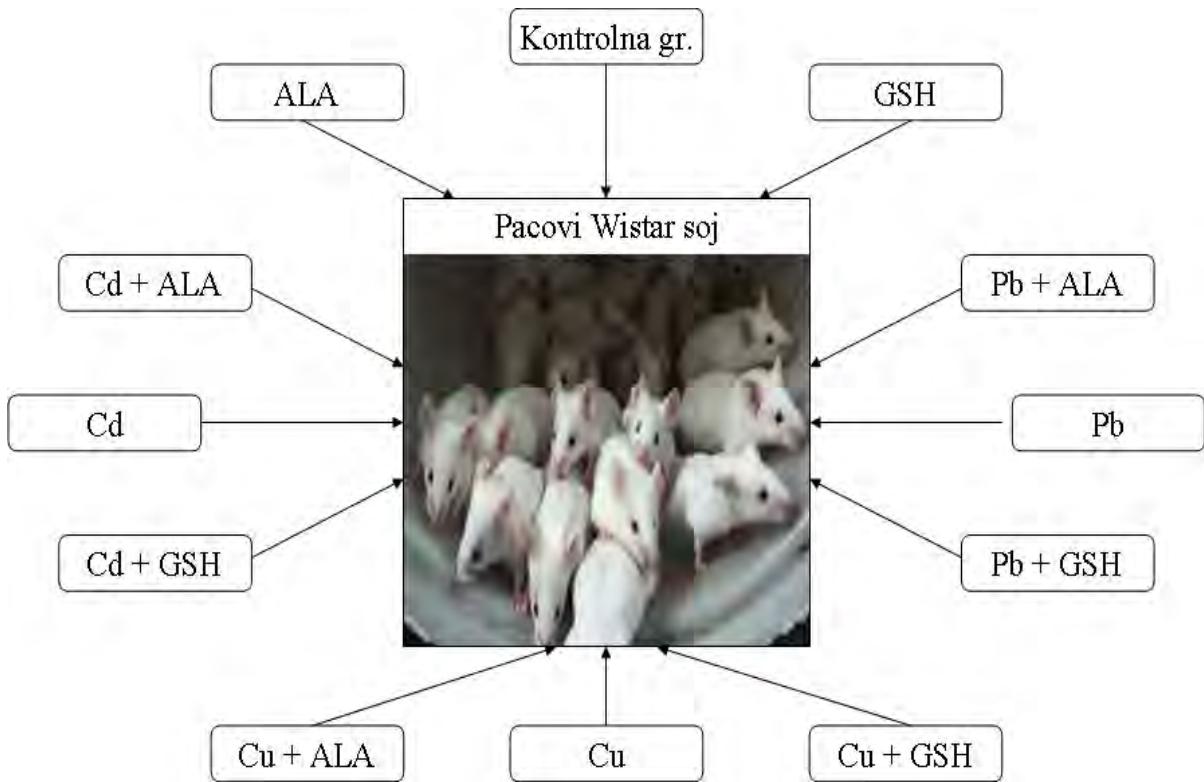
3.2.1. Intoksikacija teškim metalima i dodatak suplemenata

U toku 3 nedelje trajanja eksperimenta životinje su dozirano intoksicirane subkutanom injekcijom (s.c.) bakar(II)-sulfatom u fiziološkom rastvoru, subletalnom dozom od 21 mg po životinji raspoređenih u 7 ravnomernih doza (Alexandrova i sar., 2008).

U toku 3 nedelje trajanja eksperimenta životinje su dozirano intoksicirane intraperitonealnom injekcijom (i.p.) olovo(II)-acetatom u fiziološkom rastvoru, subletalnom dozom od 21 mg po životinji raspoređenih u 7 ravnomernih doza (Annabi i sar., 2007; Ponce-Canchihuaman i sar., 2010).

Intoksikacija kadmijumom izvedena je za 5 dana u dve doze s.c. injekcijama od po 0,9 mg kadmijum(II)-hlorida u fiziološkom rastvoru po životinji (Deepti i sar., 2010).

Suplementi liponska kiselina, odnosno glutation su dozirani i.p. injekcijom u ukupnoj dozi od 2,4 mg, odnosno 4 mg u fiziološkom rastvoru po životinji (7 doza za 21 dan) (Fuke i sar., 1972; James i sar., Medical associates). Sve hemikalije su bile čistoće p.a., proizvođača Merck. Kontrolna grupa, u kojoj su pacovi intraperitonealno dobijali fiziološki rastvor u trajanju od 21 dan, a pauza je pravljena na svaka tri dana.



Slika 3.1. Šematski prikaz intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb i Cu) i davanje suplemenata (ALA i GSH) pacovima Wistar soja parenteralnim putem

Sve procedure su obavljene nakon anestezije pacova ketalarom (35 mg/kg telesne mase) u skladu sa principima žrtvovanja u laboratorijama. Uzorci krvi dobijeni su iz abdominalne aorte heparinizovanim špricem za određivanje hematoloških parametra. Nakon žrtvovanja životinja su, posle medijalne laparatomije, vađeni pojedini organi kao što su: jetra, bubrezi, mozak i pankreas, koji su nakon ispiranja u fiziološkom rastvoru, dekapsulirani, zamrzavani na -20°C i kasnije korišćeni za pravljenje homogenata. Homogenizovanje je vršeno na ledu teflonskim tučkom K Ultra Turrax® IKA® T18 basic homogenizera (slika 3.3.) u fiziološkom rastvoru kao medijumu. Iz 10% homogenata tkiva jetre, bubrega, mozga i pankreasa spremljenih u odgovarajućem medijumu rađena su sledeća istraživanja: analize određivanja aktivnosti XO i XHD (Hashimoto i sar., 1974), vrednost ukupnih proteina (Lowrey i sar., 1951; Setaro i sar., 1977). Biohemski reagensi su bili spektroskopske čistoće proizvođača Sigma–Aldrich.

3.3. Preliminara ispitivanja lipidne peroksidacije, MDA

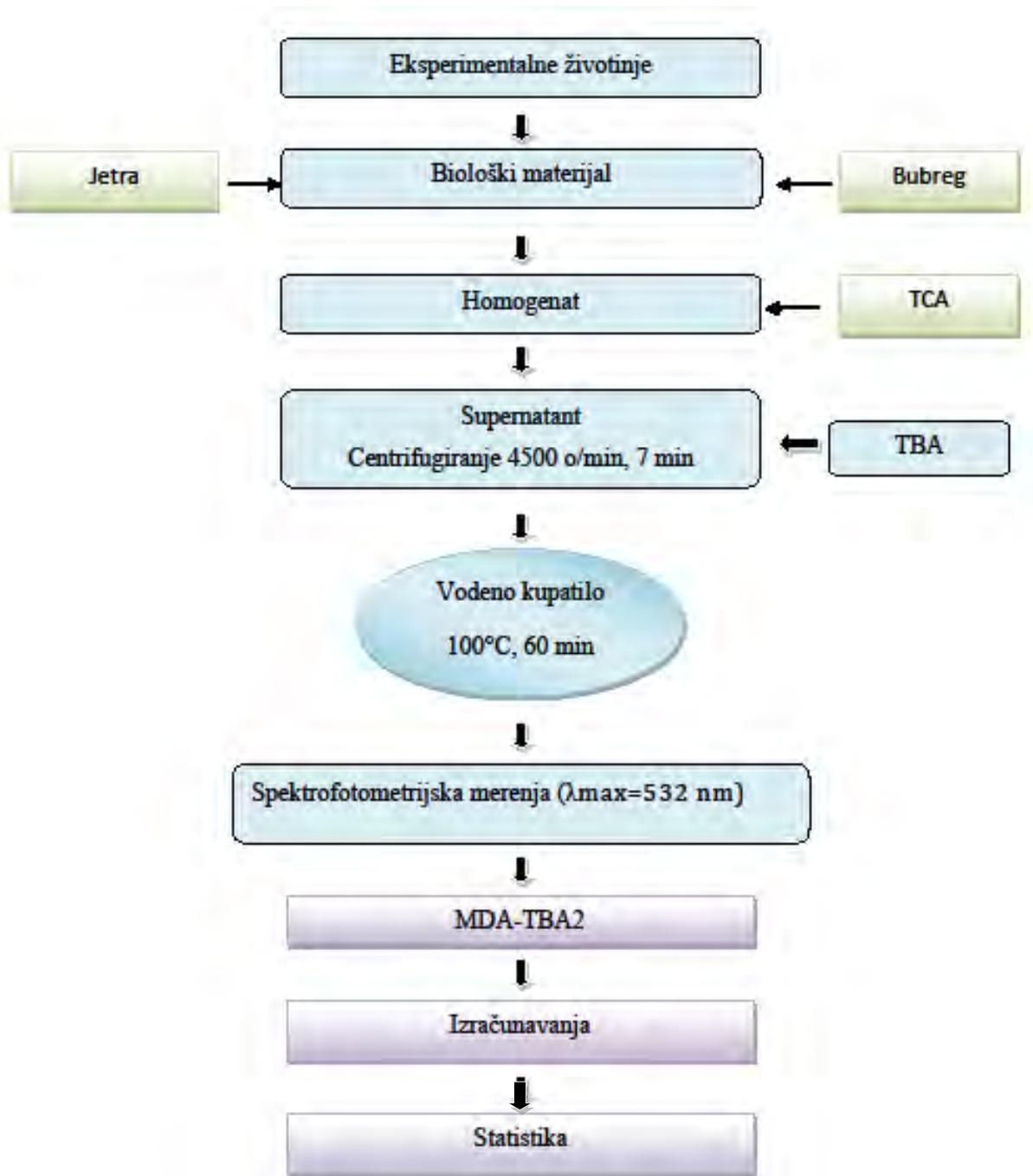
Preliminarna ispitivanja su vršena na model sistemu eksperimentalnih životinja, belih pacova Wistar soja, ženskog pola, starost 6 nedelja i njihova hronična intoksikacija u određenim vremenskim intervalima u periodu od 3 nedelje. Intenzitet lipidne peroksidacije u tkivima predstavljen kao koncentracija TBA regujućih supstanci u homogenatu, određivana je spektrofotometrijskom metodom po Andreevoj i sar. (1988), koja je bazirana na reakciji MDA sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA), na visokoj temperaturi i kiseloj sredini, pri čemu nastaje hromogen (MDA-TBA2), a intenzitet boje se čita na 532 nm (Andreeva i sar., 1988).

3.4. Tehnike i metode primenjene u procesu praćenja efekata intoksikacije teškim metalima

Efekti izloženosti teškim metalima mogu se pratiti različitim tehnikama i metodama analize različitih bioloških i biohemijskih uzoraka. Isti se mogu pratiti merenjem sadržaja metala u biološkim tečnostima (plazma, pljuvačka, urin, likvor, želudačni sok, znoj, suze, amnionska i sinovijalna tečnost) i tkivima pojedinih organa (jetra, bubrezi, mozak, pankreas i slezina). Ova merenja se izvode atomskom apsorpcionom analizom (AAS), emisionom spektrografijom (ICP-OES) i potenciometrijskom striping analizom (PSA).

3.4.1. Uticaj temperature

Razne modifikacije metoda za određivanje aktivnosti enzima uključivale su razne temperature na kojima se vrši inkubacija. U početku se radilo na temperaturi od 37°C (preporuka Skandinavskog društva za kliničku hemiju), a zatim na 25°C (preporuka Nemačkog društva za kliničku hemiju), zatim na 30°C (preporuka Odbora za standardizaciju IFCC-a iz 1974. godine), a ponekad i na 35°C. Budući da brzina hemijske reakcije zavisi od temperature to se rezultati merenja na različitim temperaturama potpuno različiti. Zato se dugo nastojalo da se na međunarodnom nivou ujednače temperature.



Slika 3.2. Šematski prikaz postupka za određivanje MDA

3.4.2. Jedinice za izražavanje enzimske aktivnosti

Ranije su se rezultati istraživanja enzimskih aktivnosti izražavale u raznim jedinicama. Svaki autor je obično za svoju metodu davao i identifikaciju svoje jedinice koje su i dobijale nazive po svojim autorima. Ovo je dovelo do toga da nije bilo moguće upoređivati dobijene rezultate koji su dobijeni različitim metodama i koji su izraženi u različitim jedinicama. Zato je odbor za enzime IUB-a godine 1964 preporučio da se uvede tzv. enzimska jedinica koja je definisana kao: jedna enzimska jedinica (U) je aktivnost određenog enzima koja u jednom minuti katalizuje promenu 1 µmol supstrata. U serumu se izražava na 11 (U/l). Sobzirom da je jedinica za razne enzime iste ona daje uvid u međusobne aktivnosti raznih enzima.

Pored enzimske jedinice postoji još jedna jedinica, novija, za izražavanje enzimske aktivnosti, katal. Jedan katal odgovara aktivnosti enzima koja u jednoj sekundi katalizuje promenu jednog mola supstrata.

$$1\text{U} = 1 \mu\text{mol}/\text{min} = 1/60 \mu\text{mol}/\text{s} = 1/60 \mu\text{kat} = 16,67\text{nkat}$$

3.5. Praćenje enzimske aktivnosti i određivanje vrednosti proteina

Za određivanje aktivnosti XO i XDH u tkivima jetre i bubrega, korišćen je 10% homogenat. Homogenat je centrifugiran ha 12000 o/min, 4°C, 30min i na taj način je dobijen supernatant, koji je pogodan za praćenje dehidrogenazne aktivnosti. Metoda se zasniva na određivanju ksantin oksidaze, koja katalizuje reakciju u prisustvu molekulskog kiseonika, kao i ukupne ksantin oksidaze i dehidrogenaze, kada se dodaje NAD kao akceptor elektrona dehidrogenazne reakcije. Kako nije moguće ukloniti kiseonik iz sistema dobijena vrednost je predstavljala ukupnu ksantin oksidoreduktaznu aktivnost (XOD). Od nje je oduzimana vrednost ksantin oksidaze i dobijana je aktivnost ksantin dehidrogenaze (XDH).

Izvodjenje metode za ksantin oksidazu se vršilo tako što su uzeti su uzorci za analizu i kontrolu XO. Zatim su uzorcima dodavani tris HCl, tris ksantin i ledena HClO_4 uz odgovarajući period hlađenja (-20°C, 15min) i zagrevanja (37°C, 30min). U daljem postupku je vršeno centrifugiranje na 5000 o/min, 10 min i iz dobijenog supernatanta vršena su spektrofotometrijska merenja. Za određivanje ukupnog enzima (XOD) dobijenom supernatantu iz homogenata dodavan je tris NAD, tris ksantin i hladna HClO_4 uz odgovarajući period hlađenja (-20°C, 15min) i zagrevanja (37°C, 30min). U daljem postupku je vršeno centrifugiranje na 5000 o/min, 10 min i iz dobijenog supernatanta vršena su spektrofotometrijska merenja.

Spektrofotometrija je apsorpciona metoda koja se zasniva na proučavanju zavisnosti apsorbance ili apsorptiviteta od talasne dužine zračenja koje je prošlo kroz analiziranu supstancu. Apsorpcija se može pratiti kako u UV i VIS oblasti tako i u IC, mikrotalasnoj i radiofrekventnoj oblasti. Spektrofotometrija je kvalitativna i kvantitativna metoda. Kvalitativna analiza se zasnivana činjenici da apsorpcioni spektar supstance zavisi od njenog sastava i strukture. Kvantitativna analiza se zasniva na Beerovom zakonu: $A = a \times b \times c$. Kako je kod spektrofotometra b jednako debljini kivete i konstantno to apsorbanca zavisi samo od koncentracije i apsorptiviteta. Veoma bitno je da se merenja vrše sa najvećom mogućom tačnošću i osetljivošću (Todorović i sar., 1997). U ovoj studiji korišćena je maksimalna talasna dužina od 293nm.

U ovoj studiji snimanje je vršeno naspektrofotometru Beckman D® 530, DNA/Protein Analyzer prikazanom na slici 3.4.

Aktivnost enzima je izražavana u internacionalnim jedinicama na gram proteina (U/g proteina).



Slika 3.3. Homogenizer K Ultra Turrax® IKA® T18 basic

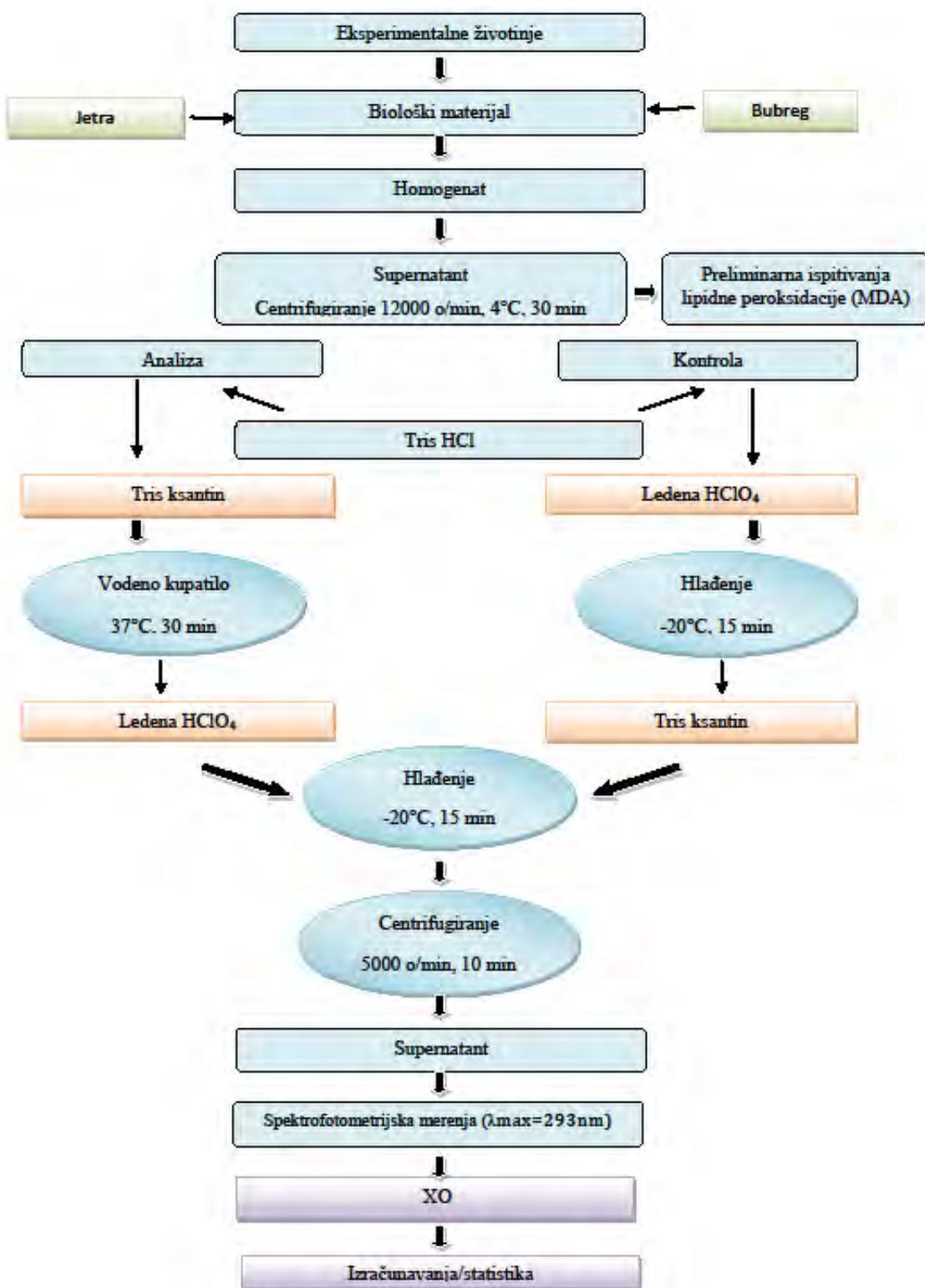


Slika 3.4. Spektrofotometar Beckman D® 530, DNA/Protein A

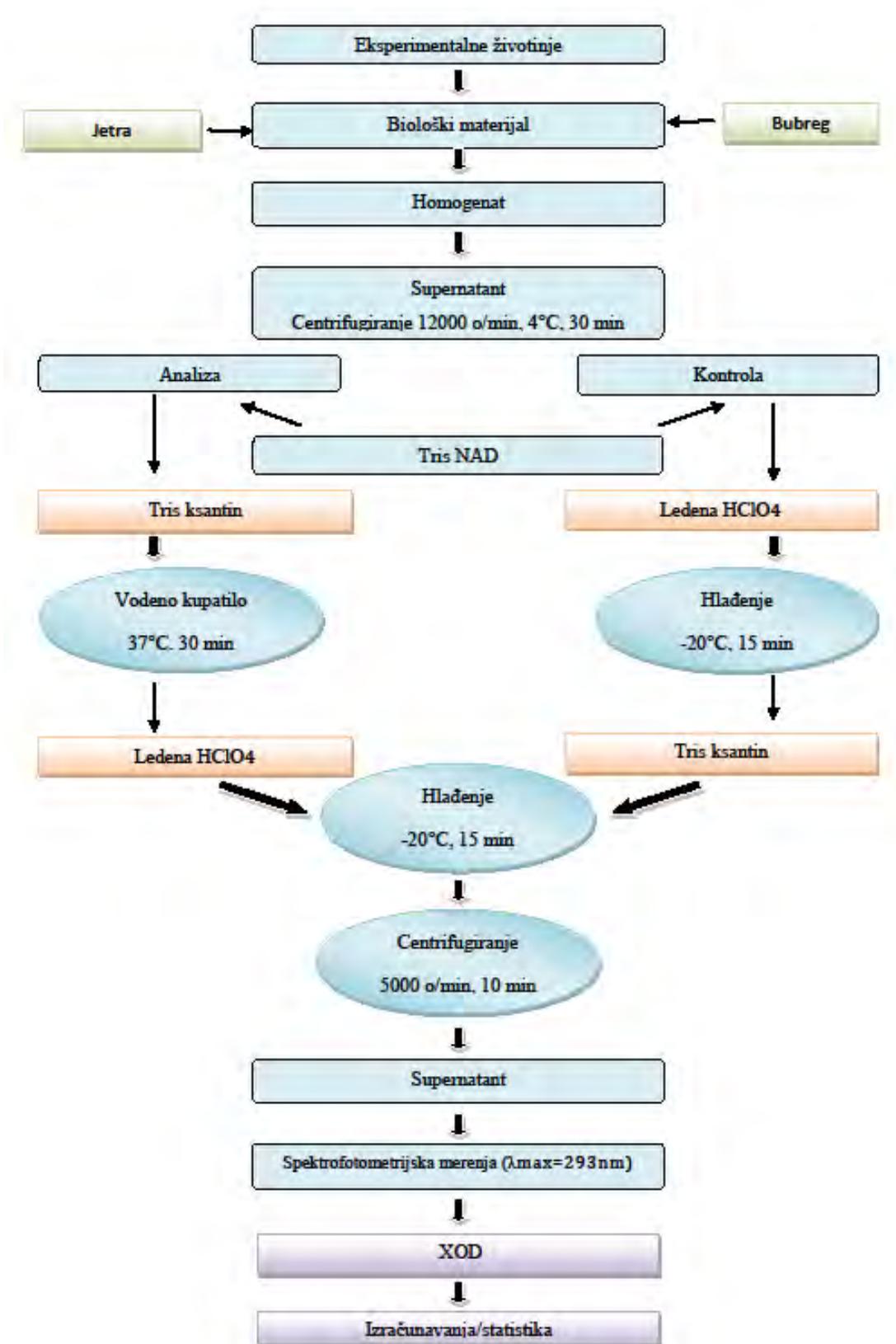
3.6. Hemikalije

Korišćene hemikalije su p.a. čistoće. Kao soli metala (Cu, Pb i Cd) korišćeni su sulfati, acetati i hloridi proizvođača Merck Darmstadt. Farmaceutski preparati (alopurinol i oksonska kiselina) su korišćeni u ovom ispitivanju. Oksonska kiselina je nabavljena od firme Sigma Aldrich, dok su Alopurinol kapsule nabavljene od firme Hemofarm Koncern "Zorka Pharma" Srbija. Korišćena je liponska kiselina kao potencijalni ligand proizvođača Acta Medica, Frankfurt (Germany). Za određivanje XO i XOD korišćeni su 0.1M tris HCl (pH=7,8), tris ksantin, tris NAD i koncentrovana HClO_4 .

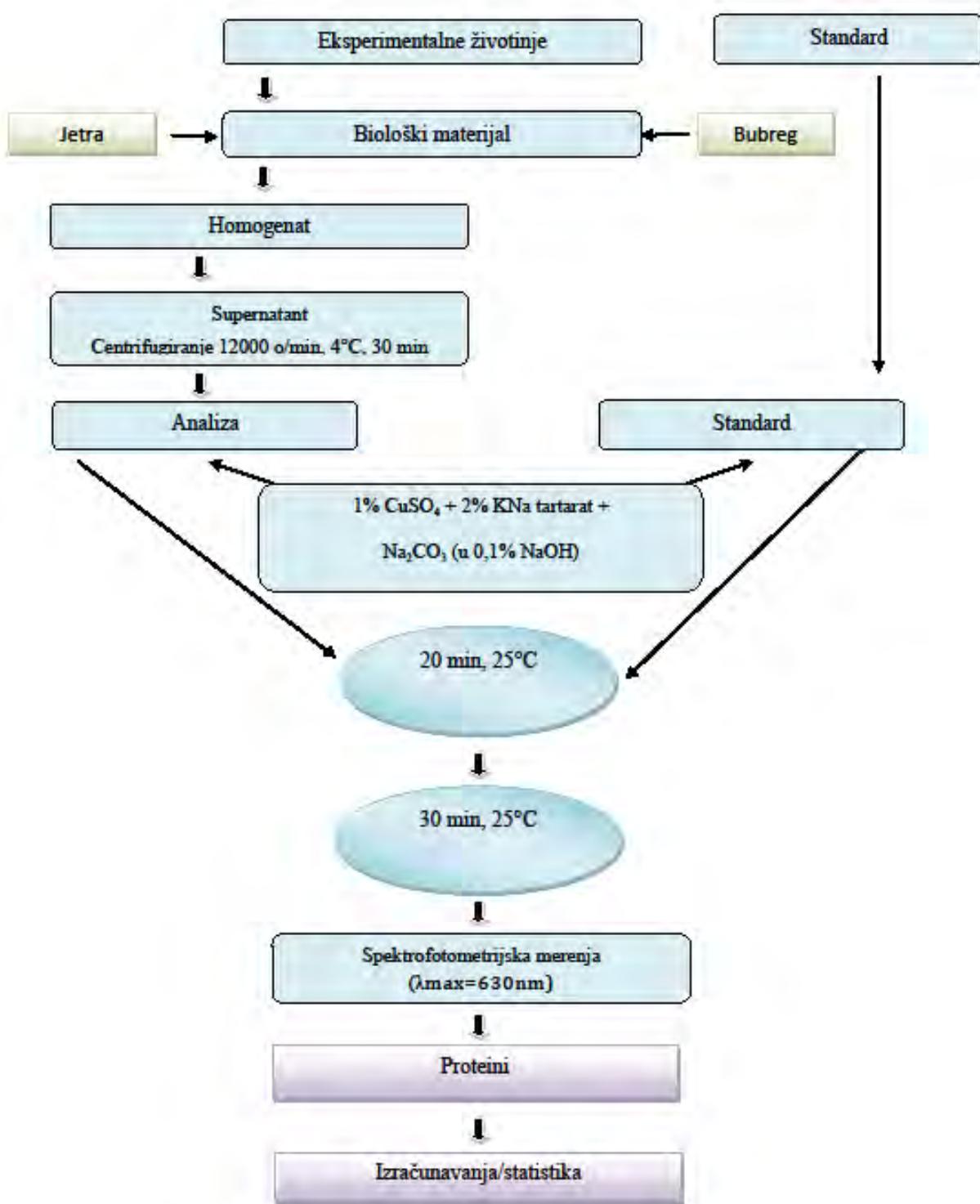
Za određivanje sadržaja proteina korišćen je „reagens C“ ($1\% \text{ CuSO}_4 + 2\% \text{ KNa-tartarat} + \text{Na}_2\text{CO}_3$ u $0,1\%\text{NaOH}$) i folin. Za određivanje MDA korišćeni su TCA i TBA (tiobarbiturna kiselina). Za *in vitro* ispitivanja korišćen je Komercijalni enzim XO (XO proizvođača Sigma-Aldrich).



Slika 3.5. Šematski prikaz postupka za određivanje aktivnosti XO



Slika 3.6. Šematski prikaz postupka za određivanje aktivnosti XOD



Slika 3.7. Šematski prikaz određivanja proteina

3.7. *In vitro* ispitivanja

In vitro ispitivanja spadaju u grupu pretkliničkih ispitivanja zajedno sa *in vivo* ispitivanjima na životinjama, koja prethode liničkim ispitivanjima. *In vitro* ispitivanja predstavljaju zamenu životinjskih modela i jasne su smernice za pretkliničke studije na životinjama. U *in vitro* ispitivanjima koriste se prečišćeni enzimi, u ovoj studiji to je XO kao komercijalni čist enzim.

Prednosti *in vitro* istraživanja jesu opravdanost i ponovljivost vršenja pretkliničkih ispitivanja, da se na taj način ispituje proteomik tj. efekat na strukturu enzima, kao i činjenica da se radi sa čistim enzimom tako da je izbegnut efekat drugih metabolita u interakciji sa enzimom.

Nedostaci *in vitro* ispitivanja jesu da ta ispitivanja su predikcija za *in vivo* ispitivanja i da ne može da se reperkuju situacija *in vivo*, kao i to da nisu prisutni drugi enzimi koji učestvuju u homeostazi kao u *in vivo* ispitivanjima tako da nije prisutno kvantitativno procenjivanje.

Za određivanje aktivnosti XO *in vitro* korišćen je čist komercijalni enzim proizvođača Sigma–Aldrich. Preinkubacija je vršena sa enzimom i odgovarajućim puferom i dodavani su teški metali ili suplement, kao i njihova kombinacija (metal+suplement). Inkubacija je vršena na temperaturi od 37°C u trajanju od 2h. Zatim je enzimu dodata perhlorna kiselina, tris ksantin, centrifugirano 10 minuta na 5000 o/min na +40°C. Merenja su vršena na spektrofotometru Beckman DU 530 spektrofotometar ($\lambda=293$ nm).

3.8. Merenje aktivnosti ksantin oksidaze u uslovima eksperimentalne hiperurikemije

Za eksperiment su korišćeni beli pacovi Wistar soja, ženskog pola, tri meseca starosti. Životinje su bile podeljene u četiri eksperimentalne grupe, u odnosu na desetodnevni tretman: I grupa je dobijala oksonsku kiselinu rastvoren u vodi svakodnevno u dozi od 100 mg koja izaziva hiperurikemiju, i ovu grupu je činilo 7 životinja.

II grupa je dobijala oksonsku kiselinu u istoj dozi i istom trajanju, ali i allopurinol, kao lek, rastvoren u vodi, u dnevnoj dozi od 20mg. Ova grupa je imala 6 životinja.

III grupa je primala samo allopurinol u istom trajanju i istoj dozi. Ova grupa je imala 6 životinja.

IV grupa je bila kontrolna i činilo je 7 životinja na standardnoj laboratorijskoj hrani, kao i vodi *ad libitum* (Tabela 3.2.).

Tabela 3.2. Pregled eksperimentalnih grupa životinja model sistema za ispitivanje aktivnosti XO u uslovima hiperurikemije

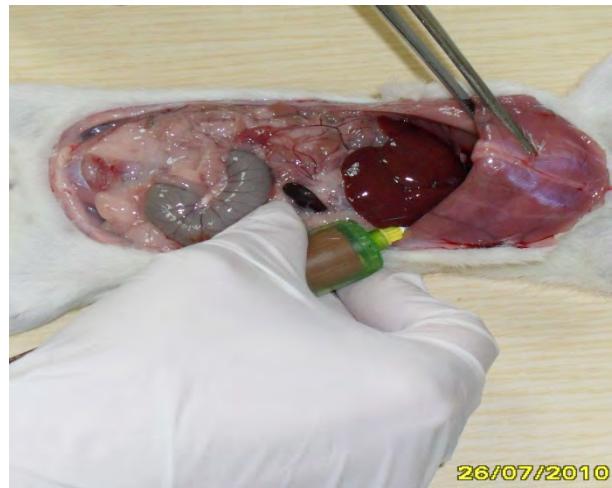
Eksperimentalne grupe n=4	Oksonska kiselina	Allopurinol	Kontrola
Ig	+		
IIg	+	+	
IIIg		+	
IVg			+

3.9. Statistička analiza

Svi rezultati merenja prikazani su kao srednja vrednost \pm SD. Za statističku obradu rezultata primenjen je Student-ov t-test za nezavisne uzorke (Microsoft Office Excel) i ORIGIN 8. Statistički značajni rezultati prikazani su kao $p<0,01$; $p<0,05$ i $p<0,1$. Rezultati ovih analiza su prikazani tabelarno i grafički (histogram).



a)



b)



c)



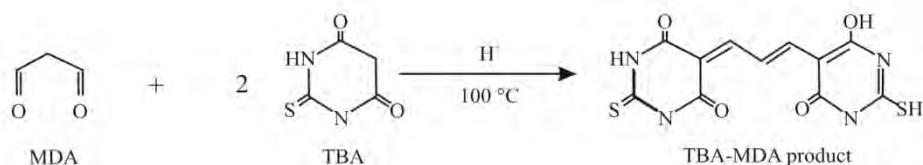
d)

Slika 3.8. Pacovi Wistar soja: a,) Gajenje,čuvanje i ishrana; b) uzimanje biološkog materijala; c, d) uzimanje pojedinih organa za pravljenje homogenata

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Preliminarni rezultati ispitivanja toksičnog dejstva teških metala

Lipidna peroksidacija je pokazatelj efekta delovanja reaktivnih kiseonikovih vrsta i reperkusije na biomolekule, (u ovom slučaju na lipidne komponente, tačnije, nezasićene masne kiseline) u ćelijama i tkivima. (poglavlje 2.4.1.) U preliminarnim ispitivanjima praćena je koncentracija malondialdehida (MDA), sekundarnog produkta lipidne peroksidacije koji se koristi kao indikator za praćenje oštećenja ćelijskih membrana kod oksidativnog stresa, jetre i bubrega u uslovima intoksikacije kadmijumom i olovom uz dodatak glutationa kao suplementa, tabela 4.1. i 4.12.



Slika 4.1. Reakcija građenja obojenog produkta TBA-MDA (Atasayar i sar., 2004)

Tabela 4.1. Nivo malondialdehida (MDA) u različitim organima u uslovima akutne intoksikacije kadmijumom i protektivna uloga glutationa.

Eksperimentalne grupe n=4	MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	
	Jetra	Bubreg
Kontrola	$0,45 \pm 0,14$	$0,48 \pm 0,06$
Kadmijum (Cd)	$2,20 \pm 0,22$	$1,83 \pm 0,19$
Cd + GSH	$1,06 \pm 0,08$	$0,58 \pm 0,20$
GSH	$0,40 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,16$

U grupi eksperimentalnih životinja u kojoj je uz kadmijum aplikovan i glutation kao suplement značajno je smanjena koncentracija TBARS (od $2,20 \pm 0,22$ na $1,06 \pm 0,08$ u jetri), (od $1,83 \pm 0,19$ na $0,58 \pm 0,20$ u bubrežima) u odnosu na grupu koja je trovana kadmijumom, što se može videti u tabeli 4.1.

Obzirom da glutation deluje antioksidativno, bilo direktno ili preko GSH peroksidaze / GSH sistema, rezultati ovih istraživanja koreliraju sa postojećim podacima, gde primena glutationa uz kadmijum, dovodi do smanjenja nivoa TBARS, verovatno zbog unošenja

suplemenata sa slobodnim –SH grupama. Za aktivni centar glutationa (–SH) i donor atoma (–S, –N i –O) vezuje se kadmijum i tako se umanjuje njegovo proksidativno dejstvo (Jian-Ming i sar., 2003). Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da je nivo lipidnih peroksida značajno smanjen u uslovima dodavanja suplemenata GSH dan nakon trovanja pacova kadmijumom.

Iz ovih rezultata se vidi da se u uslovima akutne intoksikacije kadmijumom nivo MDA povećava u odnosu na kontrolnu grupu životinja i to u jetri (od $0,45 \pm 0,14$ na $2,20 \pm 0,22$), u bubregu (od $0,48 \pm 0,06$ na $1,83 \pm 0,19$). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je nakon trovanja kadmijumom značajno povećan nivo TBARS, pokazatelj lipidne peroksidacije. Neposredna posledica izloženosti kadmijumu *in vivo* je verovatno iscrpljivanje fizioloških antioksidanata kao što su redukovani glutation i proteini koji sadrže -SH grupe, kao jedan od mehanizama kadmijumske toksičnosti. Model sistem za ispitivanje efekta intoksikacije kadmijumom u radnoj i životnoj sredini je izlaganje pacova kadmijumu u dozi od 0,9 mg/kg što je niže od ekspozicije ovom metalu u visoko zagađenim sredinama (World Health Organization, 1992), (Chalkley i sar., 1998).

Rezultati merenja nivoa lipidnih peroksida (MDA) u uslovima hronične intoksikacije Wistar pacova olovom(II)-acetatom i.p. injekcijom subletalnom dozom od 20 mg po životinji u toku 21 dan prikazani su u tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Nivo malondialdehida (MDA) u različitim organima u uslovima akutne intoksikacije olovom i protektivna uloga glutationa.

Eksperimentalne grupe n=4	MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	
	Jetra	bubreg
Kontrola	$0,45 \pm 0,14$	$0,48 \pm 0,06$
Oovo (Pb)	$2,48 \pm 0,23$	$1,49 \pm 0,38$
Pb + GSH	$1,24 \pm 0,18$	$0,81 \pm 0,20$
GSH	$0,40 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,16$

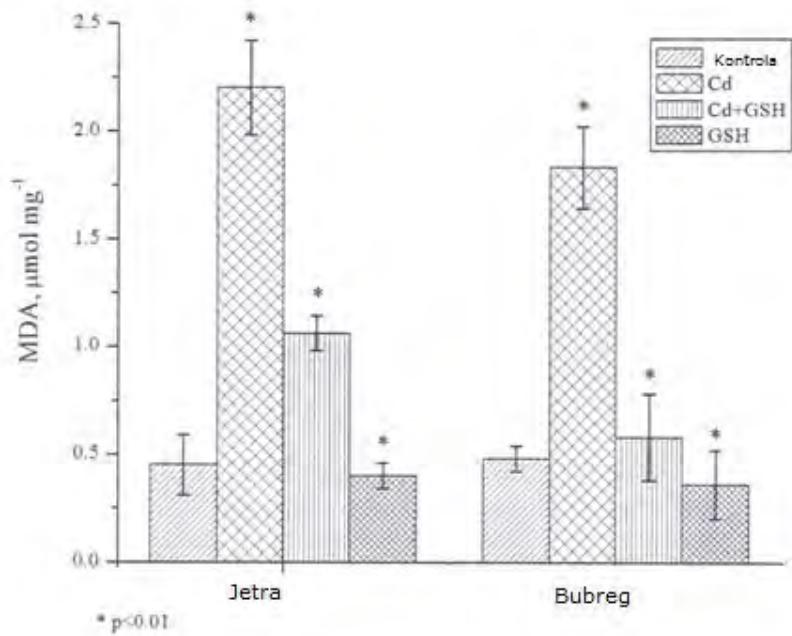
Iz ovih rezultata vidi se da se u uslovima hronične intoksikacije olovom nivo MDA povećava u odnosu na kontrolnu grupu životinja i to u jetri (od $0,45\pm0,14$ na $2,48\pm0,23$), u bubregu (od $0,48\pm0,06$ na $1,49\pm0,38$).

Ercal i saradnici (1996) su pokazali da posle 5 nedelja izlaganja miševa olovu nivo GSH se smanjuje i dolazi do povećanja vrednosti MDA u mozgu (Ercal i sar., 1996). Ovi rezultati mogu biti u prilog pretpostavke da olovo dovodi do oksidativnog oštećenja nervnog sistema. Olovo direktno i indirektno verovatno povećava broj reaktivnih kiseoničnih vrsta i smanjuje antioksidativni sistem odbrane ćelije čime stvara neravnotežu između slobodnih radikala i antioksidanasa. Ova neravnoteža prema Droke i sar., (1994) dovodi do kaskadnih reakcija aktiviranja ćelija imunskog sistema. Olovo ima izražen afinitet za tiol grupe sa kojima gradi stabilne merkaptide i time u prirodnim uslovima inaktivira sisteme, a dodati suplementi umanjuju njegove negativne efekte istim mehanizmom.

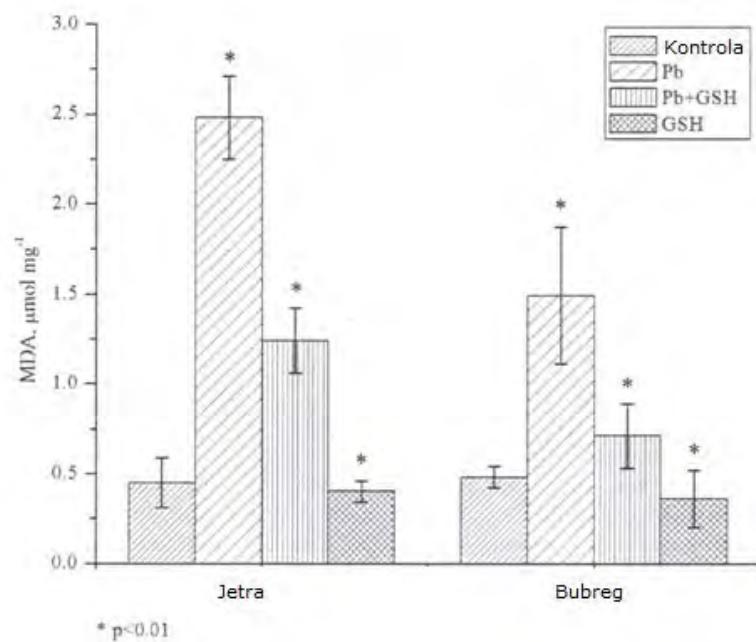
Poznato je da olovo ima toksični uticaj na ćelijske membrane i njene funkcije (npr. membrane mitochondrija, endoplazmatičnog retikuluma, lizozoma i plazma membrane). U sastav ćelijske membrane ulaze masne kiseline, prisustvo dvostrukih veza u njima slabi C-H vezu u sistemu =C-H, što dovodi do lakog otpuštanja H. Zbog toga, masne kiseline sa 0-2 dvostrukе veze otpornije su na oksidativni stres za razliku od nezasićenih sa više od 2 dvostrukе veze. Yin i Lin (Yin i Lin, 1995) su pokazali da se nakon izlaganja esencijalnih masnih kiselina uticaju olova, sa povećanjem broja dvostrukih veza povećava koncentracija finalnog proizvoda oksidativnog stresa, MDA. Olovo može i direktno da se vezuje za ćelijske membrane čime se povećava osjetljivost membrane na lipidnu peroksidaciju (Quinlan i sar., 1988).

U grupi eksperimentalnih životinja u kojoj je uz olovo aplikovan i glutation kao suplement značajno je smanjena koncentracija TBARS (od $2,48\pm0,23$ na $1,24\pm0,18$ u jetri), (od $1,49\pm0,38$ na $0,71\pm0,18$ u bubrežima), u odnosu na grupu koja je trovana olovom, što se može videti u tabeli 4.2.

Smanjenje toksičnog efekta olova u prisustvu glutationa je rezultat interakcije Pb^{2+} jona sa S-donor atomima GSH, što pokazuje da vremenska razlika između unošenja ovog metala i GSH (dan nakon intoksikacije metalom), ukazuje na mogućnost da GSH i namernice koje ga sadrže mogu biti dobar suplement u cilju smanjenja toksičnog dejstva teških metala, naročito olova.



Slika 4.2. Vrednosti koncentracije MDA u homogenatu ispitivanog tkiva u slučaju akutne intoksikacije Cd i uz dodatak GHS kao suplementa



Slika 4.3. Vrednosti koncentracije MDA u homogenatu ispitivanog tkiva u slučaju akutne intoksikacije Pb i uz dodatak GHS kao suplementa

Promene u nivou vrednosti MDA, biohemijskog markera oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana, kao indikator lipidne peroksidacije ukazuje na postojanje i drugih posledica intoksikacije teškim metalima, koje se mogu meriti promenom aktivnosti enzima iz grupe oksidoreduktaza kao što su XO i XDH, a koje mogu dovesti do različitih patoloških stanja.

4.2. Rezultati aktivnosti XO i XDH u *in vitro* uslovima

In vitro ispitivanja predstavljaju zamenu životinjskih modela i jasne su smernice za pretkliničke studije na životinjama. *In vitro* ispitivanja spadaju u grupu pretkliničkih ispitivanja zajedno sa *in vivo* ispitivanjima na životinjama, koja predhode kliničkim ispitivanjima.

Jedno od ispitivanja u ovoj studiji je proučavanje *in vitro* efekta kadmijuma, olova i bakra, kao i dejstvo tiol supstanci, –S donor liganada (LA i GSH) samostalno ili kao suplemenata, na aktivnost komercijalnih enzima XO. *In vitro* ispitivanja u ovoj studiji služe za ispitivanje toksičnosti teških metala (Cd, Pb i Cu) i njihovih mehanizama delovanja na molekularnom nivou na strukturu enzima XO pod kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Ova ispitivanja mogu se ponavljati i opravdano koristiti kao preliminarna istraživanja tj. osnova za dalja pretklinička i klinička istraživanja. Zbog nemogućnosti postizanja složenog sistema nemoguća je procena uticaja svih faktora na aktivnost enzima i odgovor na pitanje da li će se željeni efekat javiti i u živom organizmu. Rezultati merenja aktivnosti XO usled dejstva kadmijuma, olova i bakra kao i protektora (α -liponske kiseline i glutationa) dati su u tabeli 4.3. i na slikama 4.10 i 4.11.

U *in vitro* ispitivanjima kadmijum indirektno ispoljava genotoksičan uticaj jer uzrokuju apoptozu ćelije. Literaturni podaci ukazuju da kadmijum u *in vitro* ispitivanjima vrši supresiju enzima u plućima zečeva (Fukuhara i sar., 1982). Pokazano je da kadmijum i oovo ispoljavaju inhibitorni efekat na aktivnost mnogih enzima (kao npr. P5Npyrimidin-5'-nukleotidaza (P5N, E. C. 3.1.3.5)), međutim kada se metalima doda neka supstanca u preinkubaciji npr. metalotionein inhibitorno dejstvo metala na aktivnost enzima (P5N) se višestruko smanjuje (Mohammed-Brahim i sar., 1984). Prema rezultatima istraživanja koja su izvršena u ovoj studiji kadmijum smanjuje aktivnost XO u *in vitro* uslovima, sličan trend promene aktivnosti enzima, pod istim uslovima intoksikacije, je i kod kisele i alkalne DNaza (Jovanović, 2012).

Tabela 4.3. Aktivnost XO u *in vitro* uslovima

Eksperimentalne grupe n=6	In vitro (IJ/L)
	XO
Kontrola	36
Cd	30
Cd+L	37
Cd+G	50
Pb	54
Pb+L	60
Pb+G	65
Cu	49
Cu+L	35
Cu+G	31
L	32
G	58

Rezultati ovih ispitivanja pokazuju da u sistemu **enzim - M²⁺** olovo i bakar značajno povećavaju aktivnost XO i na taj način utiču na produkciju slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta.

U model sistemu **enzim - M²⁺ - L** u odnosu na sistem enzim - M²⁺ uočava se da α-liponska kiselina umanjuje efekat intoksikacije Cu²⁺ jona. U prisustvu jona olova i kadmijuma α-liponska kiselina ne dovodi do smanjenja, već naprotiv do porasta aktivnosti XO i nema protektivnu ulogu.

U model sistemu enzim **enzim - M²⁺ - G** u odnosu na sistem **enzim - M²⁺** uočava se da glutation ima protektivnu ulogu u uslovima intoksikacije bakrom jer smanjuje aktivnost XO. U uslovima intoksikacije jonima Pb²⁺ i Cd²⁺ glutation povećava aktivnost XO.

Rezultati ovih ispitivanja pokazuju da se posledice intoksikacije kadmijumom mogu smanjiti dodavanjem protektora α -liponske kiseline, pri čemu α -liponska kiselina u potpunosti poništava toksično dejstvo Cd.

Antioksidans (α -liponska kiselina) umanjuje aktivnost XO. Kako su enzimi proteini, ukupna količina protein se reperkujuje na količinu enzima, ukoliko nije u pitanju specifična indukcija. Pored toga ona može delovati zaštitno na strukturu svih bioloških sistema koji imaju gvožđe i sumpor, pa u tom smislu i na XO.

Glutation, kao komponenta antioksidativnog sistema i kao metal-helatirajući agens ispoljava protektivnu ulogu, i prema rezultatima ovih ispitivanja u slučaju intoksikacije sa bakrom (tabela 4.3). Prema rezultatima ovih ispitivanja registrovan je pozitivan efekat tiol supstanci, –S donor liganada (LA i GSH) na aktivnost XO pri intoksikaciji Cu ali ne i kod Cd i Pb.

Protektivna uloga suplemenata (α -liponska kiselina i glutationa) u uslovima intoksikacije Cu je posledica interakcije bakra sa istim aktivnim centrima oba suplementa (O, O).

Ova vrsta istraživanja osnova su za dalja *in vivo* istraživanja u kojima će biti omogućen celovit uvid na animalnim modelima. Na taj način se u *in vitro* ispitivanjima proučava proteomik (dejstvo metala na strukturu enzima), a ne genomik što je slučaj kod *in vivo* ispitivanja.

4.3. Rezultati *in vivo* ispitivanja

4.3.1. Rezultati merenja aktivnosti XO i XDH i vrednosti koncentracije proteina u prisustvu suplemenata u uslovima intoksikacije teškim metalima

Slobodni radikali i neradikalne reaktivne vrste kiseonika mogu izazvati smrt ćelije. Kao primer može poslužiti ishemija tkiva jetre, kada dolazi do porasta količine slobodnih radikala ili zbog intenzivne produkcije ili usled neadekvantne eliminacije tj. iscrpljenja antioksidativnih odbrambenih rezervi ćelije. Pojačana produkcija slobodnih radikala, uslovljena aktivnošću ksantin oksidaze, nastaje kao posledica dva događaja:

- Konverzije ksantin dehidrogenaze u ksantin oksidazu,
- Povećanja koncentracija supstrata (ksantina i hipoksantina) u ishemiskom tkivu.

Rezultati merenja aktivnosti XO, XDH i vrednosti koncentracije proteina jetre i bubrega albino pacova Wistar soja pod uticajem suplemenata S-donor liganada (L) i N, S, O-donor ligande (G) prikazani su u tabeli 4.4 i 4.5.

Tabela 4.4. Aktivnost XO i XDH i vrednosti proteina u jetri eksperimentalnih životinja u prisustvu suplemenata

Eksperimentalne grupe n=6	Jetra		
	XO (U/mg proteina)	XDH (U/mg proteina)	Proteini (mg/L)
Kontrola	56,60 ± 8,78	38,53 ± 7,12	1333,25 ± 158,96
L	55,71 ± 6,23	74,57 ± 5,60	1419,32 ± 181,46
G	49,30 ± 12,70	97,25 ± 10,67	1591,25 ± 371,78

Na osnovu rezultata iz tabele 4.4. može se videti da se aktivnost XO u jetri smanjuje pod uticajem α-liponske kiseline (od 56,60 ± 8,78 do 55,71 ± 6,23), kao i pod uticajem glutationa (od 56,60 ± 8,78 do 49,30 ± 12,70).

Aktivnost XDH se povećava pod uticajem α -liponske kiseline skoro 90% (od $38,53 \pm 7,12$ do $74,57 \pm 5,60$) kao i pod uticajem glutationa više od 100% (od $38,53 \pm 7,12$ do $97,25 \pm 10,67$).

Vrednost proteina se povećava u prisustvu α -liponske kiseline (od $1333,25 \pm 158,96$ do $1419,32 \pm 181,46$) i glutationa (od $1333,25 \pm 158,96$ do $1591,25 \pm 371,78$) u odnosu na kontrolnu grupu.

Iz dobijenih rezultata se vidi izrazita protektivna uloga α -liponske kiseline koja pomera ravnotežu u sistemu XO \leftrightarrow XDH u korist XDH. Glutation ima još izrazitiju protektivnu ulogu.

Tabela 4.5. Aktivnost XO i XDH i vrednosti proteina u bubregu eksperimentalnih životinja u prisustvu suplemenata

Eksperimentalne grupe n=6	Bubreg		
	XO (U/mg proteina)	XDH (U/mg proteina)	Proteini (mg/L)
Kontrola	$28,27 \pm 5,70$	$19,03 \pm 4,83$	$2171,27 \pm 222,29$
L	$27,25 \pm 4,21$	$26,62 \pm 3,34$	$2055,12 \pm 130,77$
G	$17,64 \pm 4,27$	$25,82 \pm 4,89$	$2362,87 \pm 268,71$

Aktivnost XO u bubregu smanjuje pod uticajem α -liponske kiseline (od $56,60 \pm 8,78$ do $27,25 \pm 4,21$), kao i pod uticajem glutationa (od $56,60 \pm 8,78$ do $17,64 \pm 4,27$). Aktivnost XDH se povećava u prisustvu suplemenata glutationa (od $19,03 \pm 4,83$ do $25,82 \pm 4,89$) i α -liponske kiseline (od $19,03 \pm 4,83$ do $25,82 \pm 4,89$) u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednost proteina se smanjuje u prisustvu suplementa α -liponske kiseline (od $2171,27 \pm 222,29$ do $2055,12 \pm 130,77$), a povećava pod uticajem glutationa (od $2171,27 \pm 222,29$ do $2362,87 \pm 268,71$) u odnosu na kontrolnu grupu, tabela 4.5.

Na osnovu rezultata u tabeli 4.5 može se zaključiti da je protektivna uloga glutationa u bubregu izraženija nego li α -liponske kiseline čime se smanjuje mogućnost za produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta.

4.3.2. Rezultati merenja aktivnosti XO i XDH i vrednosti koncentracija proteina u uslovima intoksikacije kadmijumom

Rezultati merenja aktivnosti XO, XDH i vrednosti koncentracije proteina jetre i bubrega u uslovima hronične intoksikacije albino pacova Wistar soja jonima Cd²⁺, kao i uticaj suplemenata koji sadrže S-donor atome i N, O-donor atome prikazani su u tabelama 4.6. i 4.7

Tabela 4.6. Aktivnost XO i XDH i vrednosti proteina kod eksperimentalnih grupa u uslovima akutne intoksikacije kadmijumom i uz dodatak odgovarajućih suplemenata u jetri.

Eksperimentalne grupe n=6	Jetra		
	XO (U/mg proteina)	XDH (U/mg proteina)	Proteini (mg/L)
Kontrola	56,60 ± 8,78	38,53 ± 7,12	1333,25 ± 158,96
Kadmijum (Cd)	50,74 ± 10,46	29,27 ± 5,99	1757,87 ± 243,55
Cd + L	48,01 ± 3, 81	46,98 ± 7,16	1624,1 ± 102,86
Cd+ G	75,86 ± 10,06	42,10 ± 16,55	1121,41 ± 152,75
L	55,71 ± 6,23	74,57 ± 5,60	1419,32 ± 181,46
G	49,30 ± 12,70	97,25 ± 10,67	1591,25 ± 371,78

Na osnovu rezultata iz tabele 4.6. može se videti da se aktivnost XO u jetri smanjuje pod uticajem Cd (od 56,60 ± 8,78 do 50,74 ± 10,46) i pod uticajem α-liponske kiseline kao suplementa (od 56,60 ± 8,78 do 48,01 ± 3, 81). Glutation kao suplement značajno povećava aktivnost XO u jetri (od 56,60 ± 8,78 do 75,86 ± 10,06) u odnosu na kontrolnu grupu.

Na osnovu rezultata iz tabele 4.6. može se videti da se aktivnost XDH u jetri smanjuje pod uticajem Cd (od 38,53 ± 7,12 do 29,27 ± 5,99). α-Liponska kiselina kao suplement u uslovima akutnog trovanja kadmijumom značajno povećava aktivnost XDH (od 38,53 ± 7,12 do 46,98 ± 7,16), kao i glutation (od 38,53 ± 7,12 do 42,10 ± 16,55) u odnosu na kontrolnu grupu.

Sadržaj proteina u supernatantu se povećava intoksikacijom Cd ($1333,25 \pm 158,96$ do $1757,87 \pm 243,55$), kao i pod uticajem suplemenata α -liponske kiseline ($1333,25 \pm 158,96$ do $1624,1 \pm 102,86$) u odnosu na kontrolnu grupu.

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da α -liponska kiselina povećava aktivnost XDH i ima protektivnu ulogu u uslovima akutne intoksikacije kadmijumom. Glutation kao suplement nema protektivnu ulogu u jetri u uslovima akutne intoksikacije kadmijumom jer sistem $\text{Cd}^{2+} - \text{G}$ povećava aktivnost XO za oko 25% u odnosu na kontrolnu grupu.

Tabela 4.7. Aktivnost XO i XDH i vrednosti proteina kod eksperimentalnih grupa u uslovima hronične intoksikacije kadmijumom i uz dodatak odgovarajućih suplemenata u bubregu.

Eksperimentalne grupe n=6	Bubreg		
	XO (U/mg proteina)	XDH (U/mg proteina)	Proteini (mg/L)
Kontrola	$28,27 \pm 5,70$	$19,03 \pm 4,83$	$2171,27 \pm 222,29$
Kadmijum (Cd)	$36,36 \pm 12,75$	$56,57 \pm 9,07$	$2197,55 \pm 317,58$
Cd + L	$59,37 \pm 16,50$	$18,12 \pm 6,13$	$1975,1 \pm 211,02$
Cd+ G	$23,88 \pm 6,02$	$37,12 \pm 3,25$	$2179,13 \pm 160,25$
L	$27,25 \pm 4,21$	$26,62 \pm 3,34$	$2055,12 \pm 130,77$
G	$17,64 \pm 4,27$	$25,82 \pm 4,89$	$2362,87 \pm 268,71$

Prema rezultatima iz tabele 4.7. na povećanje aktivnosti XO u bubregu utiče Cd (od $28,27 \pm 5,70$ do $36,36 \pm 12,75$). α -Liponska kiselina kao suplement neznatno smanjuje aktivnosti XO (od $28,27 \pm 5,70$ do $59,37 \pm 16,50$), a glutation kao suplement značajno smanjuje aktivnost XO u bubregu (od $28,27 \pm 5,70$ do $23,88 \pm 6,02$) u odnosu na kontrolnu grupu.

Prema rezultatima iz tabele 4.7. na povećanje aktivnosti XDH u bubregu značajno utiče Cd (od $19,03 \pm 4,83$ do $56,57 \pm 9,05$) kao i glutation kao suplement (od $19,03 \pm 4,83$ do $37,12 \pm$

3,25). α -Liponska kiselina kao suplement smanjuje aktivnost XO (od $19,03 \pm 4,83$ do $18,12 \pm 6,13$) u odnosu na kontrolnu grupu.

Vrednost proteina se neznatno smanjuje u grupi koja je intoksicirana Cd i kojoj je dodat suplement α -liponska kiselina ($2171,27 \pm 222,29$ do $1975,1 \pm 211,02$), tabela 4.7.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da glutation u uslovima akutne intoksikacije kadmijumom povećava aktivnost XDH i smanjuje mogućnost produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta, dok α -liponska kiselina ne pokazuje protektivnu ulogu u sistemu Cd²⁺ - L.

4.3.3. Rezultati merenja aktivnosti XO i XDH i vrednosti koncentracija proteina u uslovima intoksikacije olovom

Rezultati merenja aktivnosti XO, XDH i vrednosti koncentracije proteina jetre i bubrega u uslovima hronične intoksikacije albino pacova Wistar soja jonima Pb²⁺, kao i uticaj suplemenata koji sadrže S-donor atome i N, O-donor atome prikazani su u tabelama 4.8. i 4.9.

Tabela 4.8. Aktivnost XO i XDH i vrednosti proteina kod eksperimentalnih grupa u uslovima hronične intoksikacije olovom i uz dodatak odgovarajućih suplemenata u jetri.

Eksperimentalne grupe n=6	Jetra		
	XO (U/mg proteina)	XDH (U/mg proteina)	Proteini (mg/L)
Kontrola	56,60 ± 8,78	38,53 ± 7,12	1333,25 ± 158,96
Olovo (Pb)	46,03 ± 10,69	63,85 ± 7,61	1662,21 ± 164,50
Pb + L	54,47 ± 4,92	74,47 ± 6,48	1391,11 ± 144,83
Pb+ G	52,12 ± 7,58	62,52 ± 7,40	1561,05 ± 267,65
L	55,71 ± 6,23	74,57 ± 5,60	1419,32 ± 181,46
G	49,30 ± 12,70	97,25 ± 10,67	1591,25 ± 371,78

Na osnovu rezultata iz tabele 4.8. može se videti da se aktivnost XO u jetri značajno smanjuje pod uticajem Pb (od 56,60 ± 8,78 do 46,03 ± 10,69), kao i pod uticajem suplementata, α-liponske kiseline (od 56,60 ± 8,78 do 54,47 ± 4,92) i glutationa od (56,60 ± 8,78 do 52,12 ± 7,58) u odnosu na kontrolnu grupu.

Aktivnost XDH u jetri značajno se povećava (za 50 %) pod uticajem Pb (od 38,53 ± 7,12 do 63,85 ± 7,61), kao i pod uticajem suplementata, α-liponske kiseline (od 38,53 ± 7,12 do 74,47 ± 6,48) i glutationa od (38,53 ± 7,12 do 62,52 ± 7,40) u odnosu na kontrolnu grupu.

Vrednost proteina u jetri se povećava u grupi eksperimentalnih životinja kojoj je davano Pb (od $1333,25 \pm 158,96$ do $1662,21 \pm 164,50$), neznatno povećanje u grupi sa Pb i L (od $1333,25 \pm 158,96$ do $1391,11 \pm 144,83$) i povećanje u grupi eksperimentalnih životinja kojima je davano Pb i G (od $1333,25 \pm 158,96$ do $1561,05 \pm 267,65$).

Na osnovu rezultata dobijenih u uslovima hronične intoksikacije olovom α -liponska kiselina blokira dejstvo Pb^{2+} jona u potpunosti (preko 50%) i dodatno povećava aktivnost XDH čime je potvrđena njena protektivna uloga. Glutation pokazuje slabiju protektivnu ulogu u sistemu $Pb^{2+} - G$ u jetri.

Tabela 4.9. Aktivnost XO i XDH i vrednosti koncentracije proteina u jetri eksperimentalnih životinja u uslovima akutne intoksikacije olovom i uz dodatak odgovarajućih suplemenata.

Eksperimentalne grupe n=6	Bubreg		
	XO (U/mg proteina)	XDH (U/mg proteina)	Proteini (mg/L)
Kontrola	$28,27 \pm 5,70$	$19,03 \pm 4,83$	$2171,27 \pm 222,29$
Oovo (Pb)	$20,58 \pm 7,97$	$41,13 \pm 5,65$	$2228,35 \pm 240,96$
Pb + L	$20,77 \pm 2,02$	$56,90 \pm 6,79$	$2225,31 \pm 296,17$
Pb+ G	$23,01 \pm 3,62$	$58,55 \pm 5,87$	$2163,4 \pm 157,39$
L	$27,25 \pm 4,21$	$26,62 \pm 3,34$	$2055,12 \pm 130,77$
G	$17,64 \pm 4,27$	$25,82 \pm 4,89$	$2362,87 \pm 268,71$

Prema rezultatima iz tabele 4.9. na smanjenje aktivnosti XO u bubregu utiče Pb (od $28,27 \pm 5,70$ do $20,58 \pm 7,97$) kao i pod uticajem suplementata, α -liponske kiseline (od $28,27 \pm 5,70$ do $20,77 \pm 2,02$) i glutationa od ($28,27 \pm 5,70$ do $23,01 \pm 3,62$) u odnosu na kontrolnu grupu.

Prema rezultatima iz tabele 4.9. na povećanje aktivnosti XDH u bubregu utiče Pb (od $19,03 \pm 4,83$ do $20,58 \pm 7,97$) kao i pod uticajem suplementata, α -liponske kiseline (od $19,03 \pm 4,83$ do $41,13 \pm 5,65$) u odnosu na kontrolnu grupu.

4,83 do $56,90 \pm 6,79$) i glutationa od ($19,03 \pm 4,83$ do $58,55 \pm 5,87$) u odnosu na kontrolnu grupu.

Vrednost proteina u bubregu se značajno povećava u grupama eksperimentalnih životinja kojima je davano Pb (od $1333,25 \pm 158,96$ do $2228,35 \pm 240,96$), Pb i L (od $1333,25 \pm 158,96$ do $2225,31 \pm 296,17$) i Pb i G (od $1333,25 \pm 158,96$ do $2163,4 \pm 157,39$).

Ispitivanja u sistemu **Pb²⁺ - L** i **Pb²⁺ - G** pokazuju da suplementi utiču na pomeranje ravnoteže u sistemu **XO ↔ XDH** u korist povećanja aktivnosti XDH ali je dejstvo α -liponske kiseline izraženije.

4.3.4. Rezultati merenja aktivnosti XO i XDH i vrednosti koncentracije protein u uslovima intoksikacije bakrom

Rezultati merenja aktivnosti XO, XDH i vrednosti koncentracije proteina jetre i bubrega u uslovima hronične intoksikacije albino pacova Wistar soja jonima Cu²⁺, kao i uticaj suplemenata koji sadrže S-donor atome i N, O-donor atome prikazani su u tabelama 4.10. i 4.11.

Tabela 4.10. Aktivnost XO i XDH i vrednosti koncentracije proteina u jetri eksperimentalnih životinja u uslovima akutne intoksikacije bakrom i uz dodatak odgovarajućih suplemenata

Eksperimentalne grupe n=6	Jetra		
	XO (U/mg proteina)	XDH (U/mg proteina)	Proteini (mg/L)
Kontrola	56,60 ± 8,78	38,58 ± 7,12	1333,25 ± 158,96
Bakar (Cu)	47,48 ± 7,89	48,52 ± 11,12	2024,27 ± 346,56
Cu + L	60,41 ± 9,98	46,22 ± 3,89	1707,35 ± 163,25
Cu+ G	52,95 ± 8,52	61,68 ± 7,46	1692,92 ± 89,43
L	55,71 ± 6,23	74,57 ± 5,60	1419,32 ± 181,46
G	49,30 ± 12,70	97,25 ± 10,67	1591,25 ± 371,78

Aktivnost XO u jetri se pod uticajem Cu smanjuje (od 56,60 ± 8,78 do 47,48 ± 7,89), kao i u prisustvu glutationa kao suplementa (od 56,60 ± 8,78 do 52,95 ± 8,52). Pod uticajem α-liponske kiseline aktivnost XO se povećava (od 56,60 ± 8,78 do 60,41 ± 9,98).

Aktivnost XDH u jetri se povećava pod uticajem Cu (od 38,58 ± 7,12 do 48,52 ± 11,12), kao i pod uticajem α-liponska kiseline kao suplementa (od 38,58 ± 7,12 do 46,22 ± 3,89) i glutationa kao suplementa u uslovima akutnog trovanja kadmijumom (od 38,58 ± 7,12 do 61,68 ± 7,46). u odnosu na kontrolnu grupu, tabela 4.10.

Vrednost proteina se značajno povećava akutnom intoksikacijom Cu (od $1333,25 \pm 158,96$ do $2024,27 \pm 346,56$) i dodatkom suplemenata α -liponske kiseline (od $1333,25 \pm 158,96$ do $1707,35 \pm 163,25$) i glutationa (od $1333,25 \pm 158,96$ do $1419,32 \pm 181,46$).

Na osnovu dobijenih rezultata u uslovima hronične intoksikacije bakrom glutation ima izraženiju protektivnu ulogu od α -liponske kiseline, značajnije povećava aktivnost XDH (oko 60%) u odnosu na kontrolnu grupu i time smanjuje produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Tabela 4.11. Aktivnost XO i XDH i vrednosti koncentracije proteina kod eksperimentalnih grupa u uslovima akutne intoksikacije bakrom i uz dodatak odgovarajućih suplemenata u bubregu.

Eksperimentalne grupe n=6	Bubreg		
	XO (U/mg proteina)	XDH (U/mg proteina)	Proteini (mg/L)
Kontrola	$28,27 \pm 5,70$	$19,03 \pm 4,83$	$2171,27 \pm 222,29$
Bakar (Cu)	$25,32 \pm 3,86$	$18,95 \pm 1,8$	$2158,83 \pm 123,09$
Cu + L	$21,79 \pm 5,12$	$39,5 \pm 8,42$	$2244,75 \pm 93,88$
Cu+ G	$22,62 \pm 2,09$	$23,17 \pm 1,29$	$2114,17 \pm 270,38$
L	$27,25 \pm 4,21$	$26,62 \pm 3,34$	$2055,12 \pm 130,77$
G	$17,64 \pm 4,27$	$25,82 \pm 4,89$	$2362,87 \pm 268,71$

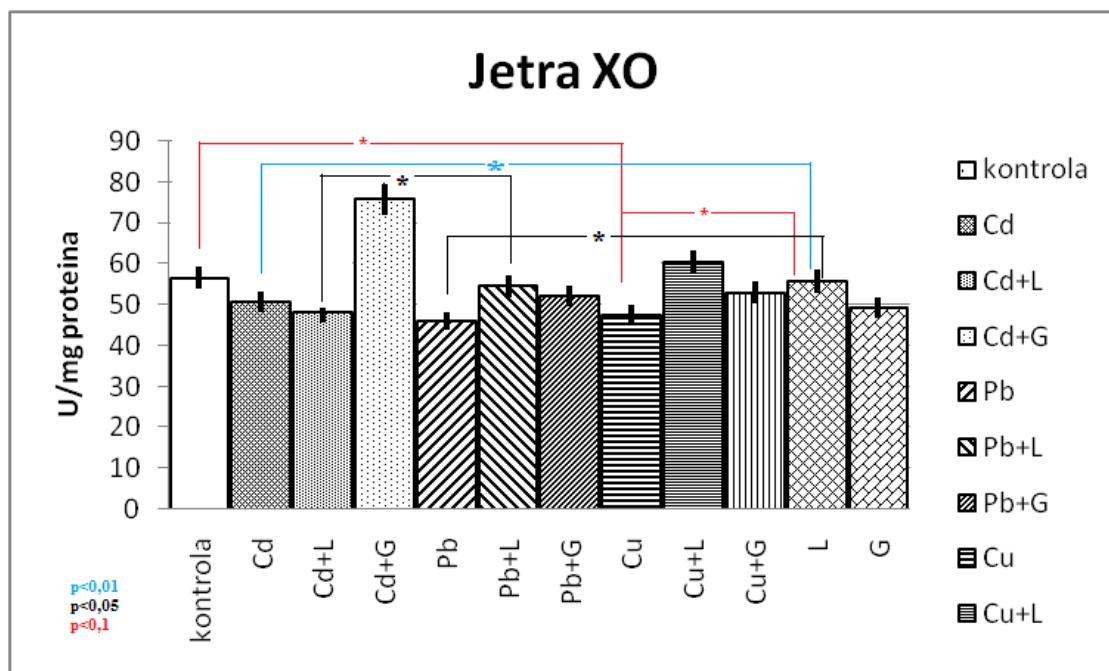
Prema rezultatima iz tabele 4.11. na smanjenje aktivnosti XO u bubregu, utiče Cu (od $28,27 \pm 5,70$ do $25,32 \pm 3,86$) kao i pod uticajem suplementata, α -liponske kiseline (od $28,27 \pm 5,70$ do $21,79 \pm 5,12$) i glutationa od ($28,27 \pm 5,70$ do $22,62 \pm 2,09$) u odnosu na kontrolnu grupu.

Na smanjenje aktivnosti XDH u bubregu utiče Cu (od $19,03 \pm 4,83$ do $18,95 \pm 1,8$). Pod uticajem suplementata, α -liponske kiseline aktivnost XDH se povećava (od $19,03 \pm 4,83$ do $39,5 \pm 8,42$) i glutationa od ($19,03 \pm 4,83$ do $23,17 \pm 1,29$) u odnosu na kontrolnu grupu.

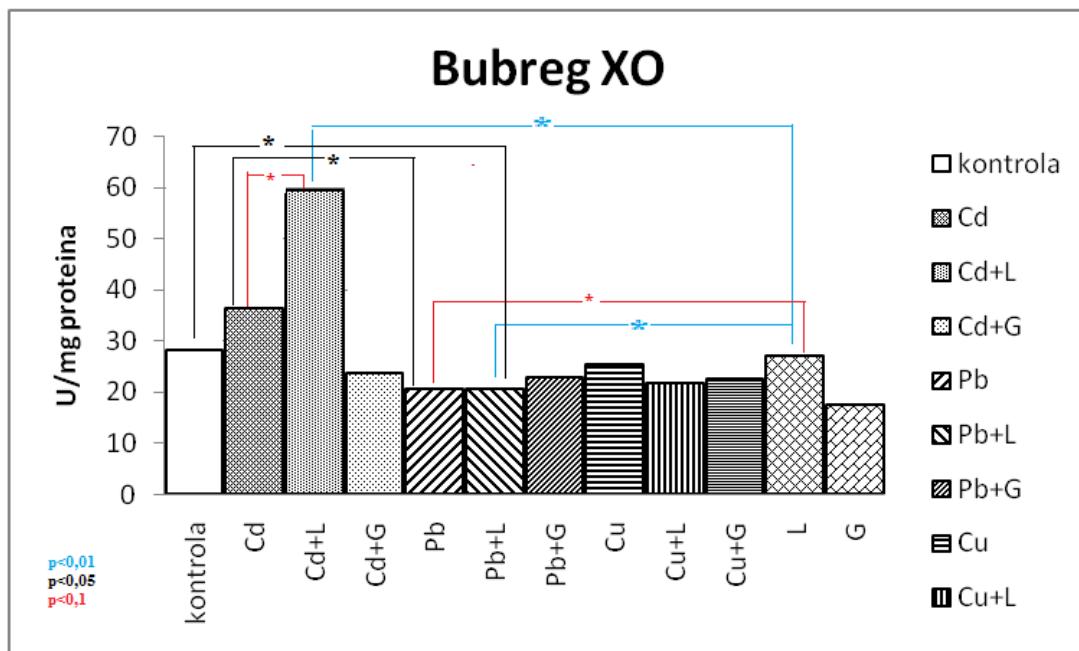
Vrednost proteina se neznatno smanjuje akutnom intoksikacijom Cu (od $2171,27 \pm 222,29$ do $2158,83 \pm 123,09$) i uz dodatak glutationa (od $2171,27 \pm 222,29$ do $2114,17 \pm 270,38$), neznatno povećanje vrednosti proteina se javlja dodatkom suplementa α -liponske kiseline (od $2171,27 \pm 222,29$ do $2244,75 \pm 93,88$), tabela 4.11.

U uslovima hronične intoksikacije bakrom aktivnost XDH u bubregu se značajno povećava dodatkom α -liponske kiseline, aktivnost XO se značajno smanjuje. Glutation kao suplement pokazuje nešto manju protektivnu ulogu u uslovima hronične intoksikacije bakrom.

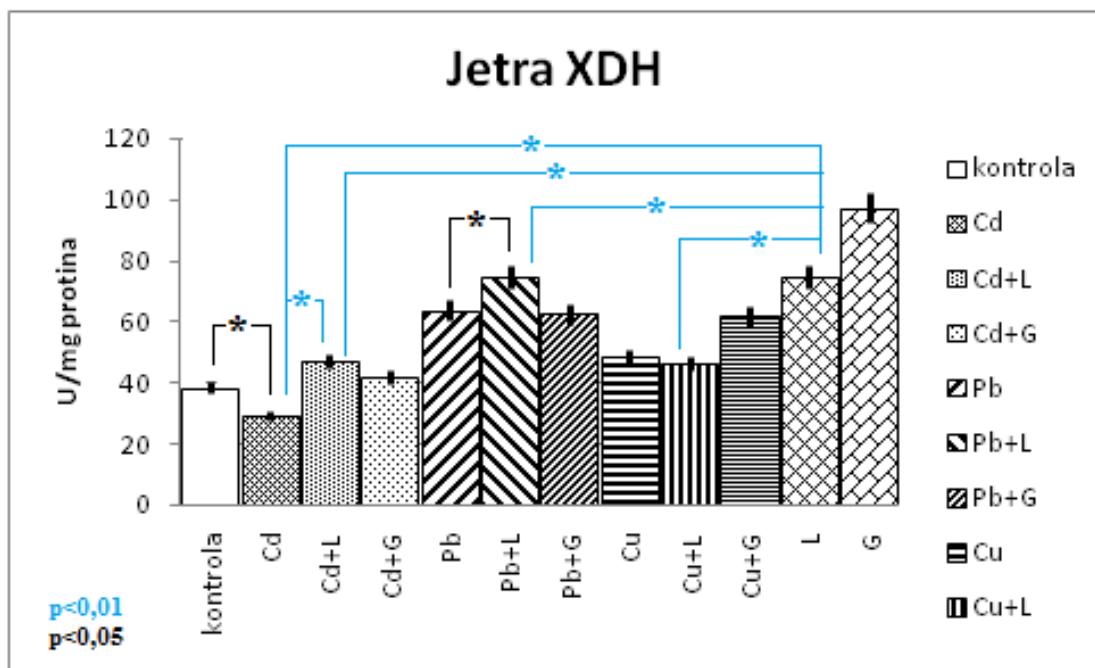
Na slikama prikazani su statistički obrađeni rezultati aktivnosti enzima XO i XDH, a prema tabelama 4.4., 4.6., 4.8., 4.10. *in vivo* istraživanja.



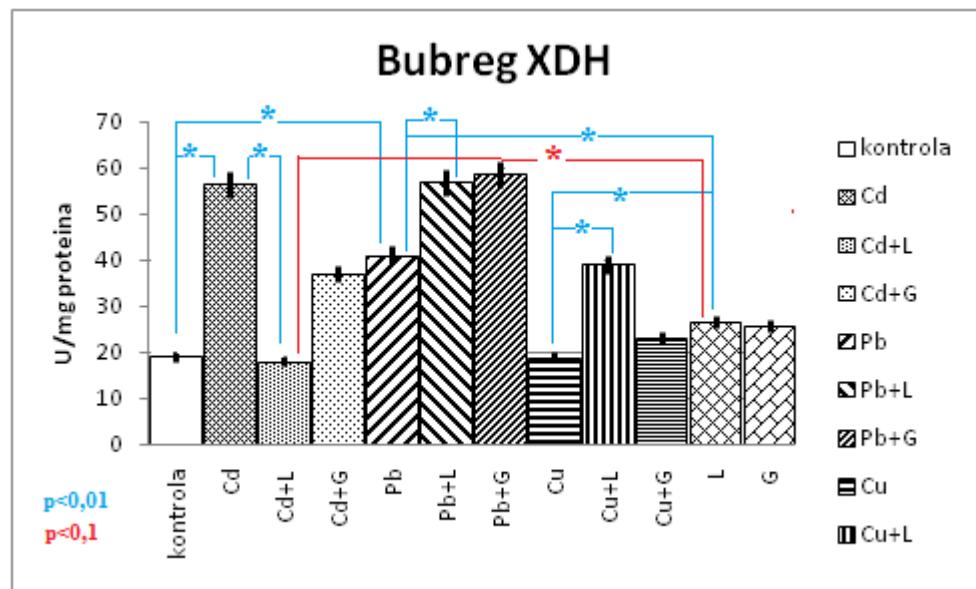
Slika 4.4. Aktivnost XO u jetri u uslovima intoksikacije teškim metalima uz dodatak suplemenata



Slika 4.5. Aktivnost XO u bubregu u uslovima intoksikacije teškim metalima uz dodatak suplemenata



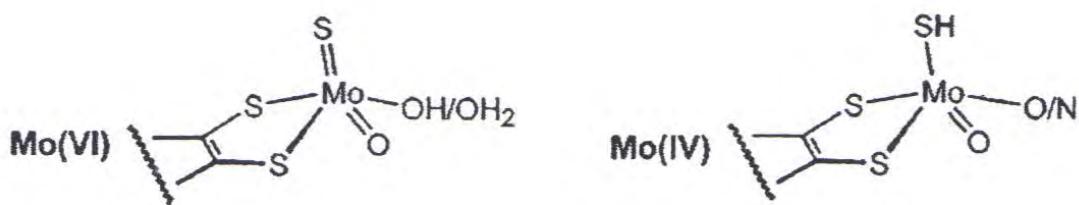
Slika 4.6. Aktivnost XDH u jetri u uslovima intoksikacije teškim metalima uz dodatak suplemenata



Slika 4.7. Aktivnost XDH u bubregu u uslovima intoksikacije teškim metalima uz dodatak suplemenata

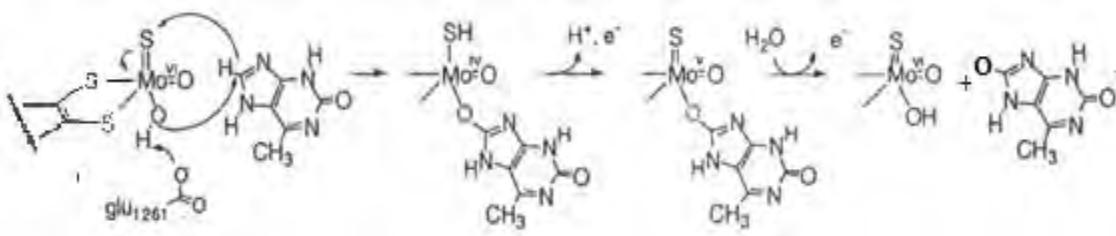
4.3.6. Poređenje rezultata merenja aktivnosti XO/XDH jetre i bubrega u uslovima intoksikacije teškim metalima i protektivne uloge suplemenata (*in vivo* i *in vitro* ispitivanja)

Ksantin oksidaza katalizuje oksidaciju hipoksantina i ksantina, jedinjenja koja nastaju deaminacijom adenina i guanina iz nukleinskih kiselina, uz nastajanje urata (mokraćne kiseline). Mehanizam enzimske katalize može se formalno predstaviti kao hidroksilovanje, pri čemu se – OH grupa odvaja od molekula rastvarača. Aktivnost ksantin oksidaze dovode do produkcije mokraćne kiseline i reaktivnih kiseoničnih vrsta (H_2O_2 , O_2^- ...) što posredno vremenom dovodi do različitih posledica, koje nastaju kao rezultat hiperprodukcije slobodnih radikala, ili specifičnih fizikohemijačkih osobina u nastalim sistemima usled loše rastvorljivosti mokraćne kiseline (Brown i sar., 1988; Borges i sar., 2002). Aktivni centri u strukturi XO i XDH dati su na slici 4.8.



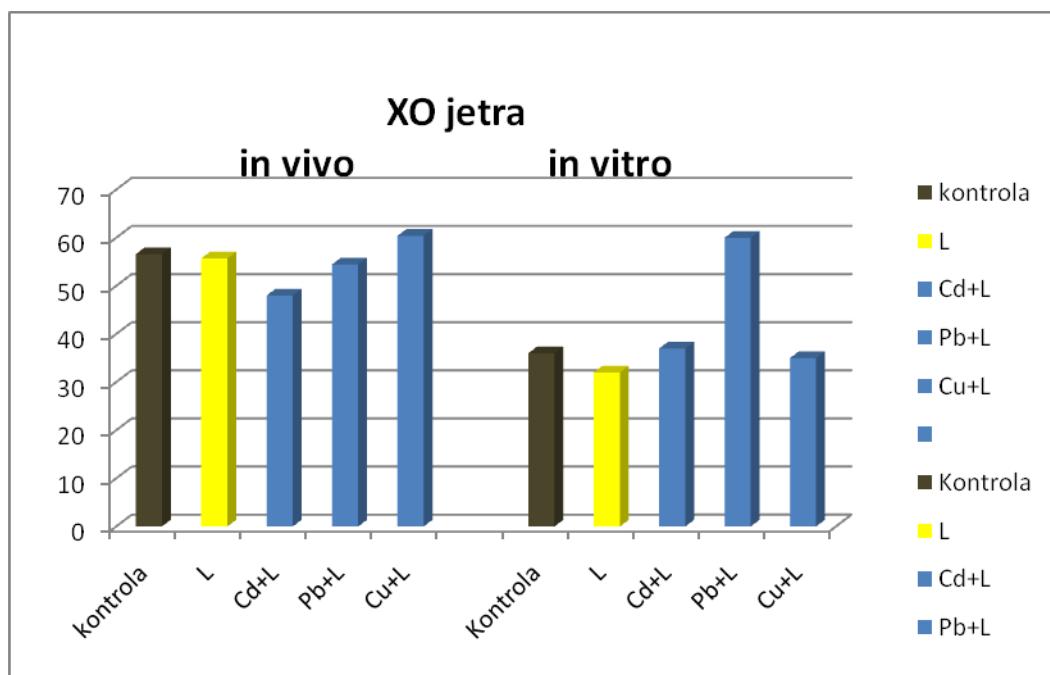
Slika.4.8. Primeri aktivnih centara nekih enzima sa Mo, osidaza/reduktaza

Na složenost strukture ksantin oksidaze utiče prisustvo metala jer Mo sa koordinacionim brojem 5 formira kompleksan fragment deformisane kvadratnopiramidalne strukture preko kiseonika, dva donor atoma sumpora iz en-ditiolata, i kiseonika OH grupe (poglavlje 2.1.2.). Kao posledica sterne bliskosti, glutaminske kiseline 1261, mehanizam dejstva enzima uključuje nikloofilni napad Mo – OH grupe na supstrat sa pratećim transferom hidrida na **Mo = S** fragmenta metaloenzima, uz dvoselektronsku redukciju molibdenovog centra do Mo(IV). Dvostepenom reoksidacijom, enzim uspostavlja početno oksidaciono stanje sa ugradnjom hidroksilne grupe u supstrat. Verovatno je u ovom procesu voda glavni izvor kiseonika, a ne molekulski kiseonik, izotopski obeležen O^{18} (Crichton, 2008). Predpostavljeni mehanizam dejstva dat je na slici 4.9.

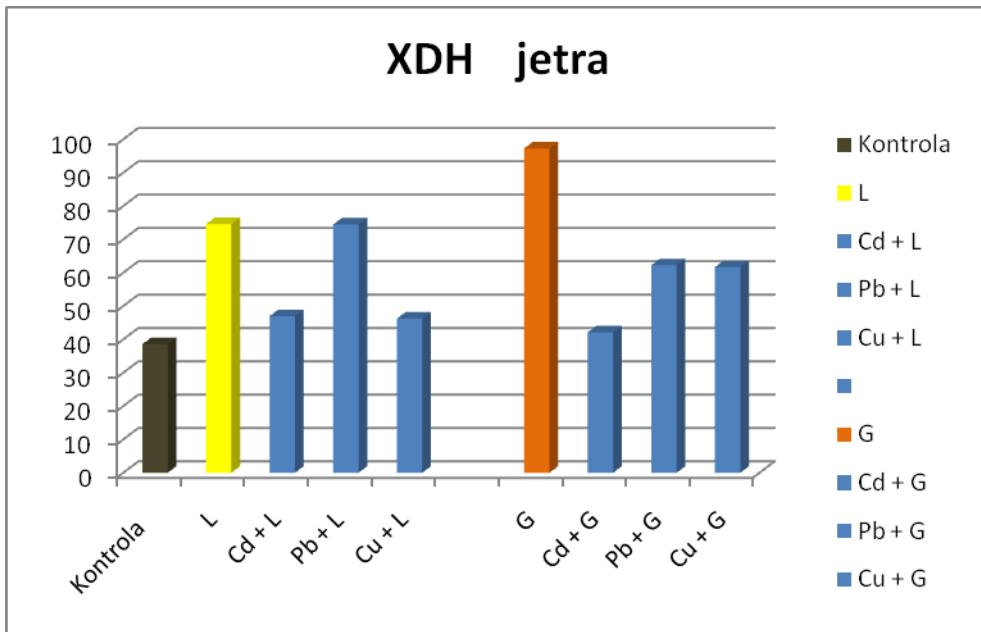


Slika 4.9. Predpostavljeni mehanizam dejstva ksantin oksidaze

Rezultati izmerene aktivnosti XO protektivne uloge liponske kiseline u uslovima intoksikacije teškim metalima u jetri i protektivna uloga suplemenata, u albino pacova Wistar soja, *in vivo* i *in vitro* ispitivanja, a na osnovu tabela 4.6, 4.8, 4.10. prikazani su na slici 4.10., 4.11. i 4.13.



Slika 4.10. Aktivnost XO u jetri u uslovima intoksikacije teškim metalima uz dodatak suplemenata α -liponske kiseline u *in vivo* i *in vitro* uslovima



Slika 4.11. Aktivnost XDH u jetri i bubregu u uslovima intoksikacije teškim metalima uz dodatak suplemenata α -liponske kiseline i glutationa

Na osnovu dobijenih rezultata, tabela 4.4, 4.6, 4.8, 4.10. može se predpostaviti da je moguća interakcija između jona toksičnih metala sa donor atomima liganada iz prve koordinacione sfere aktivnog centra enzima u sistemu M^{2+} -L(Mo) koja utiče na aktivnost istog.

Timbrel i sar. (2000) sugeriju da kadmijum inhibira aktivnost oksidativnih enzima, što korelira sa našim rezultatima praćenja aktivnosti XO na ispitivanom model sistemu. Inhibicija enzima kadmijumom može biti povezana sa blokiranjem esencijalnog metalnog kofaktora sa enzima ili formiranjem kovalentne veze kadmijuma sa sulfhidrilnim i S-atomima drugih delova biomolekula koji su odgovorni za njegovu funkciju.

Postoje literaturni podaci o stvaranju slobodnih radikala kod životinja nakon akutne intoksikacije kadmijumom i kancerogeneze nakon hronične intoksikacije ovim metalom (Hanahan i sar., 2000). Mogući mehanizam štetnog delovanja kadmijuma može biti neravnoteža između proizvodnje i uklanjanja slobodnih radikala u tkivima i pojedinim ćelijskim komponentama što vodi ka oksidativnom stresu i taj efekat je jako izražen u tkivu jetre.

Neposredna posledica izloženosti kadmijumu je iscrpljivanje fizioloških antioksidansa, pre svega onih sa reaktivnim -SH grupama kao što su proteini i glutation i to je jedan od verovatnih mehanizama toksičnosti ovog metala. Izlaganje ćelija kadmijumu uključuje ne samo

odgovore reakcije signalizacije na ćelijsku smrt već i zaštitne reakcije ćelije protiv toksičnosti ovim metalom.

Na osnovu rezultata iz tabele 4.6. primećuje se da sa intoksikacijom Cd²⁺ jona dolazi do smanjenja aktivnosti XO što je posledica strukture enzima i prisustva gvožđa i sumpor komponenti

Najveći uticaj na smanjenje aktivnosti XO ima Pb²⁺ u *in vivo* uslovima hronične intoksikacije. Razlog ovome je verovatno veličina jona Pb²⁺ (Pb²⁺ > Cd²⁺ > Cu²⁺, tabela 4.12.) tako da postoji mogućnost zauzimanja tj blokiranja dva koordinaciona mesta u koordinacionoj sferi aktivnog centra enzima. Pb²⁺ jon kao “mekša” Lewis-ova kiselina ima najveći afinitet za interakciju sa donor atomima “mekih” Lewis-ovih baza (S-atoma iz okruženja molibdena u enzimu XO).

Tabela 4.12. Vrednosti poluprečnika nekih od M²⁺jona toksičnih metala (Filipović i Lipanović, 1998)

Jon M ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺
r (nm)	0,097	0,132	0,069

Bakar je sastavni deo brojnih enzima kao što su superoksid dizmutaza, lizil oksidaza, citohrom oksidaza, monoamino oksidaza, feroksidaza I i tirozinaza (Sharma i sar., 2007). Bakar ima značajnu ulogu i u apsorpciji i transportu gvožđa i sintezi hemoglobina (Sharma, 1999). Ovaj metal se deponuje u jetri, tako da dolazi do stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala u jetri kod eksperimentalnih životinja tj. pacova koje su dobijali bakar što je pokazano u radu Kadiiska i sar., (1993).

Bakar je metal koji se inače deponuje u jetri, tako da dolazi do stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala u jetri kod eksperimentalnih životinja tj. pacova koji su hronično intoksicirani bakrom što je pokazano u radu Kadiiska i sar., (1993). Efekti hroničnog trovanja bakrom pokazuju da Cu²⁺ jon smanjuje aktivnost XO. Cu²⁺ jon je “tvrdja” Lewis-ova kiselina i kao takav jon ima veći afinitet za interakciju preko O-donor atoma liganda iz okruženja. Prema literaturnim podacima, u većim dozama, od 10⁻⁶ mol/dm³, Cu inhibira neke enzime (kisela fosfataza), onemogućava vezivanje drugih esencijalnih mikroelemenata, ili se vezuje za neke kofaktore, glutation npr. Bakar učestvuje u formiranju slobodnih kiseoničnih radikala (Zhao i

sar., 1994). Bakar funkcioniše kao kofaktor i neophodan je za strukturne i katalitičke osobine raznih enzima, uključujući i citohrom c oxidazu, tirozinazu, p-hidroksifenil piruvat hidrolazu, dopamin β hidroksilazu, lizil oksidazu i bakar–cink superoksid dizmutazu (Cu,Zn–SOD) (Turnlund i sar., 1999). Prema podacima za aktivnost XO iz tabele 4.10. dolazi do smanjenja aktivnosti XO u uslovima akutne intoksikacije bakrom i povećane aktivnosti XDH.

Upoređivanjem rezultata toksičnosti metala u *in vivo* i *in vitro* uslovima može se primetiti isti trend promene aktivnosti XO u većini slučajeva. Pri intoksikaciji, razlike u rezultatima koje su posledica intoksikacije olovom i bakrom u *in vitro* uslovima, gde se povećava aktivnost XO, može biti objašnjena činjenicom da je *in vitro* sistem jednostavniji sistem, pod dobro kontrolisanim uslovima. Zato su ovde efekti i posledice prisustva teških metala u organizmu izrazitiji.

In vivo ipitivanja nisu strogo kontrolisana, tu učestvuju i drugi biohemijski procesi tako da je čitav sistem složeniji.

α -Liponska kiselina, kao prirodno sulfhidrilno tiol jedinjenje, pronađeno je u prirodi u mnogim biljnim i životinjskim vrstama i koristi se u terapiji o čemu postoje podaci u literaturi (Teichert i sar., 2005), (poglavlje 2.3.3.).

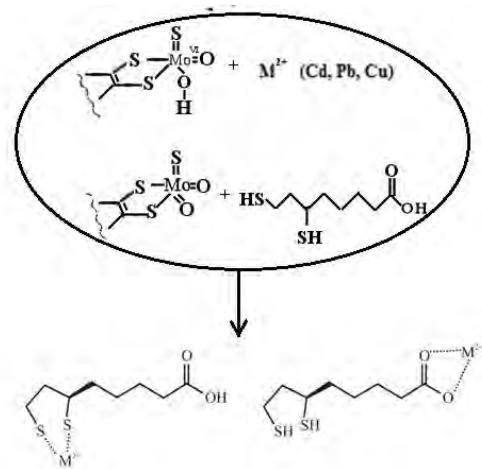
α -Liponska kiselina kao suplement aplicirana dan nakon intoksikacije eksperimentalnih životinja teškim metalima, verovatno reaguje sa jonima metala i smanjuje njihovu mogućnost za interakciju sa aktivnim centrom enzima. Kao čist suplement α -liponska kiselina ne utiče značajno na aktivnost XO odnosno ne reaguje sa enzimom ali značajno povećava aktivnost XDH i pomera ravnotežu u sistemu u korist XDH, tabela 4.4. Ovaj supstituent značajno eliminiše toksično dejstvo Pb²⁺ jona gde je i najizraženija protективna uloga kao i toksično dejstvo Cd. U uslovima hronične intoksikacije subletalnim dozama bakra (u obliku CuSO₄×5H₂O), što se jasno uočava na slici 4.9., α -liponska kiselina značajno povaćava toksično dejstvo ovog M²⁺ jona i dolazi do značajnog povećanja aktivnosti XO u odnosu na kontrolnu grupu. Razlog tome je mogućnost bakra da se javi u dva oksidaciona stanja Cu²⁺ i Cu⁺ i da učestvuje u transporut elektrona u toku oksidacije purinskih baza.

Prema rezultatima merenja aktivnosti XO jetre, α -liponska kiselina utiče značajno kao suplement u uslovima akutnog trovanja kadmijumom, subletalnom dozom, intraperitonealnom injekcijom, tabela 4.6., i značajno povećava aktivnost XDH.

Vremenska razlika između unošenja olova i liponske kiseline (jedan dan), ukazuje na mogućnost da α -liponska kiselina može biti dobar suplement u cilju smanjenja toksičnog dejstva olova (Karlson, 1992). Nepoželjni efekti se mogu uspešno smanjiti, skoro eliminisati pomoću liponske kiseline koji se dodaju uz redovnu ishranu, tabela 4.8.

Prema rezultatima ovih istraživanja na osnovu vrednosti aktivnosti XO/XDH jetre α -liponska kiselina je dobar suplement u slučajevima akutne (Cd) i hronične (Pb) intoksikacije teškim metalima

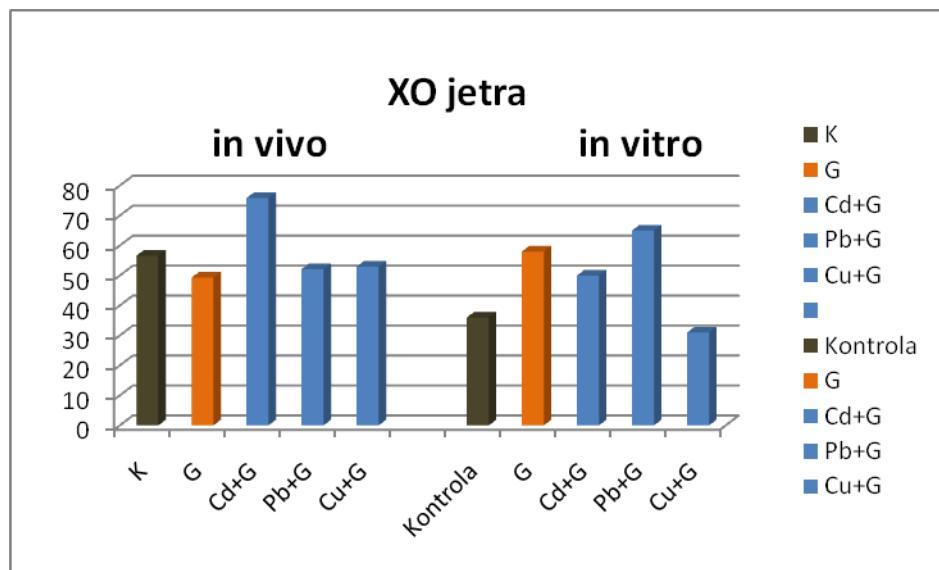
α -Liponska kiselina kao efikasan antioksidans, lipo- i hidrosolubilno jedinjenje lako prolazi kroz membrane u citoplazmu i učestvuje u zaštiti od slobodnih reaktivnih radikala. Brojna istraživanja su pokazala da je liponska kiselina prirodni antioksidans koji služi kao skavendžer slobodnih radikala (Packer i sar., 1995). Ovi rezultati pokazuju da α -liponska kiselina verovatno vezuje teške metale i to manje jone "tvrdje" kiseline, kao što je Cu^{2+} ion, preko O-donor atoma karboksilne grupe, a "mekše" kiseline (Pb^{2+} i Cd^{2+}) preko atoma sumpora i time umanjuje njihovo toksično dejstvo što se vidi iz povećane aktivnosti XDH o čemu nema literaturnih podataka. Literaturni podaci se uglavnom odnose na efekte α -liponske kiseline u sanaciji nitrozativnog stresa u dijabetesu, nefropatiji i koronarnoj bolesti (Gaurav i sar., 2010).



Slika 4.12. Mogući načini interakcije M^{2+} jona metala i enzima, enzima i α -liponske kiseline i građenje odgovarajućih kompleksnih asocijata M^{2+} jona metala sa α -liponskom kiselinom.

Protektivna uloga glutationa u uslovima hronične intoksikacije (Pb i Cu), akutne (Cd) intoksikacije teškim metalima merena je preko aktivnosti enzima XO/XDH iz tkiva jetre i ti

rezultati su sumarno prikazani na slici 4.13 i 4.11. Aktivnost XO je ispitivana i u *in vitro* uslovima koji imaju prednost u odnosu na *in vivo* uslove, jer su strogo kontrolisani, nema drugih biohemijskih procesa i sistem je jednostaviji.

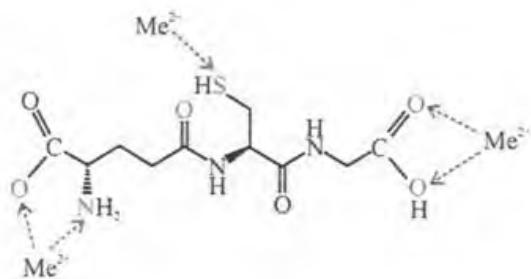


Slika 4.13. Aktivnost XO u jetri u uslovima intoksikacije teškim metalima uz dodatak suplemenata glutationa u *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima

Glutation (GSH) je mali tripeptid, L-γ-glutamil-L-cistenil-glicin, koji je glavni neproteinski tiol. Ovaj peptid karakteriše neobična peptidna veza koja sprečava nespecifičnu desaturaciju hidrolitičkim enzimima koji napadaju normalnu peptidnu vezu. Glutation čini 90% ukupnih neproteinskih sulfidnih jedinjenja ćelije i esencijalni je kofaktor nekih enzima (glutation-peroksidaza, glutation S-transferaza, glutation transhidrogenaza, glutation reduktaza), (poglavlje 2.3.2.).

Široko je rasprostranjen u humanim i životinjskim tkivima, biljkama i mikroorganizmima. Glavni izvori glutationa u namirnicama su: brokoli, spanać, avokado, prokelj, karfiol, kupus i kelj. Glutation kao tiolno jedinjenje deluje kao antioksidans u ćeliji (Parke i sar., 1996). Ovaj tripeptid se nalazi u visokim koncentracijama u skoro svim ćelijama. Nalazi se u citoplazmi, jedru i mitohondrijama i glavni je rastvorni antioksidans u ovim delovima ćelije.

Glutation prema strukturi ima veći broj elektron donor atoma (-N iz -NH₂ grupe, -O iz COOH grupe i -S iz -SH grupe), zato on sam smanjuje aktivnost enzima XO, što je i posledica interakcije GHS sa aktivnim centrom enzima, tabela 4.4.



Slika 4.14. Donor atomi GHS kao potencijalna mesta interakcije sa M^{2+} ionima

Može se reći da je glutation poželjan suplement i antioksidans mereno preko aktivnosti XDH u detoksikaciji reaktivnih kiseoničnih vrsta kod pacova koji su izloženi trovanju olovom kao što su merili Gurer i saradnici (Gurer i sar., 2000). Gubitak glutationa i oksidativno oštećenje predstavljaju jedan od ranih signala u programiranoj ćelijskoj smrti tj. apoptozi ćelije (Kane i sar., 1993).

Prema rezultatima ispitivanja, u ovom radu, glutation najmanje smanjuje toksično dejstvo Cd posmatrano na osnovu povećane aktivnosti XO. Ovaj molekul ne može se smatrati dobriim protektorom u slučajevima intoksikacije kadmijumom. Prema rezultatima ovih ispitivanja glutation najviše umanjuje toksičan efekat Cu^{2+} jona i značajno povećava aktivnost XDH. To može biti iz razloga što bakar može postajati u dva oksidaciona stanja Cu^{2+} i Cu^+ tako da postoji mogućnost da učestvuje u drugim procesima prenosa elektrona i oksido-redukcionim procesima preko Mo. Dodavanjem glutationa, dan nakon izlaganja ovom metalu tokom trajanja eksperimenta, potpuno redukuje efekat toksičnog uticaja metala na aktivnost XDH u jetri i povećava njegovu aktivnost. GSH gradi preko $-SH$ grupe slabo rastvorne merkaptide sa jonima teških metala. Međutim, GSH može i da kompleksira jone teških metala. Verovatna struktura pomenutog kompleksa između GSH i jona teških metala može biti $[M(GSH)_2]$, s obzirom na polidentatnost glutationa kao bioliganda.

Stabilnost kompleksa koje GSH može da nagrađi sa jonom teškog metala zavisi od veličine jona, acidobaznih osobina jona kao i afiniteta $-SH$ grupe. GSH igra prvu liniju odbrane i značajnu ulogu u odbrani od bakarne citotoksičnosti (Singhal i sar., 1987) preko O- Cu^{2+} , N- Cu^{2+} , S- Pb^{2+} (Cd^{2+}). Stabilnost kompleksa glutationa sa jonima teških metala zavisi od njihove

veličine, kiselo-baznih osobina i afiniteta jona metala prema tiolnoj grupi, ali i –O i –N donor atomima i raste u nizu Cd²⁺<Pb²⁺<Cu⁺/Cu²⁺ (Poleć i sar., 2007).

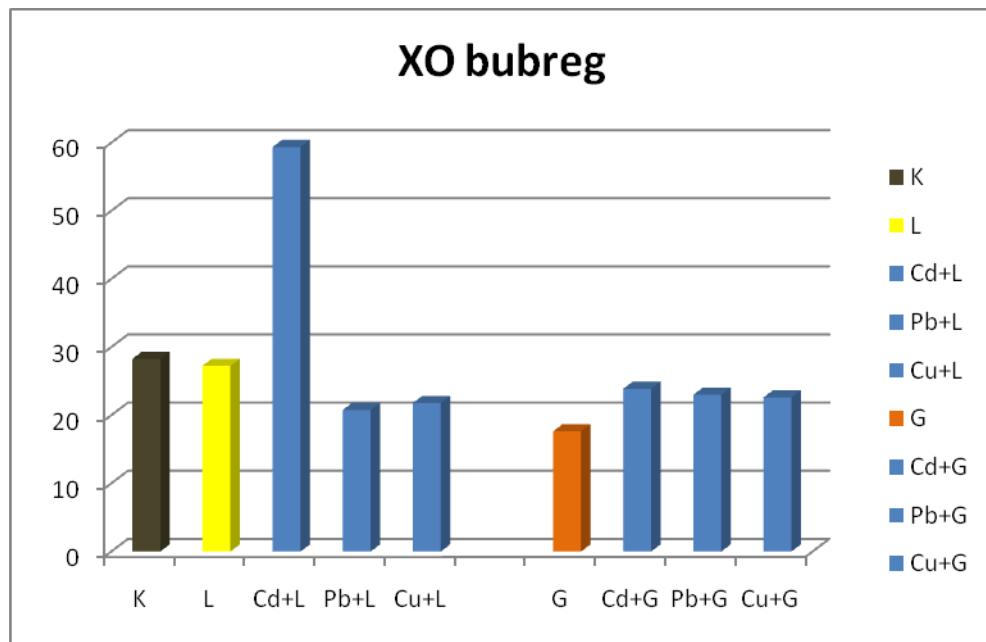
U ovom eksperimentu je pokazana korisna uloga suplemenata glutationa sa antioksidativnim karakterom u prevenciji i smanjenju nepoželjnih efekata hronične intoksikacije bakrom i olovom. Antioksidansi posredno štite ćelije od oksidativnog stresa tako što predstavljaju potencijalne skavendžere slobodnih radikala i zaustavljaju lančanu reakciju lipidne peroksidacije. Ovaj suplementi verovatno učestvuju u zaštiti ćelije od toksičnog dejstva teških metala i regulisanju antioksidativnog sistema odbrane ćelije. Mehanizam njegovog delovanja upućuje na to da se može koristiti kao dodatak ishrani sa potencijalnom protektivnom ulogom. Prema rezultatima praćenja efekata hronične intoksikacije Pb²⁺ ionima na ovom model sistemu glutation se potencijalno može koristiti u uslovima prevencije i zaštite kod populacije ljudi izložene hroničnoj intoksikaciji olovom u životnoj i radnoj sredini.

Glutation koji se prema strukturi sa bakrom može vezivati i preko –N i preko –S pa i –O donor atoma u ovom slučaju ne ispoljava značajnu protektivnu ulogu, na osnovu podataka o aktivnosti XDH u jetri.

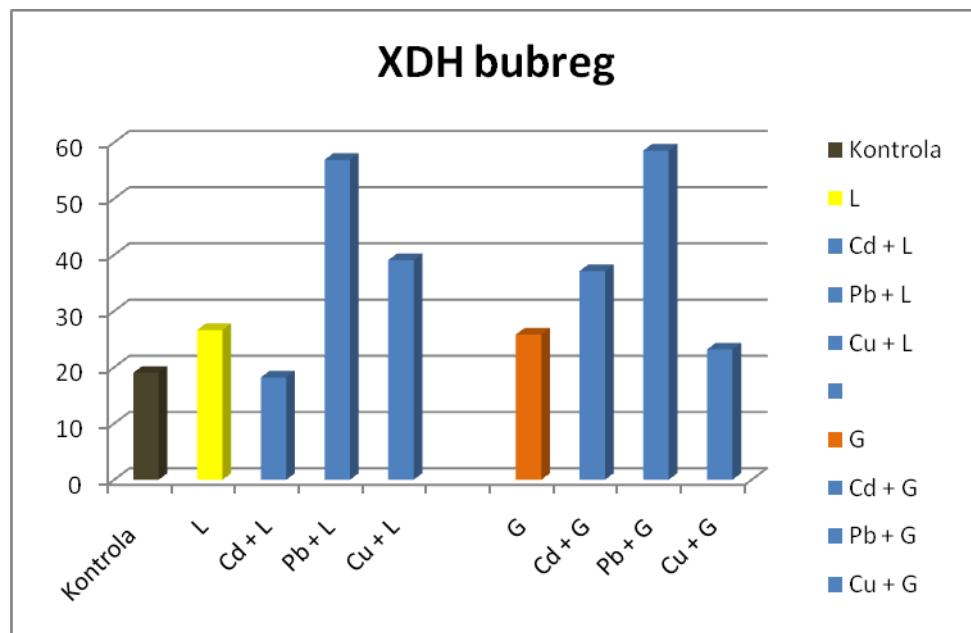
Razlika između rezultata u *in vivo/in vitro* uslovima, slika 4.13. je u složenosti *in vivo* sistema i prisutnosti ostalih biohemijskih procesa.

Toksično delovanje teških metala tokom akutne (Cd) i hronične intoksikacije (Pb i Cu), kao i protektivna uloga suplemenata merena je preko aktivnosti enzima XO/XDH pouzdanije se može sagledati merenjem aktivnosti XO/XDH u tkivu jetre nego u tkivu bubrega. Jedan od razloga prednosti tkiva jetre za praćenje aktivnosti XO je u tome što jetra ispred bubrega u metabolitičkom putu od unosa do ekskrecije teških metala.

Nivoi promena aktivnosti enzima XO u tkivu bubrega tokom intoksikacije teškim metalima i protektivna uloga suplemenata, slika 4.15., ne mogu se objašnjavati samo prostim interakcijama M/aktivni centar enzima i M/supstrat/aktivni centar enzima, zbog dužeg metabolitičkog puta i drugih biohemijskih procesa.



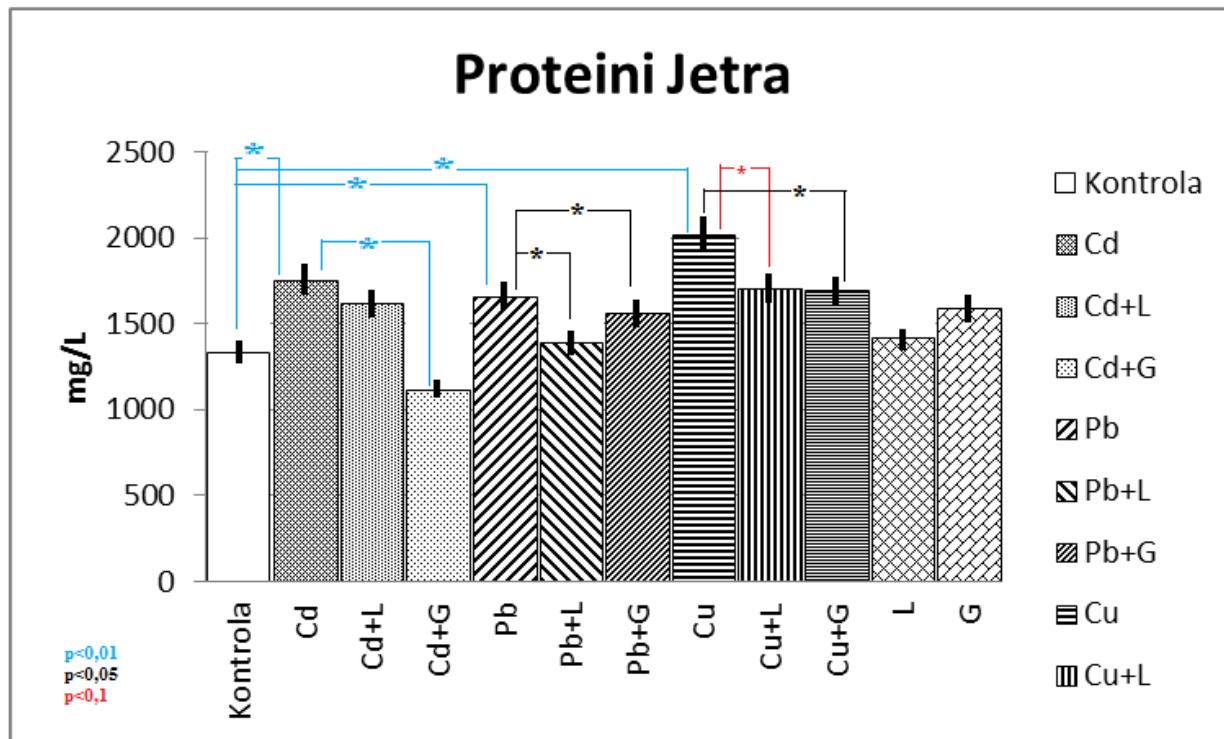
Slika 4.15. Aktivnost XO u bubregu u uslovima intoksikacije teškim metalima uz dodatak suplemenata α -liponske kiseline i glutationa



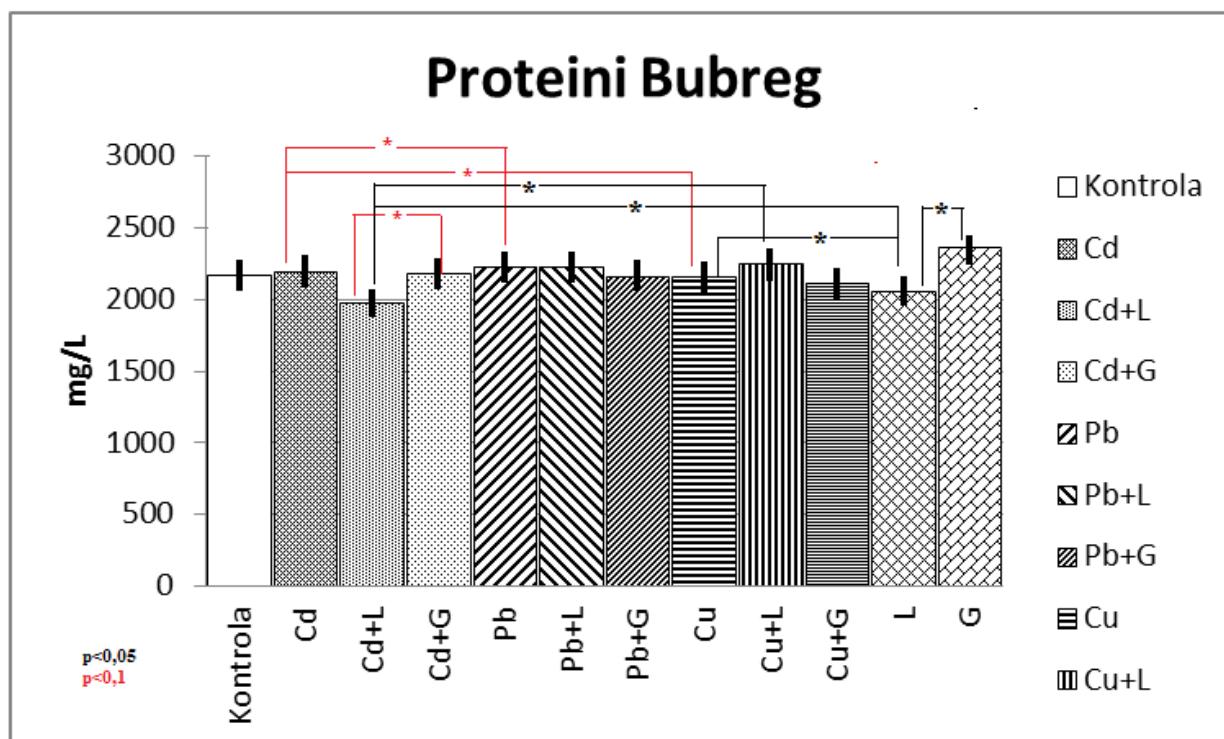
Slika 4.16. Aktivnost XOD u bubregu u uslovima intoksikacije teškim metalima uz dodatak suplemenata α -liponske kiseline i glutationa

4.4. Merenje vrednosti proteina u ispitivanim organima

Izračunavanje sadržaja proteina u tkivima pojedinih organa (jetra i bubreg) je važan parametar u postupku merenja aktivnosti XO i XDH jer je sadržaj proteina jedan od pokazatelja aktivnosti XO. Prema rezultatima dobijenim u ovom radu u uslovima akutne intoksikacije Cd i hronične intoksikacije (Pb i Cu) značajno se menja sadržaj istih u ispitivanim organima. Nivo proteina u prisustvu suplemenata se donekle normalizuje u odnosu na kontrolnu grupu što uslovljava trend promene vrednosti XO i XDH. Povećanje koncentracije proteina u supernatantima ispitivanih organa (jetri i bubregu) usled akutne i hronične intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb i Cu) ukazuje na negativan azotni bilans, dok smanjenje vrednosti u ispitivanim organima pri aplikovanju suplemenata (α -liponske kiseline i glutationa) ukazuju na pozitivan azotni bilans a taj način govore o metaboličkoj aktivnosti ćelije. Rezultati izračunavanja sadržaja proteina u različitim organima nakon intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb i Cu) i davanje suplemenata (LA i GSH) prikazani su u tabeli 4.13. i histogramima slika 4.17. i 4.18.



Slika 4.17. Vrednosti koncentracije proteina u jetri



Slika 4.18. Vrednosti koncentracije proteina u bubregu

Tabela 4.13. Koncentracije proteina u jetri i bubregu

Eksperimentalne Grupe n=6	Proteini (mg/L)	
	Jetra	Bubreg
Kontrola	1333,25 ± 158,96	2171,27 ± 222,29
Kadmijum (Cd)	1757,87 ± 243,55	2197,55 ± 317,58
Cd + L	1621,4 ± 102,86	1975,1 ± 211,02
Cd + G	1121,41 ± 152,75	2179,13 ± 160,25
Olovo (Pb)	1662,21 ± 164,50	2228,35 ± 240,96
Pb + L	1391,11 ± 144,83	2225,31 ± 296,17
Pb + G	1561,05 ± 267,65	2163,4 ± 157,39
Bakar (Cu)	2024,27 ± 346,56	2158,83 ± 123,09
Cu + L	1707,35 ± 163,25	2244,75 ± 93,88
Cu + G	1692,92 ± 89,43	2114,17 ± 270,38
L	1419,32 ± 181,46	2055,12 ± 130,77
G	1591,25 ± 371,78	2362,87 ± 268,71

Vrednosti koncentracije proteina koji su određivani u supernatantu u ovoj studiji su za red veličina više nego li vrednosti koncentracija proteina koje su određivane u homogenatima navedenih organa u istom model sistemu (Jovanović, 2012).

4.5. Rezultati merenja aktivnosti ksantin oksidaze i ksantin dehidrogenaze u uslovima eksperimentalne hiperurikemije

Hiperurikemija (povećani nivo mokraće kiseline u krvi) je veoma čest poremećaj, koji može biti prouzrokovani nizom endogenih i egzogenih faktora. Jedan od najznačajnijih predstavnika primarne hiperurikemije (ali ne i najdramatičnijih) je giht, koji dovodi do degenerativno-zapaljenjskih promena na sitnim zglobovima šake i stopala. Nastaje kao posledica poremećaja u regulaciji sinteze purinskih baza. Enzim koji neposredno dovodi do produkcije mokraće kiseline u dvostepenoj reakciji katabolizma hipoksantina i ksantina je ksantin oksidaza (Alderman, 1999, Aldreman i Aiyer, 2004).

Kod sisara jedino se kod čoveka kao krajnji produkt metabolizma purinskih baza izlučuje mokraćna kiselina, kod ostalih, kao i kod pacova koji su poslužili kao model sistem za ispitivanje aktivnosti XO u patološkom stanju, to nije slučaj. Dodatkom oksonske kiseline kod pacova došlo je do blokade urikaze i nagomilavanja mokraće kiseline što dovodi do pojave giht, bolesti zglova, koji je manifestacija hiperurikemije.

Uticaj eksperimentalne hiperurikemije na aktivnosti XO i XDH jetre i bubrega kod albino pacova Wistar soja prikazani su u tabeli 4.14 i 4.15.

Tabela 4.14. Aktivnost XO i XDH u uslovima eksperimentalne hiperurikemije u jetri

Eksperimentalne grupe n=6	Jetra	
	XO (U/mg proteina)	XDH (U/mg proteina)
Kontrola	12,09 ± 5,68	12,10 ± 2,88
Oksonska kiselina	20,82 ± 5,75	27,77 ± 3,78
Oksonska kiselina + allopurinol	18,38 ± 6,44	58,25 ± 7,18
Alopurinol	14,87 ± 0,3	23,97 ± 5,15

Na osnovu rezultata iz tabele 4.14. može se videti da se aktivnost XO u jetri povećava značajno pod uticajem oksonske kiseline (od $12,09 \pm 5,68$ do $20,82 \pm 5,75$), kao i pod uticajem oksonske kiseline sa allopurinolom (od $12,09 \pm 5,68$ do $18,38 \pm 6,44$), do neznatnog povećanja dolazi dodatkom allopurinola (od $12,09 \pm 5,68$ do $14,87 \pm 0,3$) u odnosu na kontrolnu grupu.

Aktivnost XDH se povećava pod uticajem oksonske kiseline skoro 50% (od $12,10 \pm 2,88$ do $27,77 \pm 3,78$) kao i pod uticajem allopurinola više od 50% (od $12,10 \pm 2,88$ do $23,97 \pm 5,15$). Veoma veliki porast XO je u grupi sa oksonskom kiselinom uz dodatak allopurinola (od $12,10 \pm 2,88$ do $23,97 \pm 5,15$) u odnosu na kontrolnu grupu u jetri.

Alopurinol (1,5-dihidro-4H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-on), kompetitivni inhibitor ksantin oksidaze, je veoma značajan u metabolizmu purinskih baza, pa je otuda i dodeljena Nobelova nagrada za njegovo otkriće. Od tog vremena, giht i hiperurikemija predstavljaju oboljenja, tj stanja koja se mogu uspešno lečiti (poglavlje 2.7.).

Na osnovu dobijenih rezultata primećuje se da alopurinol u uslovima eksperimentalne hiperurikemije kao inhibitor XO smanjuje aktivnost iste pomerajući ravnotežu sistema u korist XDH što smanjuje mogućnost za produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Tabela 4.15. Aktivnost XO i XDH u uslovima eksperimentalne hiperurikemije u bubregu

Eksperimentalne grupe n=6	Bubreg	
	XO (U/mg proteina)	XDH (U/mg proteina)
Kontrola	$23,32 \pm 6,65$	$1,84 \pm 0,78$
Oksonska kiselina	$10,02 \pm 3,5$	$0,88 \pm 0,58$
Oksonska kiselina + allopurinol	$12,97 \pm 1,52$	$2,4 \pm 0,60$
Alopurinol	$17,42 \pm 4,15$	$8,36 \pm 0,50$

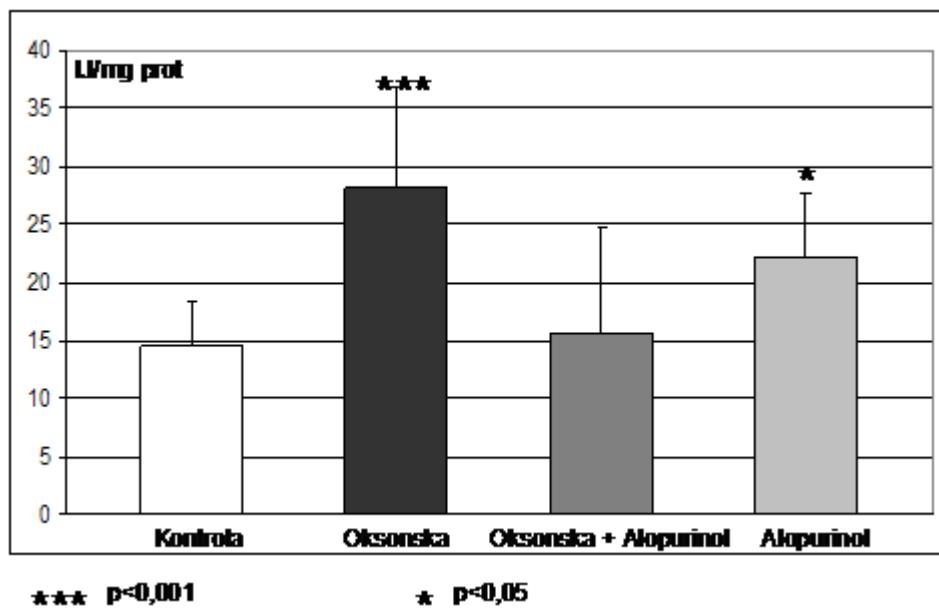
Aktivnost XO u bubregu smanjuje pod uticajem oksonske kiseline za 50% (od $23,32 \pm 6,65$ do $10,02 \pm 3,5$), oksonske kiseline sa dodatkom allopurinola za 50% (od $23,32 \pm 6,65$ do

$12,97 \pm 1,52$), kao i samo sa allopurinolom (od $23,32 \pm 6,65$ do $17,42 \pm 4,15$) u odnosu na kontrolnu grupu, tabela 4.14.

Aktivnost XDH se značajno smanjuje u prisustvu oksonske kiseline (od $1,84 \pm 0,78$ do $0,88 \pm 0,58$), dok se u prisustvu oksonske kiseline uz dodatak allopurinola povećava (od $1,84 \pm 0,78$ do $2,4 \pm 0,60$) u odnosu na kontrolnu grupu. Značajno povećanje XDH se javlja dodatkom allopurinola (od $1,84 \pm 0,78$ do $8,36 \pm 0,50$), tabela 4.14.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja aktivnosti XO/XDH allopurinol u uslovima eksperimentalne hiperurikemije u bubregu, ne deluje kao inhibitor XO i značajno smanjuje aktivnost XDH.

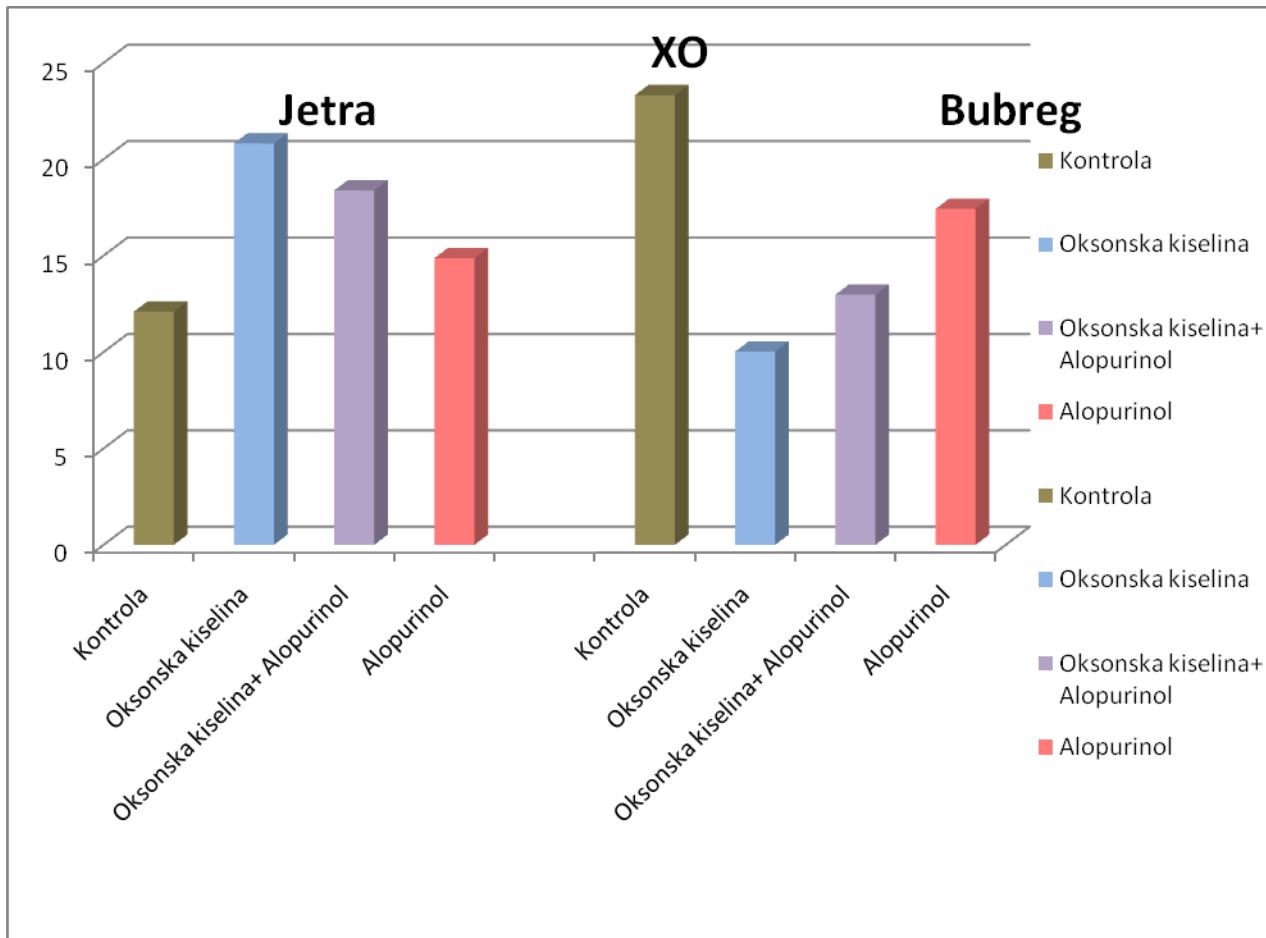
Rezultati ispitivanja aktivnosti XO u tkivu jetre u uslovima eksperimentalne hiperurikemije, koja može u toku hronifikacije procesa dovesti do štetnog nagomilavanja mokraće kiseline u sitnim zglobovima, čašicama i bubrežnoj karlici, pa se ovo oboljenje naziva giht, dati su na slici 4.19.



Slika 4.19. Aktivnost ksantin oksidaze u tkivu jetre u uslovima patološkog stanja

Allopurinol je purinski derivat koji se primenjuje u terapiji gihta. Zbog strukturne sličnosti sa hipoksantinom i ksantinom, inhibira enzim kasntin oksidazu i time smanjuje koncentraciju

mokraćne kiseline u organizmu, što se očitava i u nalazima mokraćne kiseline u krvnom serumu. Allopurinol se metaboliše preko enzima ksantin oksidaze do aktivnog metabolita oksipurinola, koji je kompetitivni inhibitor ksantin oksidaze (slika 2.20.). Oksipurinol pokazuje osobinu da se vrlo čvrsto vezuje za redukovana formu enzima (XDH), koju, takođe, inaktivira.



Slika 4.20. Aktivnost XO jetre i bubrega u patološkom stanju, giht, u jetri

Allopurinol je pokazao visoku efikasnost, ne samo u sanaciji i prevenciji hiperurikemije indukovane oksonskom kiselinom, već i ksantin oksidazne aktivnosti. Rezultati ispitivanja jetrinih enzima pokazali su da je allopurinol smanjio u značajnoj meri hepatocelularno oštećenje izazvano oksonskom kiselinom, ali da je sam imao blaži efekat na enzim. Poznato je da je allopurinol lek izbora u terapiji hiperurikemija i gihta.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati ispitivanja efekta intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb i Cu) i protektivna uloga suplemenata u životnoj i radnoj sredini na model sistemu Wistar soja pacova upućuje na sledeće zaključke:

Dejstvo teških metala (Cd, Pb i Cu) može povećati proces lipidne peroksidacije što se može pratiti na osnovu koncentracije sekundarnog produkta lipidne peroksidacije tj. MDA (malondialdehida).

- U uslovima akutne intoksikacije pacova Wistar soja kadmijumom dolazi do značajnog povećanja koncentracije MDA u odnosu na kontrolnu grupu. Najveći porast koncentracije MDA je u homogenatima jetre (i do 5 puta) u odnosu na eksperimentalnu grupu životinja na normalnom režimu života i ishrane;
- U uslovima hronične intoksikacije oloovom dolazi do značajnog povećanja koncentracije MDA u svim ispitivanim organima. Upoređivanjem rezultata zapažen je značajni porast koncentracije MDA u homogenatu tkiva jetre (i do 6 puta su više vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu eksperimentalnih životinja);
- Dodavanjem suplemenata (α -liponske kiseline ili glutationa) dovodi do značajnog smanjenja koncentracija MDA tj., procesa lipidne peroksidacije na membranama ćelija svih organa.

Efekti izloženosti uticaja toksičnih metala paćeni preko aktivnosti ksantin oksidaze u *in vitro* ispitivnjima:

- Dobijeni rezultati aktivnosti XO u *in vitro* uslovima pokazuju da soli kadmijuma dovode do smanjenja aktivnosti XO, dok soli olova povećavaju aktivnost XO (i to 1,5 puta), kao i soli bakra.
- Antioksidans (α -liponska kiselina) umanjuje negativne efekte teških metala (Cd, Pb i Cu) jer verovatno formira sa njima stabilne asocijate tipa kompleksa i time dovodi do povećanja aktivnosti XO.
- Glutation smanjuje citotoksičnost u *in vitro* sistemu koja je izazvana dejstvom teških metala (Cd i Pb).
- Pozitivan efekat suplemenata (α -liponske kiseline i glutationa) na aktivnost XO zabeležen je pri intoksikaciji Cd i Pb ali ne i kod Cu.

Efekti izloženosti uticaja toksičnih metala praćeni preko aktivnosti ksantin oksidaze i ksantin dehidrogenaze u *in vivo* ispitivanjima:

- Akutno trovanje kadmijumom inhibira neznatno aktivnost XO u jetri u odnosu na eksperimentalnu grupu životinja na normalnom režimu života i ishrane, dok u bubregu povećava 1,3 puta aktivnost XO. Aktivnost XDH u bubregu se povećava u uslovima akutnog trovanja kadmijumom.
- Hronično trovanje olovom dovodi do smanjenja aktivnosti XO u jetri i u bubregu, dok se aktivnost XDH značajno povećava, što smanjuje prodkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta.
- Nakon hronične intoksikacije Wistar pacova bakrom dolazi do smanjenja aktivnosti XO u jetri i bubregu, pri čemu je smanjenje aktivnosti XO veće u jetri što dovodi do pomeranja ravnoteže XO ↔ XDH u korist XDH.
- Upoređivanjem rezultata intoksikacije teškim metalima na aktivnost XO najveći uticaj na smanjenje aktivnosti XO ima Pb^{2+} . Razlog ovome je verovatno veličina jona Pb^{2+} ($Pb^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$), tako da postoji mogućnost zauzimanja tj blokiranja dva koordinaciona mesta u koordinacionoj sferi aktivnog centra enzima. Pb^{2+} jon kao "mekša" Lewis-ova kiselina ima najveći afinitet za interakciju sa donor atomima "mekih" Lewis-ovih baza (S-atoma iz okruženja molibdena u enzimu XO).
- α -Liponska kiselina kao suplement ne utiče značajno u uslovima akutnog trovanja kadmijumom, subletalnom dozom intraperitonealnom injekcijom, na aktivnost XO ali značajno eleminiše dejstvo Pb^{2+} jona. U uslovima hronične intoksikacije subletalnim dozama bakra (u obliku $CuSO_4 \times 5H_2O$), α -liponska kiselina značajno smanjuje toksično dejstvo ovog M^{2+} jona, dovodeći do značajnog povećanja aktivnosti XDH (preko 50%) u odnosu na kontrolnu grupu.
- α -Liponska kiselina je dobar suplement u uslovima intoksikacije teškim metalima ($Pb > Cd > Cu$) jer postoji više donor atoma sa kojima je moguća interakcija sa metalom ($RCOO-Cu$)
- Gutation kao suplement najviše smanjuje toksično dejstvo Cu (oko 60%). Ovaj molekul može se smatrati dobrim protektorom u slučajevima intoksikacije bakrom. Prema rezultatima ovih ispitivanja glutation slabo umanjuje toksičan efekat Cd^{2+} jona, ne pokazuje protektivnu ulogu i povećava značajno aktivnost XO, ($Cd > Pb > Cu$).

Toksično delovanje teških metala tokom akutne (Cd) i hronične intoksikacije (Pb i Cu), kao i protektivna uloga suplemenata merena je preko aktivnosti enzima XO/XDH pouzdanije se može sagledati merenjem aktivnosti XO/XDH u tkivu jetre nego u tkivu bubrega. Jedan od razloga prednosti tkiva jetre za praćenje aktivnosti XO je u tome što jetra ispred bubrega u metabolitičkom putu od unosa do ekskrecije teških metala.

Praćenje aktivnosti XO/XDH u eksperimentalnoj hiperurikemiji

- Rezultati ispitivanja jetrinih enzima pokazali su da je allopurinol smanjio u značajnoj meri hepatocelularno oštećenje izazvano oksonskom kiselinom, ali da sam imao blaži efekat na nivo enzima.
- Allopurinol u uslovima eksperimentalne hiperurikemije kao inhibitor XO smanjuje aktivnost iste pomerajući ravnotežu sistema u korist XDH što smanjuje mogućnost za produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Dobijeni rezultati aktivnosti XO u *in vitro* ispitivanjima ne koreliraju, u potpunosti, sa rezultatima u *in vivo* istraživanjima. U *in vitro* istraživanjima eliminiše se uticaj faktora spoljašnje sredine kao i dejstvo pojedinih metabolita na aktivnost enzima, na taj način eliminiše se efekat na genskom nivou i isključuje mogućnost genske ekspresije enzima i modifikacija baza.

6. SUMMARY

The results of testing the effect of intoxication by heavy metals (Cd, Pb and Cu) and the protective role of supplements in the living and working environment in the model system of Wistar rats leads to the following conclusions:

The effect of heavy metals (Cd, Pb and Cu) can increase process of lipid peroxidation, which can be traced based on the concentration of secondary product of lipid peroxidation i.e. MDA (malondialdehyde).

- The acute toxicity of cadmium in Wistar rats shows a significant increase in MDA concentration compared to the control group. The largest increase in MDA is in liver homogenates (up to 5 times) compared to the experimental group of animals on a normal diet and mode of life;
- In conditions of chronic lead intoxication there was a significant increase in the concentration of MDA in all examined organs. By comparing the results observed in a significant increase of MDA concentration in tissue homogenates of liver (up to 6 times more value than the control group of experimental animals);
- Adding supplements (α -lipoic acid or glutathione) leads to a significant reduction of MDA i.e., lipid peroxidation process on membranes of cells in all organs.

The effects of exposure to toxic metals followed through activities of xanthine oxidase in *in vitro* research:

- The results obtained in the XO activity in *in vitro* conditions show that cadmium salts lead to decreased activity of XO, and lead salts increase the activity of XO (by 1.5 times), same as copper salts.
- Antioxidant (α -lipoic acid) reduces the negative effects of heavy metals (Cd, Pb and Cu) because it is likely to form a stable associative type of complex with them, thus leading to an increase in XO activity.
- Glutathione reduces cytotoxicity in *in vitro* system which is caused by the action of heavy metals (Cd and Pb).
- Positive effect of supplements (α -lipoic acid and glutathione) on XO activity was recorded when intoxicated by Cd and Pb, but not by Cu.

The effects of exposure to toxic metals followed by influence of the activities of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase in *in vivo* examination:

- Acute toxicity of cadmium slightly inhibits the activity of XO in the liver compared to the experimental group of animals on a normal diet and mode of life, while in the kidney there is increased XO activity by 1.3 times. XDH activity in the kidney is increased in conditions of acute cadmium intoxication.
- Chronic lead poisoning leads to decreased activity of XO in the liver and kidney, whereas XDH activity significantly increases, which reduces production of reactive oxygen species.
- After chronic copper intoxication of Wistar rats there is a reduction in XO activity in the liver and kidney, with a greater reduction in XO activity in the liver, which leads to a shift of balance $\text{XO} \leftrightarrow \text{XDH}$ in favor of XDH.
- By comparing the results of intoxication by heavy metals on the activity of XO the biggest impact on the reduction of XO activity is Pb^{2+} . The reason for this is probably the size of Pb^{2+} ions ($\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$), so there is a possibility of taking that block two coordination positions in the coordination sphere of the active site of the enzyme. Pb^{2+} ion as a "softer" Lewis's acid has a high affinity for the interaction with the donor atoms of "soft" Lewis's base (S-atoms in the environment of molybdenum in the enzyme XO).
- α -Liponic acid as a supplement does not have any significant effect in terms of acute cadmium intoxication intraperitoneal injection of a sublethal dose of XO activity but eliminates an important effect of Pb^{2+} ions. With conditions in chronic intoxication with sublethal doses of copper (as $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), α - lipoic acid significantly reduces the toxic effect of the M^{2+} ions, leading to a significant increase in activity XDH (over 50%) compared to the control group.
- α -Lipoic acid is a good supplement in terms of intoxication by heavy metals ($\text{Pb} > \text{Cd} > \text{Cu}$) because there are more donor atoms which are possible to interact with the metal (RCOO-Cu)
- Gutation as a supplement reduces the toxic effects of Cu (about 60%). This molecule can be considered as a good protector in cases of intoxication with copper. According to

the results of these studies, glutathione decreases slightly toxic effect of Cd²⁺ ions, showing a protective role and increases significant activity of XO, (Cd > Pb > Cu).

Toxic effects of heavy metals during the acute (Cd) and chronic intoxication (Pb and Cu) and protective role of supplements was measured via enzyme activity XO / XDH and it can be seen, more reliably, by measuring activities of XO / XDH in the liver than in kidney. One of the reasons why the benefits of liver tissue for monitoring the activities of XO is that liver comes before kidneys in the metabolic route from entry to the excretion of heavy metals.

Monitoring activities XO / XDH in experimental hyperuricemia

- The results of tests of liver enzymes showed that allopurinol decreased significantly hepatocellular damage caused by oxonic acid, but it only had a mild effect at the level of the enzyme.
- Allopurinol in terms of experimental hyperuricemia as an inhibitor of XO reduces the activity it by shifting the balance in favor of XDH system which reduces the production of reactive oxygen species.

The results of XO activity in *in vitro* tests do not correlate with the results of *in vivo* studies. In *in vitro* studies the influence of environmental factors is eliminated as well as the effect of some metabolites on enzyme activity, thus eliminating the effect on genetic basis and excluding the possibility of gene expression of enzyme and modified bases.

7. LITERATURA

Ahamed M., Siddiqui M., K. J. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clinica Chimica Acta*, 2007; **383**, 57-64.

Akdemir H, Asik Z, Pasaoglu H, Karakucuk I, Oktem IS, Koc RK. The effect of allopurinol on focal cerebral ischaemia: an experimental study in rabbits. *Neurosurg Rev.*, 2001; **24**, 131-135.

Alexandrova A., Petrov L., Georgieva A., Kessiova M., Tzvetanova E., Kirkova M., Kukan M. Effect of copper intoxication on rat liver proteasome activity: relationship with oxidative stress. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2008; **22(5)**, 354-62.

Alderman M., Uric acid in hypertension and cardiovascular disease. *Can. J. Cardiol.* 15 (*Suppl F*), 1999, 20-22.

Alderman M, Aiyer KJ. Uric acid: role in cardiovascular disease and effects of losartan. *Curr Med Res Opin.*, 2004; **20**, 369-79.

Anderson M., Meister A. *J. Biol. Chem.* 1980; **255**, 9530-9533.

Andreeva L., Kozhemiakin L., Kishkun A. Modification of the method of determining lipid peroxidation in a test using thiobarbituric acid. *Laboratornoe delo*, 1988; **11**, 41-43.

Annabi Berrahal A., Nehdi A., Hajjaji N., Gharbi N., El-Fazaa S. *C. R. Biol.* 2007; **330(8)**, 581-8.

Arivazhagan P., Thilakavathy T., Ramanathan K., Kumaran S., and Panneerselvam C. Effect of dl- α -lipoic acid on the status of lipid peroxidation and protein oxidation in various brain regions of aged rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002; **13**, 619–624.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for ATSDR. Toxicological profile for cadmium. Atlanta, GA. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 1999.

ATSDR. Toxicological profile for cadmium. *Public Health Service*, ATSDR/TP-8808/08, 1989.

Bannai S., Tateishi N. *J. Membrane Biol.* 1986; **89**, 1-8.

Bannai S. Transport of cysteine and cystine in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 1984; **779**, 289-306.

Bendich A., Machlin LJ., Scandurra O., Burton GW., Wayner DDM. *Adv. Free Rad. Biol. Med.* 1986; **2**, 419-444.

Bieber JD, Terkeltaub RA. Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthritis Rheum*, 2004; **50**, 2400-14.

Borges F, Fernandes E, Roleira F. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 2002; **9**, 195-217.

Boudin F., Биохимические функции молибдена, *Методы и достижения бионеорганической химии*, МакОлифф К.А., ред., Мир, Москва, 1978.

Brittain T., Blackmore R., Greenwood C., Thompson A.J., *Eur. J. Biochm.*, 1992; **209**, 793-802

Brown JM, Terada LS, Grosso MA, Whitmann GJ, Velasco SE, Patt A, Harken AH, Repine JE. Xanthine oxidase produces hydrogen peroxide which contributes to reperfusion injury of ischemic, isolated, perfused rat hearts. *J. Clin. Investig.* 1988; **81**, 1297-301.

Brzoska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J., Calcium deficiency as on the risk factors for osteoporosis. *Post. Hig. Med. Dosw.* 1997; **51**, 55-74.

Cantor C.R., Schimmel P.R., *Biophysical Chemistry*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1980.

Chatt J., da Camara Pina L.M., Richards R.L., New Trends in the Chemistry of Nitrogen Fixation, *Academic Press*, London – New York, 1980.

Chen J., Jiang W., Cai J., Tao W., Gao X. and Jiang X. Quantification of lipoic acid in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2005; **824**, 249–257.

Cighetti G., Debiasi S., Paroni R., *Biochem. Pharm.*, 1993; **45**(11), 2359-2361.

Cotgreave I.A., Moldeus P., Orrenius S. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1988; **28**, 189-212.

Couderay C., Rachidi S., Favier A., *Biol. Trace Element Res.*, 1993; **38**(3), 273-287.

Crichton R. R. *Biological Inorganic Chemistry An Introduction*, Elsevier, 2008.

Cross CE., Haiiwel B., Barish ET., Pryor WA., Ames BN., Saul RL. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Inter. Med.* 1987; **107**, 526-45.

Dass PD., Bermese W., Holmes EW. *Biochem. Biophys. Acta*, 1992; **1156**, 99-102.

David J. F. Symptoms toxicity of heavy metals. *J. American Med. Asso.* 2001; **260**, 1523 – 1533.

Davies Kja. *Free Radic. Biol. Med.* 1986; **2**, 155-173.

- Davison AJ., Kettle AJ., Fatur DJ. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**, 1193-1200.
- Demling R., Daryani R., Campbell C., Knox J., Youn Y.K., Lalonde C., *Surgery*, 1993; **114**(3), 571-578.
- Dixon M., Webb E.C., *Enzymes*, Longman Group Ltd., London, 1979.
- Droge W., Schulze-Osthoff K., Mihm S., Galter D., Schenk H., Eck HP., Roth S., Gmunder H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *Faseb J.* 1994; **8**, 1131–1138.
- Dubravka Č., Ivana Č., „Strausova medicinska hemija“, Medicinska naklada, Zagreb, 2009.
- Dorđević V. Biochemical oxidation. In: Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G, editors. *Biochemistry*, Beograd, Savremena administracija, 2000; 678–705.
- Ercal N., Treratphan P., Hammond T.C., Mathews R.H., Grannemann N.H., Spitz D.R. In vivo indices of oxidative stress in lead exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or N-acetyl cysteine. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; **21**, 157–161.
- Ensminger E.M., Perry C.R., Beef Cattle Science, Animal Agriculture Series, Seventh Edition, Danville, Illinois, 1996
- Farber JL., Kyle ME., Coleman JB. *Lab. Invest.* 1990; **62**, 670-679.
- Filipović I., Lipanović S., Opća i anorganska kemija, II deo, Školska knjiga, Zagreb, 1998.
- Fischbein A. Occupational and environmental lead exposure. In: Rom WN. ed. *Environmental and Occupational Medicine*, Boston, Little Brown, 1992; **2**, 735-758.
- Flora S.J.S., Flora G.J.S., Saxena G., in: S.B. Cascas, J. Sordo Eds. Lead: Chemistry, Analytical Aspects, *Environmental Impacts and Health Effects*, Elsevier, Publication, Netherlands, 2006; 158-228.
- Flora S.J.S., Mittal M. and Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 2008; **128**, 501-523.
- Freifelder D., *Physical Biochemistry. Application to Biochemistry and Molecular Biology*, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1976.

Friberg L., Nordberg GF., Vouk VB. In: *Handbook on the Toxicology of Metals*, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1986; 521-531.

Fukuzawa K., Soumin K., Iemura M., Goto S., Tokumura A., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995; **361**, 83-91.

Fujimoto S., Kawakami N., Ohara A., *Biol. Pharm. Bull.*, 1995; **18**(3), 396-400.

Fuke I., Koki N., Watanabe and Kumada S. Acute, subacute and chronic toxicities of thioctic acid in rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 1972; **68**, 175–265.

Fukuhara M. and Takabatake E. *In vitro* inhibitory action of cadmium on microsomal monooxygenases of rabbit lung, *Biochemical Pharmacology*, 1982; **31**, 3425–3429.

Gaurav D., Preet S., Dua KK. Chronic cadmium toxicity in rats: treatment with combined administration of vitamins, amino acids, antioxidants and essential metals. *J. Food Drug Anal.* 2010; **18**(6), 467-470.

Gibson D.D., Brackett D.J., Squires R.A., Balla A.K., Lerner M.R., McCay P.B., Pennington L.R., *Free Radical Biol. Med.*, 1993; **14**(4), 427-433.

Glotzer D.E. Management of childhood lead poisoning: strategies for chelation. *Pediatr. Ann.* 1994; **23**, 606-12.

Godt J., Scheidig F., Grosse-Siestrup C., Esche V., Brandenburg P., Reich A., Groneberg D.A. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2006; **1**, 22.

Goering P.L., Waalkes M.P., Klaassen C.D. Toxicology of cadmium, In: Goyer, RA., Cherian, MG., editors, *Toxicology of metals: biochemical aspects, Handbook of experimental pharmacology*, 1995; 189-213.

Gonzalezflecha B., Cutrin J.C., Boveris A., *J. Clin. Invest.*, 1993; **91**(2), 456-464.

Goyer R.A., Toxic and essential metal interactions, *Annu. Rev. Nutr.* 1997; **17**, 37-50.

Goyer R., Toxic effects of metals. *Casarett and Doull's toxicology, pergammon press*, New York, 1991; 623-680.

Gupta R., Kannan G. M., Sharma M. and Flora S. J. A. Therapeutic effects of *Moringa oleifera* on arsenic-induced toxicity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2005; **20**, 456-464.

Gurer H., Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; **29**, 927–945.

Hagen T.M., Ingwersen R.T., Lykkesfeldt J., Liu J., Wehr C.M. and Vinarsky V. *et al.*, (R)- α - lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *Faseb Journal*, 1999; **13**, 411–418.

Halliwell B. *Br. Med. J.* 1983; **285**, 296-296.

Halliwell B. *Free Rad. Res. Comms.* 1990; **9**, 1-32.

Halliwell B. Reactive oxygen species in living system, Source, biochemistry and role in humane disease. *Am. J. Med.* 1991; **91**, 14-21.

Halliwell B., Gutteridge JMC., Cross CE. *J. Lab. Clin. Med.* 1992, **119**, 598-620.

Halliwell BI., Gutteridge JMC. *Lance*, 1984; **23**, 1396-1397.

Halliwell BI., Gutteridge JMC. U, Lipid peroxidation a radical chain reaction, U, *Free radicals an biology and medicine*. Oxford, Clarendon Press. 1985; 193-189.

Hanahan D. and Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; **100(1)**, 57–70.

Hardi P.B., Berns P-K., Paršal D.V., Бионеорганическая химия фиксации молекулярного азота, *Mir, Москва*, 1978; 152-217.

Harman D. Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontology*, 1956; **11**, 298–300.

Harper H.A., Rodwell V.W., Mayers P.A., *Pregled fiziološke hemije, Savremena administracija*, Beograd, 1982.

Harris RA., Joshi M., Jeoung NH., Obayashi M. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J. Nutr.* 2005; **135(6)**, 1527S-1530S.

Hashimoto J. New spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Anl. Biochem.* 1974; **62**, 426-435.

Hiller R., Nishino T., *FASEB J.*, 1995; 995-1003.

Hogg N., Darleyusmar V.M., Wilson M.T., Moncada S., *FEBS Lett.*, 1993; **326**, 199-203.

Horton AA., Fairhurst S. *Crit Rev Toxicol*, 1987; **18**, 27-29.

Hurley W.L., Doane R.H., Recent Developments in Roles of Vitamins and Minerals in Reproduction. *J. Dairy Sci.*, 1989, **72**, 1123-1135.

Jablonski P., Howden B.O., *Rea DA. Transplantation*, 1983; **35**, 198-204.

Jacob S., Streeper R.S., Fogt D.L., Hokama J.Y., Tritschler H.J., Dietze G.J. and Henriksen E.J. The antioxidant α -lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant ratskeletal muscle. *Diabetes*, 1996; **45(8)**, 1024–1029.

James L., Holly MD. Glutathione and Oxidative Stress - Part I, *Medical associates, L.L.P.* Southeast Texas.

Jark M., *Mikrobiologija*, 1989; **26(1)**, 63-67.

Javouheydonzel A., Guenot L., Maupoil V., Rochette L., Rocquelin G., *Lipids*, 1993; **28(7)**, 651-655.

Jian-Ming Y., Arnush M., Qiong-Yu C., Xiang-Dong W., Bing P., Xue-Zhi J. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reproductive Toxicology*, 2003; **17**, 553-560.

Jovanović J., Praćenje efekta hronične intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb, Cu) i protektivne uloge suplemenata S-donor liganada preko aktivnosti endonukleaza i sekundarnog produkta lipidne peroksidacije, Doktorska disertacija, PMF, Niš, 2012.

Jovanović J., Nikolić R., Krstić N., Kocić G. Monitoring of lipoic acid protective role by liver endonucleases activity in acute toxicity with cadmium and lead. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011; **44** (1), 186-187.

Kadiiska M.B., Hanna P.M., Jordan S.J. and Mason R.P., Electron spin resonance evidence for free radical generation in copper-treated vitamin E- and selenium-deficient rats: in vivo spin-trapping investigation. *Mol. Pharmacol.* 1993; **44**, 222–227.

Kagan VE. U, Lipid peroxidation in biomembranes. Florida, *CRC. Press, Inc. Boca Raton*. 1988.

Kaličanin B.M., Nikolić R.S., Marjanović N.J., Application of potentiometric stripping analysis with constant inverse current for determining soluble lead in human teeth. *Anal. Chim. Acta*, 2004; **525(1)**, 114-119.

Kaličanin B.M., Nikolić R.S., Nikolić G.M. Potentiometric stripping analysis of lead and cadmium leaching from dental prosthetic materials and teeth. *J. Serb. Chem. Soc.* 2004; **69(7)**, 575-580.

Kane D.J., Sarafian T.A., Anton R., Hahn H., Gralla E.B., Valentine J.S., OÈ rd, T. and Bredesen, D.E. Bcl-2 inhibition of neuronaldeath: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, 1993; **262**, 1274-127

Karlson P. *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1992.

Kataoka H. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *Journal of Chromatography B*. 1998; **717**, 247–262.

Kehrer J.P., Piper H.M., *Free Rad. Res. Comms.*, 1987; **3**, 69-78.

Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, nakagawa T, Roncal C, Mu W, Krotova K, block E, Prabhakar S, Johnson RJ. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney International*, 2005; **67**, 1739–42.

Klassen C.D., Liu J., Choudhuri S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; **39**, 267–294.

Kokilavani V., Devi M. A. Sivarajan K. and Panneerselvam, C. Combined efficacies of dl-lipoic acid and meso 2,3 dimercaptosuccinic acid against rsenic induced toxicity in antioxidant systems of rats. *Toxicology Letters*, 2005; **160**, 1 - 7.

Kocić G., Pavlović D., Đodević V., Bjelaković G., Stojanović I. Role of nitric oxide and peroxynitrite in apoptosis–relation to endonuclease activity. *Jugoslov. Med. Biohem.* 2003; **22 (2)**, 93-100.

Kocić G., Bjelaković Lj., Cvetković T., Pop-Trajković Z., Jonović M., Bjelaković B., Sokolović D., Jevtović T., Stojanović D., Aktivnost enzima u humanom mleku u toku prvog meseca laktacije, *Acta Medica Medanae*, 2010; **49(2)**.

Lauwerys R., Cadmium in man, The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. Elsevier, *North Holland Biomed. Press*, 1979; 433-453.

Linn S. *Drug Metab. Rev.* 1998; **30**, 313-326.

Lodge J.K., Youn H.D., Handelman G.J. Natural sources of lipoic acid: determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection. *J. Appl. Nutr.* 1997; **49**, 3-11.

Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; **193**, 265-275.

Lu SC., Garcia-Ruiz C., Kuhlenkamp J., Ookhtens M., Salas-Prato M., Kaplowitz N. *J. Biol. Chem.* 1990; **265**, 16088-16095.

Lynch S.M., Frei B., *J. Lipid Res.*, 1993; **34**(10), 1745-1753.

Majkić-Singh N., Bogavac Lj., Kalimanovska V., Jelić Z., Spasić S., *Clin. Chim. Acta.*, 1987; **162**, 29-36.

Matsugo S., Yan L.J., Konishi T., Youn H.D., Lodge J.K. and Ulrich H. *et al.*, The lipoic acid analogue 1,2-diselenolane-3-pentanoic acid protects human low density lipoprotein against oxidative modification mediated by copper ion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997; **240**, 819-824.

Meyer J., Fujinaga J., Gaillard J., Lutz M., *Biochemistry*, 1994; **33**(46), 13642-13650.

McCord M.J., *N. Engl. J. Med.*, 1985; **312**, 159-163.

McCord M.J., Superoxide radical: controversis, contradiction and paradoxes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1995; **209**, 112-117-8.

McIntyre TM., Cuthoys NP. *J. Biol. Chem.* 1983; **257**, 11915-11921.

Meister A., Anderson M. *Annu Rev. Biochem.* 1983; **52**, 711-760.

Meister A., Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**(33), 17205-208.

Meister A. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**, 17205-17208.

Mid D., Свободнорадикальные механизмы повреждения липидов и их значение для клеточных мембран, *Свободные радикалы в биологии*, Том 1, 68-87, Мир, Москва, 1979.

Mimić-Oka J. *Yugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1994; **30**, 1-23.

Mohammed-Brahim B., Buchet J.P., Bernard A., Lauwerys R. In vitro effects of lead, mercury and cadmium on the enzymic activity of red-blood cell pyrimidine 5'- nucleotidase. *Toxicology Letters*, 1984; **20**(2), 195-199.

Munoz E., Palermo S. Determination of heavy metals in honey by potentiometric stripping analysis and using a continuous flow methodology. *Food Chem.* 2006; **94**, 478-483.

Ngo T.T., Lenhoff H.M., Enzyme-mediated immunoassay, *Plenum Press*, New York-London, 1985.

Nikolić R., *Hemija prelaznih metala*, PMF, Niš, 2001.

Nikolić Ružica S., Kaličanin Biljana M., Nikolić Goran M., Potentiometric stripping analysis of lead and cadmium leaching from dental prosthetic materials and teeth. *Journal of the serbian chemical society*, 2004, **69**(7), 575-580.

Obračević Č., Osnovi ishrane domaćih životinja, *Naučna knjiga*, Beograd, 1990.

Okhtens M., Kaplowitz N. *Semin. Liver Dis.* 1998; **18**, 313-329.

Orrenius S., Ormstad K., Thor H., Jewell SA. *Fed. Proc.* 1983; **42**, 3177-3188.

Parke D.V., Piotrowski J., Glutathione: Its role in detoxication of reactive oxygen and environmental chemicals. *Acta Pol. Toxicol.* 1996; **4**, 1.

Patrick L. Lead toxicity part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern. Med. Rev.* 2006; **11**, 114-27.

Pavlović D., Đorđević VB., Koračević D., Stefanović V., *XIIth International Congress of Nephrology, Jerusilem, Abstracts*, 1993; 256.

Pavlović D., Slobodni radikali, lipidna peroksidacija i antioksidativna zaštita. U: Koračević D., Bjelaković G., Đorđević V., Nikolić J., Pavlović D., Kocić G. *Biohemija*, Beograd, Savremena administracija, 2006, 692-702.

Pavlović D., Stojanović I., Kocić G., Bjelaković G. *J. Hepatol.* 1994; **21**, 235.

Poleć-Pawlak K., Ruzik R., Lipiec E. Investigation of Cd(II), Pb(II) and Cu(I) complexation by glutathione and its component amino acids by ESI-MS and size exclusion chromatography coupled to ICP-MS and ESI-MS, *Talanta* 2007; **72**, 1564-1572.

Ponce-Canchihuaman JC., Perez-Mendez O., Hernandez-Munoz R., Torres Duran PV., Juarez- Oropeza MA. *Lipids Health Dis.* 2010; **31**, 9-35.

Popović V., Tričković K. *Expert journal of the students of the university of Niš*, Booklet for medical science. 1983; **93**, 1-4.

Puttfarcken P.S., Getz R.L., Coyle J.T., *Brain. Res.*, 1993.,38(3), 273-287.

Quinlan GJ., Halliwell B., Moorhouse CP., Gutteridge JMC. ,Action of lead(II) and aluminium(III) ions oniron-stimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1988; **962**, 196-200.

Radojević M., Bashkin V. *Practical Environmental Analysis*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 1999.

Reed LJ., DeBusk BG., Gunsalus IC., et al. Crystalline α -lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*, 1951; **114**, 93-94.

Ružica S. Nikolić, Goran M. Nikolić, Dragan M. Đorđević, Nenad S. Krstić, *Koordinaciona hemije–Osnovi, vežbe i drugi oblici nastave*, PMF, Niš, 2011.

Sandhir R., Julka D., Gill KD. Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacology and Toxicology*, 1994; **74**, 66-71.

Satarug S., B. JR., et al. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters*, 2003; **137**, 65-83.

- Sayed A. L., Newairy A. *Food Chem. Tox.* 2009; **47**, 813-818
- Setaro F., Morley CD. A rapid colorimetric assay for DNA. *Anal. Biochem.* 1977; **81**, 467- 471.
- Sevanian A., Kim E. *Free Radic. Biol. Med.* 1985; **1**, 263-271.
- Shan X., Aw TY., Jones DP. *Pharmacol. Ther.* 1990; **47**, 61-71.
- Sharma R. P., Street J. C., Public healt aspects F. Author F., Author S., Author T. Title of the paper with only first letter capitalized. *Journal name or Conference proceedings*, 2001; **2**, 135-138.
- Shatma DC., Riyat M., Biochemistry for dental Students, *B.I Publications Pvt. Ltd. New Delhi*. 2007; 311-13.
- Sies H., Stahl W., Sundquist AR. *Ann NY Acad. Sci.* 1992; **669**, 7-20.
- Sies H., *Eur. J. Biochem.*, 1993; **215**, 213-219.
- Smith B.E., Eady R.R., *Eur. J. Biochem.*, 1992; **205**, 1-15.
- Singhal R. K., Anderson M. E. and Meister A. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J.* 1987; **1**, 220-223.
- Sodeman T., Bronk SF., Roberts PJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000; **278(6)**, G992-G999.
- Sohal, R.S. and Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science*, 1996; **273**, 59-63.
- Stampfer MJ., Hennekns CH., Manson JE., Colditz GA., Rosner B., Willett WC. *N Eng. J. Med.* 1993; **328**, 1444-49.
- Steinbeck M.J., Khan A.U., Karnovsky M.J., *J. Biol. Chem.*, 1993; **268(21)**, 15649-155654.
- Stripe F., Della Corte E., *J. Biol. Chem.*, 1969; **244**, 3855-3860.
- Suzuki Y. T., Tsuchia M., and Packer, L. Thioctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Rad. Res. Commun.* 1991; **15**, 255-263.
- Tagami M., Ikeda K., Yamagata K., Nara Y., Fujino H., Kubota A., Numano F., Yamori Y. *Lab. Invest.* 1999; **79**, 609-615.

Tasić N., Radak Đ., Cvetković Z., Petković B., Ilijevski N., Đorđević-Denić G. Uloga znčaj oligoelemenata u patogenezi ateroskleroze, *Vojnosanitetski pregled br.6.* 2004; **61**, 667-673.

Teichert J., Tuemmersv T., Achenbach H., Preiss C., Hermann R., Ruus P. and Preiss R. Pharmacokinetics of α -lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease. *J. Clin. Pharmacol.* 2005; **45(3)**, 313-328.

Tietz W.N., Fundamentals of Clinical Chemistry, Third Edition, *W.B. Saunders Company*, Philadelphia PA 19906, 1987.

Timbrell J., *Principles of biochemical toxicology*, Taylor Francis, London, 2000; **3**.

Todorović M., ĐurĐević P., Antonijević V., *Optičke metode instrumentalne analize*, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, 1997.

Tong S., McMichael AJ. The magnitude, persistence and public health significance of cognitive effects of environmental lead exposure in childhood. *J. Environ. Med.* 1999; **1**, 103-110.

Turnlund J.R., Copper, Shils M.E., Olson J.A., Shike M., Ross A.C., Editors, *Modern Nutrition in Health and Disease*, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1999.

Turnlund J.R., Keyes W.R., Peiffer G.L. and Scott K.C., Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope ^{65}Cu . *Am.J. Clin. Nutr.* 1998; **67**, 1219-1225.

Ursini F., Bindoli A. *Chem. Phys. Lipids*, 1984; **44**, 255-276.

Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 2005; **12**, 1161-1208.

Waalkes M.P., Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Biochem.* **79**, 2000; 241-244.

Wendel A., Feurstein S. *Biochem. Pharmacol.* 1981; **30**, 2513-2520.

Wentz P.W. *Chelation Therapy: Conventional Treatments*. Burlington, NC: Advance for Administrators of the Laboratory, Lab. Corp. 2000.

Wolfe B.M., Lui S.M., Cowan J.A., *Eur.J.Biochem.*, 1994; **223**, 79-89.

Wolff Simon P. et al. Thioctic (Lipoic) Acid: A Therapeutic Metal Chelating Antioxidant. *Biochem. Pharmacol.* 1995.

Yin SJ., Lin TH. Lead-catalyzed peroxidation of essential unsaturated fatty acid. *Biol. Trace Elem.* 1995; **50**, 167-172.

Yoshikawa T., Kokura S., Tainaka K., Naito Y., Kondo M., *Cancer Res.*, 1995; **55**(8), 1617-1620.

Zaharova I., Buglova T., Tihomirova A., Ферменты, трансформирующие галактозу, *Наукова думка, Київ*, 1988.

Zhao XY., Hutchens TW. Proposed mechanisms for the involvement of lactoferrin in the hydrolysis of nucleic acids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994; **357**, 271-278.

Ziegler, D., Hanefeld, M., Ruhnau, K. J., Meissner, H. P., Lobisch, M., Schutte, K., and Gries, F. A. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the antioxidant α-lipoic acid. *Diabetologia*, 1995; **38**, 1425-1433.

8. PRILOG

Sadržaj priloga

PRILOG 1. Statistička obrada podataka ispitivanja aktivnosti XO u tkivu jetre

PRILOG 2. Statistička obrada podataka ispitivanja aktivnosti XO u tkivu bubrega

PRILOG 3. Statistička obrada podataka ispitivanja aktivnosti XDH u tkivu jetre

PRILOG 4. Statistička obrada podataka ispitivanja aktivnosti XDH u tkivu bubrega

Prilog 1

kontrola-Cd

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52.7	61.9
Mean	57.38	48.504
Variance	91.207	99.26863
Observations	5	5
Pooled Variance	95.23782	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	1.438078	
P(T<=t) one-tail	0.094178	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.188356	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontrola-Cd+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52.7	51.06
Mean	57.38	47.398
Variance	91.207	15.32382
Observations	5	5
Pooled Variance	53.26541	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	2.162544	
P(T<=t) one-tail	0.031271	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.062541	
t Critical two-tail	2.306004	

$p \leq 0.1$

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomu alternativnu hipotezu postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontola-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52.7	48.3
Mean	57.38	45.578
Variance	91.207	141.4167
Observations	5	5
Pooled Variance	116.3119	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	1.730269	
P(T<=t) one-tail	0.060916	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.121832	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatamo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontrola-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52.7	52.82
Mean	57.38	54.804
Variance	91.207	29.41908
Observations	5	5
Pooled Variance	60.31304	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.524457	
P(T<=t) one-tail	0.307089	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.614178	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatamo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontola-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52.7	53.22
Mean	57.38	46.332
Variance	91.207	67.94857
Observations	5	5
Pooled Variance	79.57779	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	1.958203	
P(T<=t) one-tail	0.042948	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.085896	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.1

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontola-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52.7	58.24
Mean	57.38	60.84
Variance	91.207	123.199
Observations	5	5
Pooled Variance	107.203	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-0.52838	
P(T<=t) one-tail	0.305789	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.611578	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

kontrola-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52.7	43.5
Mean	57.38	58.148
Variance	91.207	5.19152
Observations	5	5
Pooled Variance	48.19926	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-0.17491	
P(T<=t) one-tail	0.432749	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.865497	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa***Cd-Cd+L***

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	61.9	51.06
Mean	48.504	47.398
Variance	99.26863	15.32382
Observations	5	5
Pooled Variance	57.29623	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.231027	
P(T<=t) one-tail	0.411547	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.823093	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

Cd-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	61.9	48.3
Mean	48.504	45.578
Variance	99.26863	141.4167
Observations	5	5
Pooled Variance	120.3427	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.42173	
P(T<=t) one-tail	0.342163	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.684326	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa***Cd-Pb+L***

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	61.9	52.82
Mean	48.504	54.804
Variance	99.26863	29.41908
Observations	5	5
Pooled Variance	64.34386	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-1.24182	
P(T<=t) one-tail	0.124738	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.249476	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

Cd-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	61.9	53.22
Mean	48.504	46.332
Variance	99.26863	67.94857
Observations	5	5
Pooled Variance	83.6086	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.375582	
P(T<=t) one-tail	0.358496	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.716991	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa***Cd-Cu+L***

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	61.9	58.24
Mean	48.504	60.84
Variance	99.26863	123.199
Observations	5	5
Pooled Variance	111.2338	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-1.84938	
P(T<=t) one-tail	0.050787	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.101573	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

Cd-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	61.9	43.5
Mean	48.504	58.148
Variance	99.26863	5.19152
Observations	5	5
Pooled Variance	52.23008	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.10992	
P(T<=t) one-tail	0.033941	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.067881	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.1

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	51.06	48.3
Mean	47.398	45.578
Variance	15.32382	141.4167
Observations	5	5
Pooled Variance	78.37027	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.325062	
P(T<=t) one-tail	0.376736	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.753472	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

Cd+L-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	51.06	52.82
Mean	47.398	54.804
Variance	15.32382	29.41908
Observations	5	5
Pooled Variance	22.37145	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.47575	
P(T<=t) one-tail	0.019183	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.038365	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	51.06	53.22
Mean	47.398	46.332
Variance	15.32382	67.94857
Observations	5	5
Pooled Variance	41.63619	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.261211	
P(T<=t) one-tail	0.400264	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.800528	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

Cd+L-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>51.06</i>	<i>58.24</i>
Mean	47.398	60.84
Variance	15.32382	123.199
Observations	5	5
Pooled Variance	69.26139	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.55381	
P(T<=t) one-tail	0.016986	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.033973	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatamo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>51.06</i>	<i>43.5</i>
Mean	47.398	58.148
Variance	15.32382	5.19152
Observations	5	5
Pooled Variance	10.25767	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-5.30706	
P(T<=t) one-tail	0.000361	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.000722	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.001

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatamo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	48.3	52.82
Mean	45.578	54.804
Variance	141.4167	29.41908
Observations	5	5
Pooled Variance	85.4179	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-1.57837	
P(T<=t) one-tail	0.076567	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.153133	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	48.3	53.22
Mean	45.578	46.332
Variance	141.4167	67.94857
Observations	5	5
Pooled Variance	104.6826	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-0.11652	
P(T<=t) one-tail	0.455056	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.910112	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	48.3	58.24
Mean	45.578	60.84
Variance	141.4167	123.199
Observations	5	5
Pooled Variance	132.3078	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.09792	
P(T<=t) one-tail	0.034581	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.069161	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.1

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	48.3	43.5
Mean	45.578	58.148
Variance	141.4167	5.19152
Observations	5	5
Pooled Variance	73.30412	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.32135	
P(T<=t) one-tail	0.024408	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.048816	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb+L-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52.82	53.22
Mean	54.804	46.332
Variance	29.41908	67.94857
Observations	5	5
Pooled Variance	48.68382	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	1.919834	
P(T<=t) one-tail	0.045569	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.091139	
t Critical two-tail	2.306004	

 $p \leq 0.1$

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb+L-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52.82	58.24
Mean	54.804	60.84
Variance	29.41908	123.199
Observations	5	5
Pooled Variance	76.30902	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-1.09252	
P(T<=t) one-tail	0.153204	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.306407	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

Pb+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52.82	43.5
Mean	54.804	58.148
Variance	29.41908	5.19152
Observations	5	5
Pooled Variance	17.3053	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-1.271	
P(T<=t) one-tail	0.119719	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.239437	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cu-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	53.22	58.24
Mean	46.332	60.84
Variance	67.94857	123.199
Observations	5	5
Pooled Variance	95.57376	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.34643	
P(T<=t) one-tail	0.023471	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.046942	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomu alternativnu hipotezu postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cu-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	53.22	43.5
Mean	46.332	58.148
Variance	67.94857	5.19152
Observations	5	5
Pooled Variance	36.57004	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-3.08943	
P(T<=t) one-tail	0.007451	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.014903	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cu+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	58.24	43.5
Mean	60.84	58.148
Variance	123.199	5.19152
Observations	5	5
Pooled Variance	64.19524	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.531244	
P(T<=t) one-tail	0.304839	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.609679	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

Prilog 2

kontrola-Cd

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26	28.32
Mean	28.728	37.974
Variance	39.12192	183.9394
Observations	5	5
Pooled Variance	111.5307	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-1.38429	
P(T<=t) one-tail	0.101829	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.203657	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontrola-Cd+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26	84.5
Mean	28.728	54.35
Variance	39.12192	150.79
Observations	5	5
Pooled Variance	94.95596	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-4.1574	
P(T<=t) one-tail	0.001588	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.003177	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontola-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26	27.03
Mean	28.728	19.286
Variance	39.12192	66.94398
Observations	5	5
Pooled Variance	53.03295	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	2.050034	
P(T<=t) one-tail	0.037252	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.074504	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.1

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontrola-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26	22.07
Mean	28.728	20.516
Variance	39.12192	4.58353
Observations	5	5
Pooled Variance	21.85272	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	2.777577	
P(T<=t) one-tail	0.012007	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.024014	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontola-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26	28
Mean	28.728	24.788
Variance	39.12192	16.44872
Observations	5	5
Pooled Variance	27.78532	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	1.18184	
P(T<=t) one-tail	0.135603	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.271206	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontola-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26	22.7
Mean	28.728	21.61
Variance	39.12192	32.5122
Observations	5	5
Pooled Variance	35.81706	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	1.880542	
P(T<=t) one-tail	0.048412	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.096825	
t Critical two-tail	2.306004	

 $p \leq 0.1$

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomu alternativnu hipotezu postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontrola-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26	22.2
Mean	28.728	28.266
Variance	39.12192	14.49328
Observations	5	5
Pooled Variance	26.8076	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.141086	
P(T<=t) one-tail	0.445645	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.89129	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Cd+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	28.32	84.5
Mean	37.974	54.35
Variance	183.9394	150.79
Observations	5	5
Pooled Variance	167.3647	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.00146	
P(T<=t) one-tail	0.040167	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.080335	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.1

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu postoji statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	28.32	Pb
Mean	37.974	20.57667
Variance	183.9394	63.55011
Observations	5	6
Pooled Variance	117.0565	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	9	
t Stat	2.655518	
P(T<=t) one-tail	0.013119	
t Critical one-tail	1.833113	
P(T<=t) two-tail	0.026238	
t Critical two-tail	2.262157	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	28.32	22.07
Mean	37.974	20.516
Variance	183.9394	4.58353
Observations	5	5
Pooled Variance	94.26146	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	2.843135	
P(T<=t) one-tail	0.010854	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.021707	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	28.32	28
Mean	37.974	24.788
Variance	183.9394	16.44872
Observations	5	5
Pooled Variance	100.1941	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	2.08287	
P(T<=t) one-tail	0.035399	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.070799	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.1

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	28.32	22.7
Mean	37.974	21.61
Variance	183.9394	32.5122
Observations	5	5
Pooled Variance	108.2258	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	2.487105	
P(T<=t) one-tail	0.018846	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.037692	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	28.32	22.2
Mean	37.974	28.266
Variance	183.9394	14.49328
Observations	5	5
Pooled Variance	99.21633	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	1.54102	
P(T<=t) one-tail	0.08094	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.16188	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	84.5	27.03
Mean	54.35	19.286
Variance	150.79	66.94398
Observations	5	5
Pooled Variance	108.867	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	5.313533	
P(T<=t) one-tail	0.000358	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.000717	
t Critical two-tail	2.306004	

 $p \leq 0.01$

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomu alternativnu hipotezu postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	84.5	22.07
Mean	54.35	20.516
Variance	150.79	4.58353
Observations	5	5
Pooled Variance	77.68676	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	6.069457	
P(T<=t) one-tail	0.00015	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.000299	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	84.5	28
Mean	54.35	24.788
Variance	150.79	16.44872
Observations	5	5
Pooled Variance	83.61936	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	5.111524	
P(T<=t) one-tail	0.000458	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.000917	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	84.5	22.7
Mean	54.35	21.61
Variance	150.79	32.5122
Observations	5	5
Pooled Variance	91.6511	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	5.407292	
P(T<=t) one-tail	0.00032	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.00064	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	84.5	22.2
Mean	54.35	28.266
Variance	150.79	14.49328
Observations	5	5
Pooled Variance	82.64164	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	4.536749	
P(T<=t) one-tail	0.000954	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.001907	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	27.03	22.07
Mean	19.286	20.516
Variance	66.94398	4.58353
Observations	5	5
Pooled Variance	35.76375	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-0.3252	
P(T<=t) one-tail	0.376685	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.75337	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	27.03	28
Mean	19.286	24.788
Variance	66.94398	16.44872
Observations	5	5
Pooled Variance	41.69635	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-1.34723	
P(T<=t) one-tail	0.10741	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.214819	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	27.03	22.7
Mean	19.286	21.61
Variance	66.94398	32.5122
Observations	5	5
Pooled Variance	49.72809	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-0.52108	
P(T<=t) one-tail	0.308211	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.616423	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	27.03	22.2
Mean	19.286	28.266
Variance	66.94398	14.49328
Observations	5	5
Pooled Variance	40.71863	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.2251	
P(T<=t) one-tail	0.028364	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.056729	
t Critical two-tail	2.306004	

 $p \leq 0.1$

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomu alternativnu hipotezu postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb+L-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	22.07	28
Mean	20.516	24.788
Variance	4.58353	16.44872
Observations	5	5
Pooled Variance	10.51613	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.08292	
P(T<=t) one-tail	0.035396	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.070793	
t Critical two-tail	2.306004	

 $p \leq 0.1$

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb+L-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	22.07	22.7
Mean	20.516	21.61
Variance	4.58353	32.5122
Observations	5	5
Pooled Variance	18.54787	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-0.40164	
P(T<=t) one-tail	0.349231	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.698462	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

Pb+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	22.07	22.2
Mean	20.516	28.266
Variance	4.58353	14.49328
Observations	5	5
Pooled Variance	9.538405	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-3.96765	
P(T<=t) one-tail	0.002066	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.004132	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cu-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	28	22.7
Mean	24.788	21.61
Variance	16.44872	32.5122
Observations	5	5
Pooled Variance	24.48046	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	1.01558	
P(T<=t) one-tail	0.169778	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.339556	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

Cu-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	28	22.2
Mean	24.788	28.266
Variance	16.44872	14.49328
Observations	5	5
Pooled Variance	15.471	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-1.39811	
P(T<=t) one-tail	0.099813	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.199626	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cu+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	22.7	22.2
Mean	21.61	28.266
Variance	32.5122	14.49328
Observations	5	5
Pooled Variance	23.50274	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.17082	
P(T<=t) one-tail	0.03087	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.061739	
t Critical two-tail	2.306004	

 $p \leq 0.1$

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomu alternativnu hipotezu postoji statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Prilog 3

kontola-Cd

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>30.1</i>	<i>36.14</i>
Mean	40.22	27.902
Variance	42.112	30.68352
Observations	5	5
Pooled Variance	36.39776	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	3.228292	
P(T<=t) one-tail	0.006044	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.012088	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontrola-Cd+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>30.1</i>	<i>36.7</i>
Mean	40.22	49.04
Variance	42.112	32.403
Observations	5	5
Pooled Variance	37.2575	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.28471	
P(T<=t) one-tail	0.025845	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.05169	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.1

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontola-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	30.1	74.1
Mean	40.22	61.8
Variance	42.112	40.945
Observations	5	5
Pooled Variance	41.5285	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-5.29478	
P(T<=t) one-tail	0.000366	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.000733	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontrola-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	30.1	75.2
Mean	40.22	74.32
Variance	42.112	52.297
Observations	5	5
Pooled Variance	47.2045	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-7.84752	
P(T<=t) one-tail	2.51E-05	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	5.01E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontola-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	30.1	38.3
Mean	40.22	50.56
Variance	42.112	123.323
Observations	5	5
Pooled Variance	82.7175	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-1.79759	
P(T<=t) one-tail	0.054978	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.109956	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontola-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	30.1	41.7
Mean	40.22	47.12
Variance	42.112	12.812
Observations	5	5
Pooled Variance	27.462	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.08187	
P(T<=t) one-tail	0.035455	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.070909	
t Critical two-tail	2.306004	

 $p \leq 0.1$ odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hiptezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontrola-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	30.1	67.8
Mean	40.22	75.92
Variance	42.112	25.427
Observations	5	5
Pooled Variance	33.7695	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-9.7135	
P(T<=t) one-tail	5.27E-06	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	1.05E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Cd+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	36.14	36.7
Mean	27.902	49.04
Variance	30.68352	32.403
Observations	5	5
Pooled Variance	31.54326	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-5.95087	
P(T<=t) one-tail	0.000171	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.000342	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>36.14</i>	<i>74.1</i>
Mean	27.902	61.8
Variance	30.68352	40.945
Observations	5	5
Pooled Variance	35.81426	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-8.95604	
P(T<=t) one-tail	9.61E-06	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	1.92E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>36.14</i>	<i>75.2</i>
Mean	27.902	74.32
Variance	30.68352	52.297
Observations	5	5
Pooled Variance	41.49026	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-11.3942	
P(T<=t) one-tail	1.59E-06	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	3.18E-06	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	36.14	38.3
Mean	27.902	50.56
Variance	30.68352	123.323
Observations	5	5
Pooled Variance	77.00326	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-4.0826	
P(T<=t) one-tail	0.001761	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.003521	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	36.14	41.7
Mean	27.902	47.12
Variance	30.68352	12.812
Observations	5	5
Pooled Variance	21.74776	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-6.51585	
P(T<=t) one-tail	9.25E-05	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.000185	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	36.14	67.8
Mean	27.902	75.92
Variance	30.68352	25.427
Observations	5	5
Pooled Variance	28.05526	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-14.334	
P(T<=t) one-tail	2.74E-07	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	5.48E-07	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	36.7	74.1
Mean	49.04	61.8
Variance	32.403	40.945
Observations	5	5
Pooled Variance	36.674	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-3.33151	
P(T<=t) one-tail	0.005181	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.010361	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	36.7	75.2
Mean	49.04	74.32
Variance	32.403	52.297
Observations	5	5
Pooled Variance	42.35	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-6.14215	
P(T<=t) one-tail	0.000138	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.000276	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	36.7	38.3
Mean	49.04	50.56
Variance	32.403	123.323
Observations	5	5
Pooled Variance	77.863	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-0.27236	
P(T<=t) one-tail	0.39612	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.792241	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

Cd+L-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	36.7	41.7
Mean	49.04	47.12
Variance	32.403	12.812
Observations	5	5
Pooled Variance	22.6075	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.638477	
P(T<=t) one-tail	0.270503	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.541006	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomu nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	36.7	67.8
Mean	49.04	75.92
Variance	32.403	25.427
Observations	5	5
Pooled Variance	28.915	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-7.90383	
P(T<=t) one-tail	2.38E-05	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	4.76E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	74.1	75.2
Mean	61.8	74.32
Variance	40.945	52.297
Observations	5	5
Pooled Variance	46.621	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.89924	
P(T<=t) one-tail	0.009958	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.019915	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	74.1	38.3
Mean	61.8	50.56
Variance	40.945	123.323
Observations	5	5
Pooled Variance	82.134	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	1.960988	
P(T<=t) one-tail	0.042764	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.085527	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	74.1	41.7
Mean	61.8	47.12
Variance	40.945	12.812
Observations	5	5
Pooled Variance	26.8785	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	4.477067	
P(T<=t) one-tail	0.001032	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.002064	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	74.1	67.8
Mean	61.8	75.92
Variance	40.945	25.427
Observations	5	5
Pooled Variance	33.186	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-3.8755	
P(T<=t) one-tail	0.002352	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.004705	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb+L-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	75.2	38.3
Mean	74.32	50.56
Variance	52.297	123.323
Observations	5	5
Pooled Variance	87.81	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	4.009078	
P(T<=t) one-tail	0.00195	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.0039	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb+L-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	75.2	41.7
Mean	74.32	47.12
Variance	52.297	12.812
Observations	5	5
Pooled Variance	32.5545	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	7.537605	
P(T<=t) one-tail	3.34E-05	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	6.69E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	75.2	67.8
Mean	74.32	75.92
Variance	52.297	25.427
Observations	5	5
Pooled Variance	38.862	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-0.40581	
P(T<=t) one-tail	0.347758	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.695516	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatamo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cu-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	38.3	41.7
Mean	50.56	47.12
Variance	123.323	12.812
Observations	5	5
Pooled Variance	68.0675	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.659263	
P(T<=t) one-tail	0.264122	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.528244	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatamo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cu-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	38.3	67.8
Mean	50.56	75.92
Variance	123.323	25.427
Observations	5	5
Pooled Variance	74.375	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-4.64949	
P(T<=t) one-tail	0.000823	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.001646	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cu+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	41.7	67.8
Mean	47.12	75.92
Variance	12.812	25.427
Observations	5	5
Pooled Variance	19.1195	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-10.4142	
P(T<=t) one-tail	3.13E-06	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	6.26E-06	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Prilog 4

kontola-Cd

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26.8	49.3
Mean	17.48	58.02
Variance	11.017	86.572
Observations	5	5
Pooled Variance	48.7945	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-9.17631	
P(T<=t) one-tail	8.03E-06	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	1.61E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontrola-Cd+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26.8	14.1
Mean	17.48	18.92
Variance	11.017	42.152
Observations	5	5
Pooled Variance	26.5845	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-0.44159	
P(T<=t) one-tail	0.33524	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.670479	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

kontola-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26.8	37.2
Mean	17.48	41.92
Variance	11.017	35.217
Observations	5	5
Pooled Variance	23.117	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-8.03721	
P(T<=t) one-tail	2.11E-05	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	4.22E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontrola-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26.8	52
Mean	17.48	57.88
Variance	11.017	50.492
Observations	5	5
Pooled Variance	30.7545	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-11.5185	
P(T<=t) one-tail	1.46E-06	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	2.93E-06	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontola-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26.8	18.5
Mean	17.48	19.04
Variance	11.017	4.163
Observations	5	5
Pooled Variance	7.59	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-0.89531	
P(T<=t) one-tail	0.19838	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.396759	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontola-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26.8	42.1
Mean	17.48	38.44
Variance	11.017	85.748
Observations	5	5
Pooled Variance	48.3825	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-4.7645	
P(T<=t) one-tail	0.000709	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.001419	
t Critical two-tail	2.306004	

 $p \leq 0.01$

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

kontrola-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	26.8	31.8
Mean	17.48	25.58
Variance	11.017	5.882
Observations	5	5
Pooled Variance	8.4495	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-4.40595	
P(T<=t) one-tail	0.001134	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.002269	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
 postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Cd+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	49.3	14.1
Mean	58.02	18.92
Variance	86.572	42.152
Observations	5	5
Pooled Variance	64.362	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	7.706053	
P(T<=t) one-tail	2.86E-05	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	5.71E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
 postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	49.3	37.2
Mean	58.02	41.92
Variance	86.572	35.217
Observations	5	5
Pooled Variance	60.8945	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	3.262172	
P(T<=t) one-tail	0.005745	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.01149	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
 postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	49.3	52
Mean	58.02	57.88
Variance	86.572	50.492
Observations	5	5
Pooled Variance	68.532	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.026739	
P(T<=t) one-tail	0.489661	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.979323	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
 izmedju grupa

Cd-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	49.3	18.5
Mean	58.02	19.04
Variance	86.572	4.163
Observations	5	5
Pooled Variance	45.3675	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	9.150386	
P(T<=t) one-tail	8.2E-06	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	1.64E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	49.3	42.1
Mean	58.02	38.44
Variance	86.572	85.748
Observations	5	5
Pooled Variance	86.16	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	3.335261	
P(T<=t) one-tail	0.005152	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.010303	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	49.3	31.8
Mean	58.02	25.58
Variance	86.572	5.882
Observations	5	5
Pooled Variance	46.227	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	7.544023	
P(T<=t) one-tail	3.32E-05	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	6.65E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Pb

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	14.1	37.2
Mean	18.92	41.92
Variance	42.152	35.217
Observations	5	5
Pooled Variance	38.6845	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-5.84695	
P(T<=t) one-tail	0.000192	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.000384	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>14.1</i>	<i>52</i>
Mean	18.92	57.88
Variance	42.152	50.492
Observations	5	5
Pooled Variance	46.322	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-9.05097	
P(T<=t) one-tail	8.89E-06	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	1.78E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>14.1</i>	<i>18.5</i>
Mean	18.92	19.04
Variance	42.152	4.163
Observations	5	5
Pooled Variance	23.1575	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-0.03943	
P(T<=t) one-tail	0.484758	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.969515	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike
izmedju grupa

Cd+L-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>14.I</i>	<i>42.I</i>
Mean	18.92	38.44
Variance	42.152	85.748
Observations	5	5
Pooled Variance	63.95	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-3.85949	
P(T<=t) one-tail	0.002406	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.004812	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cd+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>14.I</i>	<i>31.8</i>
Mean	18.92	25.58
Variance	42.152	5.882
Observations	5	5
Pooled Variance	24.017	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-2.14874	
P(T<=t) one-tail	0.03195	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.0639	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.1

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Pb+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	37.2	52
Mean	41.92	57.88
Variance	35.217	50.492
Observations	5	5
Pooled Variance	42.8545	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-3.85483	
P(T<=t) one-tail	0.002422	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.004844	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	37.2	18.5
Mean	41.92	19.04
Variance	35.217	4.163
Observations	5	5
Pooled Variance	19.69	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	8.152732	
P(T<=t) one-tail	1.91E-05	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	3.81E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	37.2	42.1
Mean	41.92	38.44
Variance	35.217	85.748
Observations	5	5
Pooled Variance	60.4825	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	0.707513	
P(T<=t) one-tail	0.249668	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.499337	
t Critical two-tail	2.306004	

nema statisticku znacajnost

prihvatomo nultu hipotezu nema statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	37.2	31.8
Mean	41.92	25.58
Variance	35.217	5.882
Observations	5	5
Pooled Variance	20.5495	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	5.699299	
P(T<=t) one-tail	0.000227	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.000455	
t Critical two-tail	2.306004	

 $p \leq 0.01$

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb+L-Cu

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52	18.5
Mean	57.88	19.04
Variance	50.492	4.163
Observations	5	5
Pooled Variance	27.3275	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	11.7476	
P(T<=t) one-tail	1.26E-06	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	2.52E-06	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb+L-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52	42.1
Mean	57.88	38.44
Variance	50.492	85.748
Observations	5	5
Pooled Variance	68.12	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	3.724165	
P(T<=t) one-tail	0.002918	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.005836	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Pb+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	52	31.8
Mean	57.88	25.58
Variance	50.492	5.882
Observations	5	5
Pooled Variance	28.187	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	9.619403	
P(T<=t) one-tail	5.67E-06	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	1.13E-05	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cu-Cu+L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	18.5	42.1
Mean	19.04	38.44
Variance	4.163	85.748
Observations	5	5
Pooled Variance	44.9555	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-4.57489	
P(T<=t) one-tail	0.000907	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.001814	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cu-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>18.5</i>	<i>31.8</i>
Mean	19.04	25.58
Variance	4.163	5.882
Observations	5	5
Pooled Variance	5.0225	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-4.61411	
P(T<=t) one-tail	0.000862	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.001723	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.01

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

Cu+L-L

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>42.1</i>	<i>31.8</i>
Mean	38.44	25.58
Variance	85.748	5.882
Observations	5	5
Pooled Variance	45.815	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	3.00405	
P(T<=t) one-tail	0.008483	
t Critical one-tail	1.859548	
P(T<=t) two-tail	0.016967	
t Critical two-tail	2.306004	

p≤0.05

odbacujemo nultu hipotezu i prihvatomo alternativnu hipotezu
postoje statisticki znacajne razlike izmedju grupa

za $p \leq 0.01$ = sa 99% sigurnosti tvrdimo da ima statisticke znacajnosti
za $p \leq 0.05$ = sa 95% sigurnosti tvrdimo da ima statisticke znacajnosti
za $p \leq 0.1$ = sa 90% sigurnosti tvrdimo da ima statisticke znacajnosti

9. BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA

BIOGRAFIJA

Milena M Krsmanović rođena je 26.08.1981. godine u Zaječaru. Osnovnu školu i gimnaziju („Svetozar Marković“ prirodno-matematički smer) završila je u Nišu sa odličnim uspehom.

2000. godine upisala je Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, odsek hemija, smer diplomirani hemičar. Diplomirala je 18.07.2006. godine na katedri za Neorgansku hemiju na Prirodno-matematičkom fakultetu sa ocenom 10 (deset) i sa prosečnom ocenom u toku studija 8,16 (osam 16/100).

Februara 2007. godine upisala je doktorske akademske studije na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Položila je 8 ispita sa prosečnom ocenom 9,88 (devet, 88/100).

Od 16.01.2008 do 15.01.2009. godine radila je kao istraživač na Prirodno-matematičkom fakultetu.

Od 01.09.2009. radi u Prehrambeno-hemijskoj školi, u Nišu, kao profesor hemije (predmeti: Analitička hemija, Hemija, Organska hemija, Fizička hemija, Tehnike rada u laboratoriji).

BIBLIOGRAFIJA

Radovi štampani u časopisu M₂₃

1. Jasmina M. Jovanović, Ružica S. Nikolić, Gordana M. Kocić, Nenad S. Krstić, Milena M. Krsmanović, **Glutathione protects liver and kidney tissue from cadmium- and lead-provoked lipid peroxidation** Journal of Serbian Chemical Society, doi: 10.2298/JSC120214053J, (2012). (M₂₃=3); (IF=0,786)
2. Veljkovic Andrej R., Nikolic Ruzica S., Kocic Gordana M., Pavlovic Dusica D., Cvetkovic Tatjana P., Sokolovic Dusan T., Jevtovic Tatjana M., Basic Jelena T., Laketic Darko M., Marinkovic Milena R., Stojanovic Svetlana R., Djordjevic Branka S., Krsmanovic Milena M., **Protective Effects of Glutathione and Lipoic Acid against Cadmium-Induced Oxidative Stress in Rat's Kidney**, RENAL FAILURE, (2012), vol. 34 br. 10, str. 1281-1287.
3. P. I. Premovic, M. M. Krsmanovic, B. Ž. Todorovic, M. S. Pavlovic, N. D. Nikolic and D. M. Djordjevic, **Geochemistry of the Cretaceous-Tertiary boundary (Fish Clay) at Stevns Klint (Denmark): Ir, Ni, and Zn in kerogen**, J. Serb. Chem. Soc. 71(7) (2006). (M₂₃=3); (IF=0,423)

Rad saopšten na međunarodnom naučnom skupu štampan u celini (M₃₃):

1. M. M. Krsmanović, B. Z. Veličkovic, N. N. Mišković and P. I. Premović, **Ni and Co in the smectite fraction of the Cretaceous-Tertiary (KT) boundary Fish Clay near Rødvig (Stevns Klint, Denmark)**, 8th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry 2006, Proceedings, p.748, Belgrade (Serbia), 2006.

Radovi saopšteni na međunarodnom skupu štampan u izvodu (M₃₄):

1. J. Jovanović, R. Nikolić, N. Krstić, M. Krsmanović, G. Kocić, and G. Sredojević-Dugalić, **Spectrophotometric monitoring of toxic effect of copper over the Dnase and xanthine oxidase activity**, The 31-st European Congress on Molecular Spectroscopy, Babes-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania, 2012.
2. Milena M. Krsmanović, Maja N. Stanković, Bratislav Ž. Todorović, Nikola D. Nikolić, Pavle I. Premović, **Ni in the Cretaceous-Tertiary boundary (Fish Clay) at Stevns Klint (Denmark): the Rødvig succession**, The 13th International Clay Conference Claysohere: past, present and future and 49th Annual Meeting of the Clay Science Society of Japan, Abstract Book, p.90, Tokyo (Japan), 2005.
3. Maja N. Stanković, Milena M. Krsmanović, Bratislav Ž. Todorović, Nikola D. Nikolić, Pavle I. Premović, **Preliminary geochemical study og the cheto-smectite (SAz) from Apache Countri (Arizona, USA)**, The 13th International Clay Conference Claysohere: past, present and future and 49th Annual Meeting of the Clay Science Society of Japan, Abstract Book, p.65, Tokyo (Japan), 2005.

Rad saopšten na nacionalnom naučnom skupu štampan u izvodu (M₆₄):

1. Nenad S. Krstic, Ruzica S. Nikolić, Jasmina M. Jovanović, Milena M. Krsmanović, Gordana M. Kocić, **Monitoring the effects of chronic copper intoxication by malondialdehyde content**, Jubilarno 50. savetovanje Srpskog hemijskog društva, ID 7199162, Oznaka rada: BH P12. Beograd, 2012.