

UNIVERZITET U NIŠU  
PRIRODNO–MATEMATIČKI FAKULTET  
Departman za hemiju

**Praćenje efekata hronične intoksikacije teškim metalima  
(Cd, Pb, Cu) i protektivne uloge suplemenata S-donor liganada  
preko aktivnosti endonukleaza i sekundarnog produkta  
lipidne peroksidacije**

-Doktorska disertacija-

*Jasmina Jovanović, doktor medicine*

Niš, 2012.god.



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ**

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

Извод, ИЗ:

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

У овој монографији извршено је *ин витро* испитивање ефеката токсичних метала (Цд, Пб и Цу) као и протективна улога суплемената –С донор лиганада, α-липонске киселине и глутатиона, на активност алкалне и киселе ДНазе. Такође је анализиран и ефекат акутне и хроничне интоксикацији овим тешким металима и протективно дејство суплемената на вредности хематолошких параметара, активност алкалне и киселе ДНазе, концентрацију секундарног продукта липидне пероксидације (малондиалдехида) као и концентрација метала (Цд и Пб) у јетри и бубрезима. Студија је изведена на експерименталним животињама (Вистар пацови).

Тешки метали значајно утичу на вредности стандардних хематолошких параметра крви (еритроците, хемоглобин и хематокрит). Резултати ове студије су показали да Цд, Пб и Цу значајно повећавају активност ДНазе (I и II) и концентрацију малондиалдехида у испитиваним органима. ЛА и ГСХ использвају протективно дејство и скоро потпуно елиминишу токсично деловање метала на активност ендонуклеаза и смањују процес липидне пероксидације.

Датум прихватања теме, ДП:

14.09.2011. – Наставно-научно Веће факултета  
19.09.2011. – Научно-стручно Веће Универзитета

Датум одбране, ДО:

}

Чланови комисије, КО: Председник:

Члан:

Члан:

Члан:

Члан, ментор:

**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ**

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

Abstract, **AB:**

Ways of exposure to the influence of toxic metals, Cadmium (Cd), Lead (Pb) and Copper (Cu) are very varied, from drinking water, through the food chain to the air.

In this monograph, an *in vitro* research has been performed on the effects of toxic metals Cd, Pb and Cu as well as the protective role of supplements - S donor ligand,  $\alpha$ -lipoic acid and glutathione, on the activity of alkaline and acid DNase. The effect of acute and chronic intoxication with those heavy metals and the protective influence of supplements on the value of hematologic parameters, the activity of alkaline and acid DNase, the concentration of secondary product of lipid peroxidation (malondialdehyde), as well as the concentration of metal (Cd and Pb) in the liver and kidneys, has also been analyzed. The study was conducted on laboratory animals (Wistar rats).

Heavy metals have a significant influence on the standard hematologic blood parameters (erythrocytes, hemoglobin and hematocrit). Results of this study showed that Cd, Pb and Cu significantly increase the activity of DNase (I and II) and the concentration of malondialdehyde in examined organs. LA and GSH exhibit protective effect and almost totally eliminate the toxic influence of metals on the endonuclease activity and

Accepted by the Scientific Board on, **ASB:**

14.09.2011. – Faculty Academic Board

19.09.2011. – University Academic Board

Defended on, **DE:**

Defended Board, **DB:** President:

Member:

Member:

Member:

Member, Mentor:

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije rađen je u vivarijumu i laboratoriji za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu, biohemijskoj laboratoriji Kliničkog centra u Nišu i laboratoriji za neorgansku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Ovom prilikom zahvaljujem se Svetlani Stojanović, diplomiranom hemičaru, kao i osoblju laboratorija navedenih institucija na pruženoj pomoći i saradnji. Takođe se zahvaljujem i zaposlenima u Vivarijumu Medicinskog fakulteta u Nišu na pruženoj pomoći i razumevanju.*

*Najsrdačnije se zahvaljujem mentoru, dr Ružici Nikolić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, na izuzetnoj pomoći i korisnim sugestijama pri izradi doktorske disertacije.*

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

*Veliku zahvalnost dugujem dr Goranu Nikoliću, vanredovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Nišu, na korisnim sugestijama koje mi je dao tokom izrade disertacije.*

*Takođe se zahvaljujem dr Danijeli Kostić, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, i dr Sandri Konstantinović, docentu Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, na stručnoj pomoći u toku doktorskih studija.*



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	13
<b>2. TEORIJSKI DEO .....</b>	19
<b>2.1. Toksičnost teških metala u životnoj i radnoj sredini.....</b>	21
2.1.1. Definicija, rasprostranjenost i resorpcija teških metala .....	21
2.1.2. Efekti izloženosti kadmijumu u životnoj i radnoj sredini .....	22
2.1.3. Efekti izloženosti olovu u životnoj i radnoj sredini .....	26
2.1.4. Efekti izloženosti bakru u životnoj i radnoj sredini .....	29
<b>2.2. Slobodni radikali, oksidativni stres i oksidativna modifikacija biomolekula.....</b>	34
2.2.1. Slobodni radikali i mehanizam oksidativnog stresa .....	34
2.2.2. Oksidativna modifikacija DNK.....	36
2.2.3. Oksidativna modifikacija proteina.....	39
2.2.4. Lipidna peroksidacija.....	40
<b>2.3. Antioksidansi u procesu oksidativne modifikacije biomolekula.....</b>	45
2.3.1. Antioksidansi u biološkim sistemima .....	45
2.3.2. Bioligandi .....	46
2.3.3. Glutation u biološkim sistemima.....	48
2.3.4. Liponska kiselina u biološkim sistemima.....	51
<b>2.4. Hematološki parametri .....</b>	54
2.4.1. Eritrocit .....	54
2.4.1.1. Hemoglobin .....	56
2.4.2. Leukociti .....	57
2.4.2.1. Neutrofilni granulociti.....	59

2.4.2.2. Eozinofilni granulocit.....	59
2.4.2.3. Bazofilni granulociti.....	59
2.4.2.4. Monociti.....	60
2.4.2.5. Limfociti.....	60
2.4.3. Trombociti .....	60
2.5. Endonukleaze.....	62
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO.....</b>	<b>67</b>
3.1. Program i metodika eksperimentalnog rada.....	69
3.2. Eksperimentalni postupak .....	71
3.2.1. In vitro ispitivanje .....	71
3.2.2. In vivo ispitivanja .....	73
3.2.3. Intoksikacija teškim metalima i dodatak suplemenata.....	73
3.3. Tehnike i metode primenjene u procesu praćenja efekata intoksikacije teškim metalima.....	76
3.3.1. Određivanje hematoloških parametara .....	76
3.3.2. Praćenje enzimske aktivnosti i određivanje vrednosti proteina .....	76
3.3.3. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u homogenatima tkiva.....	81
3.3.4. Određivanje koncentracija metala u homogenatima tkiva bubrega, mozga, jetre i pankreasa.....	81
3.4. Statistička analiza.....	81
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>85</b>
4.1. Rezultati aktivnosti alkalne i kisele DNaze u <i>in vitro</i> uslovima....	87
4.2. Rezultati merenja uticaja teških metala i suplemenata na hematološke parametre.....	91
4.3. Rezultati merenja aktivnosti alkalne i kisele DNaze.....	106
4.3.1.Poređenje rezultata merenja aktivnosti endonukleaza (DNaza I i II) pojedinih organa u uslovima intoksikacije Cd, Pb i Cu .....	116
4.3.2. Merenje vrednosti proteina u ispitivanim organima .....	123
4.4. Dejstvo metala i suplemenata na koncentraciju malondialdehida (MDA) u pojedinim organizm.....	126

4.5. Sadržaj teških metala u ispitivanim organima.....	136
<b>5. ZAKLJUČAK:.....</b>	<b>139</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>145</b>



# **1. UVOD**



Teški metali kao polutanti u radnoj i životnoj sredini su ozbiljan zdravstveni i ekološki problem. Putevi unosa kadmijuma i olova 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. Olovo cirkuliše, najvećim delom, vezano za eritrocite, zatim za albumine plazme, a daleko manje vezano za niskomolekularne proteine i u jonskom obliku. Iz organizma se izlučuje preko urina, manje preko digestivnog trakta, a delom preko noktiju i kose.

Sistematsko izlaganje uticaju Cd dovodi do povećane ekskrecije Ca i oštećenja kostiju, kao i do promene aktivnosti brojnih enzima. Resorbovani kadmijum se transportuje putem krvi vezan za proteine, metalotionein i eritrocite. Deponuje se pretežno u bubrežima, jetri i pankreasu. Ekskrecija kadmijuma je spora. Koncentracija kadmijuma u krvi služi kao pouzdan pokazatelj skorom izlaganju kadmijumu, dok urinarna koncentracija pokazuje ranije izloženosti.

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. Ovaj metal ima važnu ulogu u procesu eritropoeze, mineralizaciji kostiju, katalizi biosinteze hemoglobina, kofaktor je i neophodan element za katalitičku aktivnost brojnih enzima. Te raznovrsne funkcije u organizmu vezane su za njegovu polivalentnost i sposobnost da gradi stabilne kompleksne fragmente preko O-, N- ili S- donor atoma biolaganada delova biomolekula (proteina, enzima, nukleinskih kiselina, blokira -SH reaktivne centre nekih enzima). Jon  $Cu^+$  koji nastaje redukcijom  $Cu^{2+}$  jona, u prisustvu superoksidnog anjona i smanjene količine askorbinske kiseline i glutationa, katalizuje nastajanje hidroksil radikala ( $OH^\bullet$ ) koji lako stupa u dalje reakcije i izaziva oksidativna oštećenja u ćeliji. Višak bakra u ishrani pacova povećava oksidativno oštećenje membrana lipida i DNK u jetri i bubrežima.

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.

$\alpha$ -Liponska kiselina ( $\alpha$ -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 obliku su mesta na koja se lako već u teški metali. Poznato je njeno antioksidativno dejstvo iz literaturnih podataka. Moćan je prirodni antioksidans, čiji antioksidativni efekti sve više predstavljaju predmet niza kliničkih studija terapije dijabetesne mikro i makroangiopatije. Noviji literaturni podaci ukazuju na potencijalni preventivni efekat u progresiji Alchajmerove bolesti, ateroskleroze, hipertenzije i koronarne bolesti, trovanja teškim metalima.  $\alpha$ -LA kao lipo- i hidrosolubilno jedinjenje lako prolazi kroz membrane u citoplazmu i učestvuje u zaštiti od slobodnih reaktivnih radikala, regulaciji genske ekspresije i dr. O protektivnom dejstvu  $\alpha$ -liponske kiseline u uslovima trovanja teškim metalima (Cd, Pb i Cu) nema adekvatnih literaturnih podataka.

Glutation (GSH) je tripeptid L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicin koji čini 90% ukupnih neproteinskih sulfidnih jedinjenja ćelije i esencijalni je kofaktor nekih enzima. 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:  $Cd^{2+} > Pb^{2+} > Cu^+/Cu^{2+}$ .

Endonukleaze jetre, kisela i alkalna DNaza, su hidrolaze koje razlažu, kako nativne, tako i denaturisane molekule DNK. Osnovna uloga DNaza se ogleda u regulaciji sinteze i razgradnje endogenih i egzogenih DNK, u reparaciji modifikovanih DNK i uklanjanju cirkulišućih DNK iz organizma. Prema literaturnim podacima DNaze se smatraju glavnim egzekutorima apoptoze, odgovornim za internukleozomalnu fragmentaciju DNK ćelije u apoptozi. Internukleozomalna DNK fragmentacija, kao biohemski marker apoptoze, je razlaganje hromozomske DNK na fragmente veličine oligonukleozoma.

U ovoj disertaciji ispitivana je protektivna uloga suplemenata,  **$\alpha$ -liponske kiseline i glutationa**, S-donor liganada, u uslovima akutne i hronične intoksikacije subletalnim dozama teškim metalima kadmijumom, olovom i bakrom. Ista je praćena preko:

- vrednosti hematoloških parametara,
- alkalne i kisele DNaze iz različitih unutrašnjih organa (jetre, bubrega, pankreasa i mozga) i

- sekundarnog produkta lipidne peroksidacije (malondialdehida).

Model sistem za ispitivanje uticaja izloženosti bakru, olovu i kadmijumu je studija na belim pacovima Wistar soja, ţenskog pola, starosti 6 nedelja, težine  $230\pm30$  g. Eksperimentalne ţivotinje su gajene u laboratorijskim uslovima na normalnom rešimu ishrane u vivarijumu Medicinskog fakulteta u Nišu, u skladu sa pravilima Lokalnog etičkog komiteta.

Rad na doktorskoj disertaciji obuhvatio je sledeće faze:

- gajenje eksperimentalnih ţivotinja i njihova akutna ili hronična intoksikacija u određenim vremenskim intervalima u periodu od 3 nedelje,
- merenja standardnih hematoloških parametara po proceduri koja se oficijalno primenjuje u biohemijskim laboratorijama,
- 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 kisele DNaze po metodi Bartholeyns i sar., a stvoreni "kiseli-solubilni nukleotidi" mereni su spektrofotometrijski,
- meranje aktivnosti alkalne DNaze po metodi Bartholeyns i sar., a stvoreni "kiseli-solubilni nukleotidi" takođesu mereni spektrofotometrijski,
- merenje sadržaja proteina u tkivima unutrašnjih organa po metodi Lowrey-a i sar., spektrofotometrijski,
- merenje sadržaja toksičnih metala u homogenatima tkiva metodom potenciometrijske striping analize (PSA),
- praćenje lipidne peroksidacije u uslovima hronične intoksikacije teškim metalima merenjem vrednosti malondialdehida (MDA-sekundarnog produkta lipidne peroksidacije) spektrofotometrijskom metodom po Andreevoj i sar., koja je bazirana na reakciji MDA sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i
- "in vitro" ispitivanja intoksikacije teškim metalima (Pb, Cd i Cu) sa komercijalnim preparatima (enzimi alkalna i kisela DNaza tj. DNaza I i II).

Rezultati istraživanja predložene disertacije omogućavaju da se detaljnije sagledaju toksični efekti intoksikacije teškim metalima (Pb, Cd i Cu) preko aktivnosti enzima endonukleaza, koji se smatraju ključnim egzekutorima apoptoze ćelije, i protektivna uloga suplemenata S-donor liganda (mekih Lewiss-ovih baza) koje stupaju u interakcije sa ionima metala, mekih Lewiss-ovih kiselina.



## **2. TEORIJSKI DEO**



## **2.1. Toksičnost teških metala u životnoj i radnoj sredini**

### **2.1.1. Definicija, rasprostranjenost i resorpcija teških metala**

Metali koji imaju zapreminsку masu veću od 5 g po cm<sup>-3</sup> svrstavaju se u grupu teških metala. Teški metali (olovo, kadmijum i bakar) su široko rasprostranjeni u životnoj sredini (Walker i sar., 1995). Njihova zastupljenost kao polutanata u radnoj i životnoj sredini predstavlja ozbiljan zdravstveni i ekološki problem zato što su toksični, nisu biorazgradivi, imaju veoma dugo poluvreme života u zemljištu (Ram i sar., 2000) i akumuliraju se u živoj sistemu kroz aktivni lanac ishrane (Merian, 1991).

Teški metali se prirodno nalaze u zemljištu, u određenim koncentracijama. U površinskim horizontima zemljišta često se mogu naći teški metali koji nisu geohemijskog već antropogenog porekla, odnosno, dospeli su u zemljište kao posledica različitih ljudskih aktivnosti (industrija, sagorevanje fosilnih goriva, primena agrohemikalija, atmosferska depozicija i drugo), što kao posledicu može imati trajnu kontaminaciju zemljišta i podzemnih voda. U vodi mogu graditi teško rastvorljive karbonate, sulfate i sulfide koji se talože na dnu vodenih površina, gde dolazi do njihove akumulacije.

Životinje i ljudi dolaze u kontakt sa teškim metalima preko hrane, vode i 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).

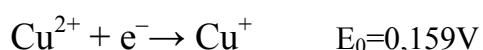
Resorpcija preko kože se odvija prelaskom teškog metala iz vazduha na kožu i prolaskom kroz epidermis ili kroz folikule korena dlake ili kanale lojnih žlezda.

Uglavnom se teški metali deponuju u ciljnog organu, 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.

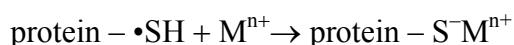
U teške metale od značaja za proksidativni efekat se ubrajaju: kadmijum (Cd), olovo (Pb), živa (Hg), arsen (As), hrom (Cr), nikal (Ni), al i biometali, kao što su bakar (Cu), gvožđe (Fe), zink (Zn), mangan (Mn), kobalt (Co) i selen (Se). Toksično dejstvo teških

metala je u tome što stimulišu formiranje slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih derivata 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).

U *in vivo* uslovima toksičnost mnogih teških metala ogleda se u njihovoj sposobnosti da produkuju slobodne radikale i učestvuju u elektron transfer procesima jer mogu postojati u više oksidaciona stanja (bakar na primer).



Njihova toksičnost potiče i otuda što reaguju sa sulfhidrilnim grupama, čime menjaju aktivnost mnogih enzima, ali i glutationa čija je aktivnost esencijalno vezana za iste (Rowley i sar., 1982; Larsson, 1983; Hoffman, 1983).



Nakon akutne i hronične intoksikacije, teški metali mogu da utiču na razvoj i sveukupno zdravlje izazivajući depresiju, teškoće u učenju, neurološke poremećaje, kardiovaskularne bolesti, bolesti jetre, bubrega, anemije i dr.

Terapija za uklanjanje teških metala iz organizma ljudi je tzv. helaciona terapija koja se bazira na koordinacionoj sposobnosti jona metala sa jedne strane i posedovanja donor atoma bioliganda ( $-\text{O}$ ,  $-\text{N}$ ,  $-\text{S}$ ) 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,  $\alpha$ -liponska kiselina, glutation i drugi biomolekuli koji kao antioksidansi vezuju teške metale i time povećavaju zaštitu od oksidativnog stresa.

### **2.1.2. Efekti izloženosti kadmijumu u životnoj i radnoj sredini**

Kadmijum je široko rasprostranjen metal u prirodi izražene mobilnosti i toksični industrijski polutant. Označen je kao jedan od 126 najvećih zagađivača životne sredine od strane Agencije za zaštitu životne sredine USA. 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).

Prema geohemijskoj klasifikaciji hemijskih elemenata kadmijum je 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 istaloći), 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.

Vulkanska aktivnost je jedan od razloga za povremeni porast koncentracije kadmijuma u životnoj sredini, pre svega u vazduhu. Stalni izvori kontaminacije kadmijumom su vezani za njegovu primenu u industriji, kao antikorozivnog reagensa, stabilizatora u PVC proizvodima i proizvodnji pneumatika, pigmenta boja i u proizvodnji Ni-Cd baterija. Fosforna Šubriva takođe pokazuju relativno visok sadržaj kadmijuma, i njihovo korišćenje doprinosi povećanom unosu ovog metala u zemljište. Iako se neki produkti koji sadrže kadmijum mogu reciklirati, veliki deo zagađenja ovim metalom je rezultat neadekvatnog odlaganja i nekontrolisanog spaljivanja otpada koji sadrži kadmijum (Jarup, 2003). Ugrožene grupe nisu samo radnici zaposleni u fabrikama već i stanovništvo u krugu od 2 kilometra za koje se smatra da je visoko izloženo, dok se udaljenost od 2 do 10 kilometara smatra područjem srednje visoke ekspozicije (Stoepler, 1991).

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 µg/dm<sup>3</sup>. Poređenja radi, kod nepušača je prosečna koncentracija kadmijuma u krvi od 0,5 µg/dm<sup>3</sup> (Godt i sar., 2006).

Preko industrijskog otpada kadmijum ulazi u sastav površinskih voda. 90% kadmijuma u biljkama dospeva iz zemljišta, a 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 µg/dan, dok putem vode oko 1 µg/dan. Najveća količina kadmijuma se unosi putem kontaminirane hrane (pirinač, iznutrice, gljive). Koncentracija kadmijuma u vodi za piće treba da bude manja od 1 µg/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.

Visok nivo izloženosti ovom teškom metalu dovodi do akutnih i hroničnih oštećenja raznih tkiva i organa što je posledica zagađenja životne sredine ljudskom aktivnošću (Sarkar i sar., 1995). 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 (oksida, hlorida, sulfida, 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). Ekskrecija kadmijuma iz organizma je spora, a odvija se preko bubrega i bilijarnim putem, mlekom i pljuvačkom (Popović i sar., 1993). 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 ( $-\text{SH}$ ) 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).

Prema fizičko-hemijskim osobinama kadmijum ima poseban afinitet za vezivanje sa sumporom, pa lako mogu da inhibiraju fiziološku aktivnost enzima sa aktivnim  $-SH$  grupama. 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 izrađenog afiniteta prema biološkim strukturama koje sadrže SH grupe (Jacobson i sar., 1980; Timbrell i sar., 2000). Neki od važnih enzima na čiju aktivnost utiče kadmijum, jesu enzimi koji učestvuju u metabolisanju ksenobiotika (Zhang i sar., 1998).

Joni kadmijuma vezujući se u ćelijama mitohondrija deluju na tri mesta: vezuju se za  $-SH$  grupu enzima koji obavljaju transport elektrona, inhibiraju enzim koji učestvuje u sintezi ATP-a, inhibiraju ATP-azu koja oslobađa energiju potrebnu za aktivni transport vitalnih supstanci u ćeliji. Od izuzetne važnosti u transportu i distribuciji kadmijuma u organizmu ima protein, metalotionein, koji ima veliki kapacitet za kadmijum (Klassen, 1987). Kadmijum vezan za metalotionein akumulira se u jetri, bubrežima, pljuvačnim tlezdama, pankreasu, a u manjim količinama se može naći i u drugim tkivima, posebno tlezdanim (tireoidei i nadbubređu) tlezdi). Posle 24 sata koncentracija kadmijuma u većini tkiva ostaje konstantna, sem bubrega u kojima se postepeno uvećava.

Iako kadmijum nije redoks-aktivran metal i ne može direktno učestvovati u Fentonovoj reakciji i stvaranju reaktivnih vrsta kiseonika (RVK), indirektnim mehanizmima dovodi do oksidativnog stresa i sledstvenog oštećenja struktura organizma (Videla i sar., 2003). Novijim ispitivanjima je pokazano da je kadmijum uzročnik oksidativnih oštećenja DNK, proteina i lipida, što je verovatno uticaj Cd na enzimske i neenzimske komponente antioksidativnog sistema odbrane organizama. Takođe postoje dokazi da kadmijum povećava nivo lipidne peroksidacije (Müller, 1986).

*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-acetyl-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).

### **2.1.3. Efekti izloženosti olovu u životnoj i radnoj sredini**

U prirodi se olovo pretežno nalazi u obliku sulfida, karbonata i minerala galenita ( $PbS$ ), 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.

Izvori kontaminacije olovom su produkti sagorevanja u metalurgiji i hemijskoj industriji, saobraćaj, industrijske otpadne vode i deponije. Profesionalno, najviše su izloženi olovu radnici u topionicama i livnicama ovog metala, industriji boja, keramičkoj i industriji proizvodnje i obrade stakla, u industriji baterija i akumulatora, fabrikama oružja i municije. Iz atmosfere, zemljišta, voda (površinskih i podzemnih), oovo se unosi i zadržava u biljkama, a dalje preko lanca ishrane i vode za piće dospeva i u ljudski organizam. Putevi unosa olova su vrlo različiti. Osim preko hrane i vode za piće, oovo se može uneti i preko vazduha zagađenog produktima sagorevanja fosilnih goriva, do ambalaže za hranu koja je u nekoj fazi izrade bila u kontaktu sa ovim metalom (Goyer i sar., 1995).

Svake godine industrija proizvodi oko 2,5 miliona tona olova u celom svetu. Zbog svoje prisutnosti u okruženju trovanje olovom i dalje ostaje značajan zdravstveni problem u svetu. Naročito 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).

Na globalnom nivou, do skora, najveći deo zagađenja atmosfere olovom je poticao od sagorevanja goriva u motornim vozilima, gde je oovo prisutno kao alkil-olovo, aditiv goriva. Pored ovog izvora oovo potiče i od miniranja u rudnicima, zatim recikliranja baterija i drugih materijala koji sadrže oovo. Maksimalno dozvoljena koncentracija za oovo (dim i prašina) je  $0,15 \text{ mg/m}^3$ .

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 igrackama obojenim tim bojama (Glotzer, 1994).

Oovo iz voda za piće se verovatno više apsorbuje nego oovo iz hrane, prema nekim studijama odrasli apsorbuju 35% do 50% unetog metala, a procenat apsorpcije za decu može biti veći od 50%. Na apsorpciju olova utiče pored uzrasta i opšte fiziološko stanje organizma (Flora i sar., 2006).

Oovo se najčešće unosi prljavim rukama, pri jelu i pušenju, iako je udisanje olovne prašine, dima i para opasnije. Unošenje olova preko kože je moguće samo kod tetraetil olova, koji se dodaje kao antidentalator benzinu (etilizirani benzin). Mnogo važniji put apsorpcije olova je preko respiratornog trakta. Uneto oovo 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 sluzokotile digestivnog trakta, preko tucu, kose, noktiju, znoja i mleka. Koncentracija olova u krvi od 60 µg/dL je tokom šezdesetih godina smatrana bezopasnom. Vremenom, proučavanjem toksičnih efekata olova, prihvativ sadržaj u krvi je smanjen na 25 µg/dL pa zatim i na 10 µg/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/dm<sup>3</sup>. Porast nivoa ovog metala u krvi je dalje umereno rizičan (250-490 µg/dm<sup>3</sup>), visokorizičan (500-690 µg/dm<sup>3</sup>) i urgentan, sa više od 700 µg/dm<sup>3</sup> 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 (gvođu, kalcijumu, bakru i cinku) za njihove brojne funkcije u organizmu, posebno one vezane za prisustvo slobodnih -SH grupe u delovima biomolekula proteina i enzima. Prema fizičko-hemijskim osobinama Pb<sup>2+</sup>-jon može lako da zameni Ca<sup>2+</sup>-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).

Unošenje nekih namirnica bogatih vitaminom C i gvođem, može dovesti do povećane mobilnosti ovog metala iz tkiva i povećanja nivoa  $Pb^{2+}$ -jona u krvi. Nivo olova u krvi je pogodan i direktni pokazatelj njegove toksičnosti. Oko 99 % olova u krvi se vezuje za eritrocite jer ove krvne ćelije imaju veliki afinitet da se vežu za teške metale, naročito za olovu, tako da su eritrociti osjetljiviji na okidativna oštećenja i lipidnu peroksidaciju (Sivaprasad i sar., 2003), koja se dešava na membrani eritrocita, za razliku od drugih ćelija i tkiva. Izloženost olovu dovodi do značajnog opadanja broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i vrednosti hematokrita (Terayama, 1993). Literaturni podaci ukazuju da je kod izloženosti zečeva olovu značajno smanjen broj crvenih krvnih zrnaca, koncentracija hemoglobina i vrednosti hematokrita (Bersenyi i sar., 2003). Oovo inhibira i pojedine faze u sintezi hema (Goyer, 1997). Kod pacova intoksikacija olovom dovodi do zaustavljanja biosinteze hema zbog inhibitornog delovanja olova na enzime koji učestvuju u sintezi hema o čemu svedoče smanjene vrednosti krvnog proteina (hemoglobina) (El-Missiry, 2000).

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 gvođa 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  $Ca^{2+}$ -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; Ercal i sar., 1996). Na molekularnom nivou dejstvo olova se ogleda u povećanoj produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta (Gurer i sar., 2000) i stimulaciji lipidne peroksidacije (Patrick, 2006).

Simptomi akutnog trovanja olovom su bolovi u abdomenu, mučnina, gubitak apetita, zamor, nedostatak koncentracije, nesanica, halucinacije, vrtoglavica, glavobolja, promene raspoloženja, artritis. Smrt kod akutnog trovanja ljudi može nastupiti pri unosu 25 do 30 g rastvorljivih soli olova. Hronična izloženost ovom teškom metalu dovodi do mentalne retardacije, psihoze, hiperaktivnosti, gubitak težine i mišićne slabosti i paralize. Povećano prisustvo ovog metala pripisuje se, u nekim slučajevima, i pojavi hipertenzije, srčane aritmije, malignim promenama u digestivnom traktu, plućima, bubrežima (Counis, 1998).

Neurotropno delovanje olova se ispoljava i na centralni nervni sistem, što je poznato kao olovna encefalopatija ili olovna neuropatija. Dugotrajna ekspozicija olova dovodi i do reverzibilnih nefrotoksičnih efekata kao što je hronična bubrežna insuficijencija koja kasnije može dovesti i do gihta.

Mnoge *in vivo* i *in vitro* studije pokazuju da nakon tretmana olovom dolazi do povećanja malondialdehida (MDA). Oovo može direktno da se vezuje za ćelijske membrane čime se povećava osjetljivost membrane lipidne peroksidacije. Takođe može da naruši biološku funkciju antioksidativnog sistema jer dovodi do pojačanog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta koje se akumuliraju u jetri i bubrežima (Sandhir i sar., 1994).

Terapija kod trovanja olovom je davanje helatirajućih agenasa koji „blokiraju“ 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-sirčetne kiseline (EDTA).

#### **2.1.4. Efekti izloženosti bakru u životnoj i radnoj sredini**

Bakar se u prirodi pretežno javlja u obliku oksidnih, karbonatnih i sulfidnih ruda. Zastupljen je u zemljinoj kori u obliku minerala: halkopirita, halkozina, kovelina i drugih. Bakar se prvenstveno koristi kao legura metala (mesing, bronza). Upotreba bakra zasniva se na njegovoj izvanrednoj električnoj i toplotnoj provodljivosti, otpornosti prema koroziji i dobrim mehaničkim osobinama. Zbog malih rezervi i velike primene bakar predstavlja materjal od strateškog značaja. Jedinjenja bakra se koriste kao baktericidi, insekticidi, algicidi i fungicidi, dok se u industriji bakar(II)-sulfat primenjuje kao aktivator u peni pri flotaciji sulfidnih ruda, u proizvodnji azo boja, pri rafinisanju petroleum-a, kao i galvanoplastici (Filipović, 1998). Bakar se koristi za izgradnju dentalno-protetičkih materjala, kao i nekih proizvoda u kozmetici (Lucas i sar., 1992).

Čestice bakra se u atmosferu oslobođaju u vidu praštine preko vulkanskih erupcija, antropogenih izvora (pesticida, herbicida i fungicida) ili iz topionica bakra i objekata za preradu rude. Zbog povećane ljudske aktivnosti povećana je količina bakra u vazduhu, zemljištu i vodi. Srednja koncentracija bakra u vazduhu npr. u SAD kreće se od 5–20 ng/m<sup>3</sup> (Barceloux, 1999), u zemljištu od 5–70 mg/kg, a unos bakra iz hrane je 1,0–1,3 mg/dnevno za odrasle (0,014–0,019 mg/kg/dan). 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

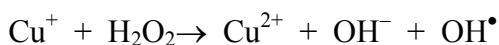
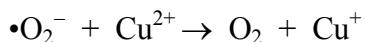
i ćeluca (Turnlund i sar., 1997). Bakar je esencijalni biometal za ljude, životinje i neke biljne vrste. Bakar kao esencijalni element u čovekovom organizmu nalazi se u malim količinama (75-150 mg) u različitim ćelijama i tkivima, sa najvećom koncentracijom u jetri, bubrežima, slezini, srcu, plućima, želuču, kosi i noktima (Turnlund i sar., 1998).

Raspoloživost bakra kod odraslih ljudi iznosi oko 80 mg. Resorbuje se u želuču 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 niskomolekulski protein metalotionein, koji vezuje metale. Potom bakar ulazi u plazmu gde se veže za aminokiseline, naročito histidin i serum albumin (Turnlund i sar., 1998). Bakar se u roku od jednog sata eliminiše iz cirkulacije telesnim tečnostima preko jetre. Jetra obrađuje bakar na dva načina: putem žuci u gastrointestinalni trakt (feses i urin) i njegovo ugrađivanje u ceruloplazmin (bakar zavisna feroksidaza). Ceruloplazmin sadrži 6-8 atoma bakra, polovina je  $Cu^+$ , a polovina u  $Cu^{2+}$  obliku (Harris, 1993). U druge metaloproteine bakra spadaju citohrom oksidaza, tirozinaza, monoamin oksidaza, superoksid dizmutaza i lizil oksidaza (Turnlund, 1999).

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  $\mu$ mol. Gotovo celokupna količina bakra u telu je vezana za proteine, tako da je koncentracija slobodnih bakarnih jona veoma mala, 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).

Kao važan sastojak brojnih enzima bakar-cink superoksid dizmutaze (Cu/Zn SOD) bakar je neophodan za mnoge funkcije organizma (ćelijsko disanje, stvaranje hemoglobina, rast i razmnožavanje) (Turnlund i sar., 1999). Te raznovrsne funkcije u organizmu vezane su za njegovu polivalentnost i sposobnost da gradi stabilne kompleksne fragmente preko O-, N- ili S-donor atoma bioliganda delova biomolekula (proteina, enzima, nukleinskih kiselina i može da blokira -SH reaktivne centre nekih enzima). Bakar je redoks aktivni metal i postoji u dva oksidaciona stanja. Jon  $Cu^+$  koji nastaje redukcijom  $Cu^{2+}$  jona, u prisustvu superoksidnog anjona i smanjene količine askorbinske kiseline i glutationa, katalizuje nastajanje hidroksi radikala ( $OH^\bullet$ ) preko Haber-Weiss-ove reakcije (Bremner, 1998; Kadiiska i sar., 1993).

Haber-Weiss-ova reakcija:



Hidroksil radikal, nastao iz vodonik peroksida, lako stupa u dalje reakcije i izaziva oksidativna oštećenja DNK u ćeliji. Brojne studije pokazuju da višak bakra u ishrani pacova dovodi do oštećenja membrane lipida i procesa lipidne peroksidacije u jetri i bubrežima (Burkitt, 2001).

Bakar je potreban za stvaranje crvenih krvnih zrnaca, ulazi u sastav hemocijanina, ima pozitivan uticaj na ćelijsku membranu nervnih ćelija i ima uticaj u slanju nervnih impulsa. Bakar je neophodan za sintezu fosfolipida ćelijske membrane i na taj način održava mijelin koji odvaja nervne ćelije od okoline i reguliše nivo neurotransmitera. Bakar utiče i u zdravom funkcionisanju malih krvnih sudova koji kontrolisu protok krvi, nutrijenata i otpadnih materija. Utiče i na normalno funkcionisanje mišića krvnih sudova i uključen je u oblaganju krvnih sudova. Bakar je kao kofaktor, sastavni deo enzima prolil i lizil hidroksilaze, enzima uključenog u sintezu kolagena i stvaranju vezivnog tkiva. Stvaranje melanina uključuje enzime koji sadrže bakar. Enzim histaminaza koji metabolizuje aminokiselinu histamin, zahteva bakar za svoje funkcionisanje. Bakar je, takođe uključen u metabolizmu masti i holesterola, kao i normalno funkcionisanje insulina, sintezu prostaglandina.

Bakar je esencijalan element i za normalnu eritropoezu što je uočeno od strane Harta i sar., 1928.god., koji su dokazali da ishrana punomasnim mlekom, dopunjena gvožđem kod pacova uzrokuje anemiju koja je izlečena dodavanjem bakra u hrani (Hart i sar., 1928). Nedostatak bakra u organizmu može dovesti do anemije jer izaziva lošu apsorpciju gvožđa i smanjuje broj eritrocita, zatim osteoporozu, neurološke poremećaje, psihozu, poremećaje u radu srca, smanjuje količinu leukocita i otpornost organizma na bolesti, kao i niz drugih poremećaja. Simptomi nedostatka su: izmenjeni srčani ritam, gubitak kose, osećaj slabosti organizma. Kod odojčadi nedostatak bakra utiče na usporen rast, bledu kožu, anemiju, dijareju, nedostatak pigmenata u kosi i koži, ispupčene i proširene vene. Kod odraslih osoba nedostatak bakra dovodi do anemija, zadržavanja vode u organizmu, slabljenja zidova krvnih sudova, razdražljivosti, krtih kostiju, depigmentacije, gubitka kvaliteta kose.

Prekomerno nakupljanje bakra u organizmu dovodi do Wilsonove bolesti, defekt u procesu ugradnje Cu<sup>2+</sup> jona u ceruloplazmin (Fuentealba i sar., 2000). Prekomerno

nagomilani bakar oštećuje jetru i mozak, što dovodi do pojave hepatitisa, psihičkih i neuroloških simptoma (Scheinberg i sar., 1996). Dokazano je da hronično izlaganje visokim koncentracijama bakra najviše pogađajetru (ciroza jetre), bubrežne kanaliće i mozak (Winge i sar., 1990). Povećan sadržaj bakra u organizmu štetno deluje na kardiovaskularni sistem, dovodeći do koronarnih srčanih bolesti, ateroskleroze, kao i povišenog krvnog pritiska.

## **2.2. Slobodni radikali, oksidativni stres i oksidativna modifikacija biomolekula**

### **2.2.1. Slobodni radikali i mehanizam oksidativnog stresa**

Prisustvo slobodnih radikala u biološkim materijalima je otkriveno pre nešto više od 50 godina. Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli sa jedni ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, što ih čini nestabilnim i veoma reaktivnim. Mogu da reaguju međusobno ili sa drugim manje reaktivnim vrstama što izaziva niz lančanih reakcija. Konstantno se stvaraju u malim količinama u ćelijama tokom odvijanja fizioloških procesa kao „nusprodukti—metabolizma (oksidativna fosforilacija u mitohondrijama, tzv. tkivno disanje, oksidacijska hidroksilacija u mikrozomima, autooksidacija različitih molekula, fagocitoza u leukocitima, oksido-reduksijski procesi u prisustvu metala promenljive valence, u procesu metabolisanja etanola, u sintezi eikosanoida, u procesu lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina i u toku zračenja).

U biološkim sistemima slobodni radikali su uglavnom kiseonične vrste: superoksid anjon radikal ( $O_2^-$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $OH^\bullet$ ), perhidroksil radikal ( $OOH^\bullet$ ), alkoksil radikal ( $RO$ ), peroksil radikal ( $ROO^\bullet$ ) i drugi. Nastajanje hidroksilnih radikala ( $OH^\bullet$ ), najreaktivnijih kiseoničnih radikala, vezano je za Haber-Weiss-ovu reakciju u kojoj reaguju  $H_2O_2$  i  $O_2^\bullet$ , kao i za Fenton-ovu reakciju koja se odnosi na razgradnju  $H_2O_2$  u prisustvu metala sa promenjivom valencijom ( $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  i  $Cu^+/Cu^{2+}$ ) (Sodeman i sar., 2000).

Metali sa promenljivom valencijom (gvođe i bakar) su uglavnom vezani za transportne, deponujuće i funkcionalne proteine, zbog čega ih u slobodnom stanju transportni protein-ćelijska membrana-citozol-mitohondrije-feritin ima u vrlo niskim koncentracijama čime je i njihova slobodno radikalska toksičnost smanjena, s obzirom da samo slobodni metali mogu da uđu u Fentonovu reakciju. Kada se njihova koncentracija poveća, ući će u reakciju sa vodonik peroksidom i produkovati hidroksilni radikal. U fiziološkim uslovima Haber-Weiss-ova reakcija se sporo odvija, ali se u prisustvu metala odvija se Fentonova reakcija uz produkciju reaktivnog hidroksilnog radikala i posledičnu toksičnost.

Slobodni radikali imaju sposobnost oštećenja skoro svih biomolekula u ćeliji, narušavanja međumolekulske veza i poremećaja fluidnosti i propustljivosti ćelijske plazma 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. Toksični efekti delovanja slobodnih radikala se mogu podeliti u tri grupe: a) pomeranje intraćelijskog redoks stanja, b) oksidativna modifikacija lipida, proteina i DNK i c) aktivacija gena.

Reaktivni oblici kiseonika uzrokuju oksidativna oštećenja biomolekula (lipida, proteina, DNA) (Freidovich, 1999; Yun-Zhong i sar., 2002). Reaktivni oblici kiseonika imaju ključnu ulogu u patogenezi starenja i sa starenjem povezanih oboljenja. S druge strane, dokazano je da su radikali kiseonika uključeni u biohemijske aktivnosti ćelija kao što je signalna transmisija, genska transkripcija i druge (Massaad i Klann, 2010).

Oksidativni stres nastaje zbog povećane proizvodnje reaktivnih oblika kiseonika (Parkinsonova i Alchajmerova bolest) ili smanjene sposobnosti ćelija da ga neutrališu preko svojih unutrašnjih antioksidanasa (npr. mutacija gena za superoksid dizmutazu kod amiotrofične lateralne skleroze). Jedna od najprihvaćenijih teorija starenja koju je 1956. godine postavio Harman jeste teorija „slobodnih radikala—koja podrazumeva akumulaciju oksidativnih oštećenja biomolekula sa starenjem, što narušava ravnotežu između prooksidanasa i antioksidanasa u korist prvih koji dovode do oksidativnog stresa (Harman, 1956).

Na molekularnom nivou, koncentracije reaktivnih jedinjenja kiseonika se mogu povećati do visokih nivoa u nekim patološkim procesima ali tamo gde postoji deficijencija antioksidanasa, i mogu reagovati sa ćelijskim konstituentima i izazvati ostećenje, poremećaj funkcija ili propadanje ćelija. Literaturni podaci ukazuju na povezivanje reaktivnih jedinjenja kiseonika sa patološkim oštećenjima koja se viđaju u mnogim bolestima. Kao najizraženiji negativni efekat delovanja slobodnih radikala u literaturi se navodi oksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina sadržanih u ćelijskim membranama, poznata kao lipidna peroksidacija, tokom koje se oštećuje plazma membrana. Krajnji proizvod lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA), koji služi kao biohemijski marker stepena oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana. Ovaj produkt lipidne peroksidacije može da reaguje sa slobodnim SH i NH<sub>2</sub> grupama aminokiselina, peptida, proteina, nukleotida i fosfolipida, čime menja njihove osobine (Đorđević i sar., 2000).

Tokom evolutivnog razvoja organizma uspostavljen je specifičan odbrambeni sistem od eventualnog štetnog delovanja slobodnih radikala, koji je označen kao antioksidativni sistem. Antioksidansom se smatra svaka supstancija koja, prisutna u manjoj koncentraciji u odnosu

na supstancije koje se oksidišu, može da spreči ili značajno umanji njihovu oksidaciju. U fiziološkim uslovima postojanje antioksidativnog sistema zaštite u ćeliji sprečava ispoljavanje toksičnih efekata slobodnih radikala. Ovaj sistem ima za cilj sprečavanje formiranja slobodnih radikala, njihovo uklanjanje ili zaustavljanje lančane reakcije. Prema prirodi i načinu delovanja antioksidansi se mogu podeliti na: enzimske (superoksiddizmutaza, katalaza, glutation reduktaza, glutation-S-transferaza i dr.) i neenzimske (glutation, vitamini A, C i E, albumini, ceruloplazmin, transferin, bilirubin, mokraćna kiselina i dr.) (Đorđević, 2000).

Sve dok postoji ravnoteža izmeđuprodukcije slobodnih radikala i antioksidativne zaštite ćelije slobodni radikali ne ispoljavaju štetan efekat. Prekomerno stvaranje slobodnih radikala (iznad fiziološkog nivoa) i/ili smanjenje koncentracije antioksidanasa dovode do oksidativnog oštećenja tkiva, koje se naziva i oksidativni stres.

Oksidativni stres dovodi do poremećaja mitohondrijalnog transporta elektrona, čiji je krajnji ishod oštećenje ćelije (nekroza) ili programirana ćelijska smrt (apoptoza). Izražen oksidativni stres može prouzrokovati oštećenje ćelija i njihovu smrt (Halliwell, 1991). U zavisnosti od disbalansa, potrošnje i obnavljanja antioksidantnih enzima i količine produkovanih slobodnih kiseoničnih radikala, zavisi i da li će se i u kojoj meri razviti oksidativni stres. Slobodni radikali i oksidativni stres odgovorni su i za proces starenja organizma (Hensley i sar., 2000).

### **2.2.2. Oksidativna modifikacija DNK**

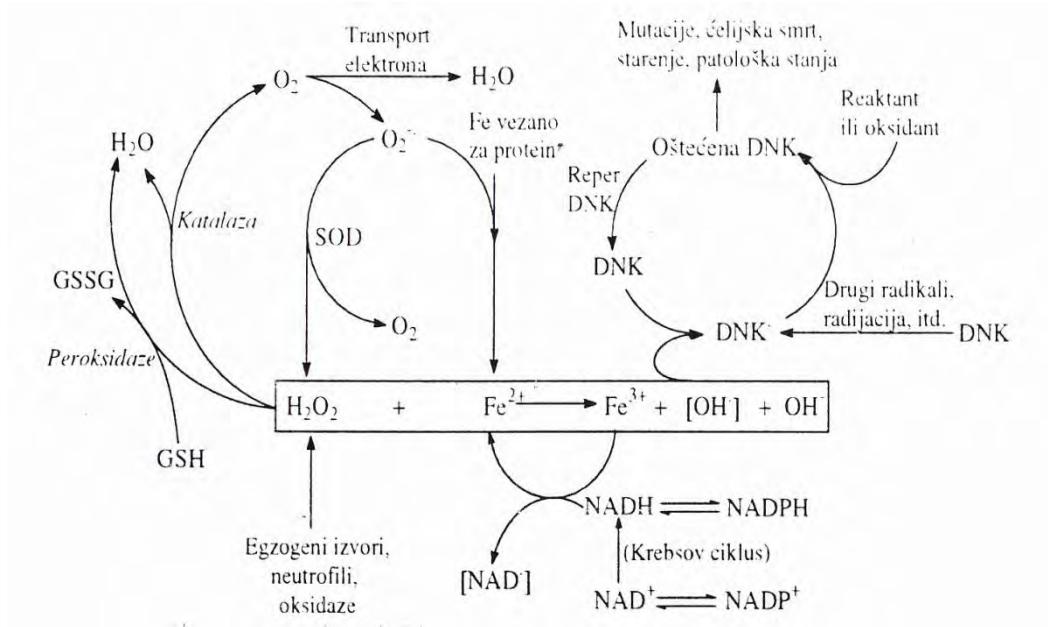
Molekul DNA predstavlja hemijsku osnovu nasleđivanja kod svih prokariotskih i eukariotskih ćelija. Promene strukture DNA dovode do genetskih grešaka-mutacija, kancerogeneze ili apoptoze ćelija (programirane ćelijske smrti). Pored mnogobrojnih faktora koji mogu ispoljiti mutageni efekat, najveći značaj pripada slobodnim radikalima. Efekti mogu biti trenutni ili odloženi, i time se preneti na potomstvo. To čini DNA molekul biološki najvažnijim mestom za delovanje slobodnih radikala.

Iako je DNA biološki najvažniji target za delovanje reaktivnih kiseonikovih radikala, nisu svi tipovi radikala podjednako toksični i ne deluju na jedinstven način. Superoksidni anjon je slabo reaktiv, dok je hidroksilni radikal vrlo reaktiv (Henle i sar., 1997; Imlay i sar., 1988; Linn, 1998; Henle i sar., 1996). Moguće je i da do redukcije metala sa promenljivom valencijom dođe na samoj površini DNA gde se vezuju za fosfodiestarsku osu DNA. Uloga gvožđa je potvrđena protektivnim efektima različitih helatora (Mello-Fihlo i sar., 1985).

Indirektne producente radikala predstavljaju inhibitori antioksidativnog sistema i niskomolekulskih sulhidrilnih komponenti (Fridovich, 1978; Arrick i sar., 1982; Cerutti 1985).

Oksidativno oštećenje DNK dovodi do: prekida lanca DNK, interakcije baza unutar jedne spirale, interakcije baza između različite spirale, izmena baza, gubitak baza, modifikacija baza, stvaranje pirimidin dimera, stvaranje fotoprodukata, stvaranje prepreka unutar DNK, interakcija sa proteinima, interakcija sa lipidnim peroksidima (MDA) ili oksidativne modifikacije dezoksiriboze što dovodi do patoloških promena i pojave bolesti.

Oksidativnu modifikaciju DNK mogu izazvati različiti agensi. Jedan od njih su metali sa promenljivom valencijom koji učestvuju u stvaranju hidroksilnog radikala. Ukoliko Fentonova reakcija zahvati dezoksiribozu dolazi do oduzimanja vodonika, prekida se struktura DNK i oslobađa se baza i dezoksiribozohidroperoksid, koji se prevodi u MDA, što je ilustrovano na slici 2.1.

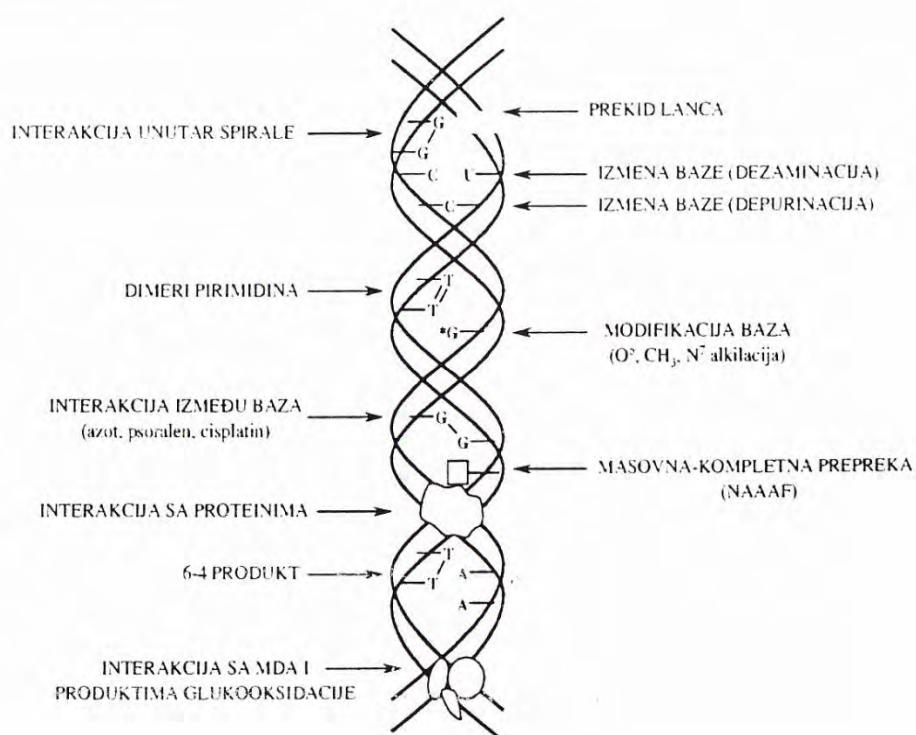


**Slika 2.1.** Sekvence događanja DNK oštećenja posredovanih Fentonovim reakcijom (Đorđević, 2000)

Oksidativna modifikacija DNK produktima lipidne peroksidacije kao što je MDA veoma je opasna, jer skavengeri radikala nisu u stanju da zaustave ovaj proces, mutageni i kancerogeni efekti su jako izraženi. Prema literaturnim podacima smatra se da je delovanje ozona, gama radijacije, unosa nezasićenih masnih kiselina podložnih peroksidaciji upravo na

ovaj način mutageno (Slater, 1984; Pryor, 1973; Levin i sar., 1986; Greenstock i sar., 1981; Harper i sar., 1982).

Mehanizmi DNK reparacije su: direktna reverzija, reparacija putem isecanja i rekombinacija. Najvažniji enzimi koji učestvuju u reparaciji DNK su: DNK endonukleaze, AP endonukleaza, Pirimidin–hidrat–DNK glikozilaza, DNK polimeraze,  $\beta$ -laza,  $\delta$ -laza, Dezoksifosfodiesteraza, DNK ligaze i dr. (Birnboim, 1982). Endonukleaze su od značaja u isecanju oksidativno modifikovanih derivata timina. Ovaj tip endonukleaze je kod bakterija označen kao endonukleaze tipa III, a kod sisara kao  $\gamma$ -endonukleaze.



**Slika 2.2.** Vrste oksidativnih oštećenja DNK (Bohr, 1989)

Postoji mogućnost raspoznavanja i isecanja derivata oksidativne modifikacije adenina, Endonukleaza specifično raspoznaje nukleotid i u celosti ga iseca u oblasti 3' i 5' fosfodiesterske veze. Tako se stvara praznina od samo jednog nukleotida (Dizdaroglu, 1986). Superoksid anjon je u stanju da indukuje sintezu endonukleaze IV. U reparaciji putem isecanja nukleotida značajno mesto zauzimaju i egzonukleaze, koje uklanjuju nesparene oštećene krajeve DNK lanca. Reparacija isecanjem baze može ići i tako što se vrši isecanje glikozidne veze putem enzima DNK glikozilaze, koji prepoznaju oštećenu bazu i iseca njenu vezu sa dezoksiribozom (Dodson i sar., 1994; Sancar, 1996). Nedostatak nekog od ovih

enzima može dovesti do promene u reparaciji DNK, tako da su takve ćelije podložnije mutacijama, odnosno osetljivije na delovanje slobodnih radikala.

### **2.2.3.Oksidativna modifikacija proteina**

Oksidativna modifikacija proteina je promena koja je izazvana reaktivnim intermedijatima slobodnih radikala ili njihovim krajnjim produktima. Oksidativna modifikacija proteina može biti izazvana produkcijom radikala od strane različitih agenasa i sistema: hemijski agensi ( $H_2O_2$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $O^{2-}$ ,  $ONOO$ ,  $HOBr$ ), aktivisani fagociti ("oxidative burst"), gama radijacija u prisustvu kiseonika, lipidni peroksiidi (MDA), mitohondrije (elektron transportni sistem), enzimi oksidoreduktaze, neki lekovi i njihovi metaboliti. U procesu oksidativne modifikacije proteina menja se njihova struktura, što dovodi do izmene funkcionalne aktivnosti. Reakcije modifikacije strukture proteina pod dejstvom slobodnih radikala odvijaju se *in vivo* uslovima i odgovorne su za fiziološki proces starenja, degradacije i obnavljanja proteina, kao i za regulaciju aerobnog i anaerobnog metabolizma. Modifikacija proteina je brza i linearna tako da je senzitivniji parameter oksidativne modifikacije biomolekula nego lipidna peroksidacija (Stadtman, 1990; Stadtman, 1986; Stadtman, 1990).

U ćeliji je dokazano više sistema koji vrše oksidativnu modifikaciju proteina. Zajednički naziv za njih je MFO, što znači oksidativni sistemi mešovite funkcije, a kako obično sadrže neki metal, reakcije se označavaju kao MCO ili oksidacije katalizovane metalima. Metali koji mogu da produkuju slobodne radikale i oštećuju tkiva su npr. kadmijum, hrom, olovo, tita, nikl i vanadijum.

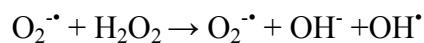
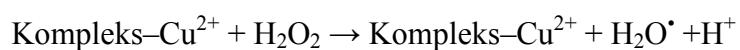
U toku oksidativne modifikacije proteini menjaju primarnu strukturu, kao posledicu modifikacije pojedinih aminokisline, ili kompletног gubitka neke aminokiseline. Kao kosenkvenca nastaje i gubitak sekundarne i tercijarne strukture praćen agregacijom ili fragmentacijom proteina. Stepen i tip efekata na proteinima u velikoj meri zavisi od vrste radikala koji se u reakcijama oslobođaju kao i od dužine ekspozicije. Na osnovu toga izvršena je sledeća podela mogućih modifikacija:

1. modifikacija primarne strukture proteina kao posledica: modifikacije pojedinih aminokiselina, gubitka pojedinih aminokiselina, agregacije proteina i fragmentacije proteina,

2. modifikacija sekundarne i tercijarne strukture proteina koja dovodi do: promene rastvorljivosti (jača hidrofobnost ili hidrofilnost) i promena nanelektrisanja (ka pozitivnijem ili ka negativnijem). Promene fizičko-hemijskih svojstava proteina ogledaju se i u smanjenju termičke stabilnosti, promeni viskoznosti i promeni fluorescencije.

Oksidativna modifikacija aminokiselina često dovodi do nastanka nekih drugih oblika aminokiselina, što utiče na funkcionalnu aktivnost samog proteina. U ćeliji se i prirodno dešavaju oksidacije koje dovode do stvaranja derivata aminokiselina, koje mogu ući u dalje metaboličke puteve. Posledice oksidativne modifikacije proteina su: gubitak enzimske aktivnosti, gubitak funkcije proteina, gubitak aktivnosti kao inhibitora proteaza, agregacija proteina, gubitak imunološke funkcije, neprepoznatljivost od strane odgovarajućih receptora, gubitak osjetljivosti na proteolizu, modifikovana genetska transkripcija, povećana imunogenost i dr. Oksidativna modifikacija proteina je patološki poremećaj kod brojnih stanja i bolesti.

Pojedine proteinske sekvene predstavljaju ciljno mesto za delovanje slobodnih radikala. Takva serkvena je histidin-cistein-histidin. Ova sekvena se dovodi u vezu sa oksidativnom modifikacijom proteina posredovanu metalima sa promenljivom valencijom kao što su bakar i gvođe



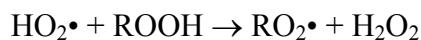
Na delovanje radikala je posebno osjetljiv hemoglobin. U prisustvu superoksidnog radikala dolazi do promena u strukturi hemoglobina. Jedan od derivata oksidativne modifikacije proteina spada i u kompleks proteina sa nekim neproteinskim jedinjenjima, kao što je kompleks sa produktom lipidne peroksidacije (malondialdehidom).

Stepen oksidativne modifikacije proteina je moguće detektovati kroz količinu slobodnih amino-kiselina ukoliko se one ne produkuju na drugi način u ćeliji, ili kroz određivanje sulfhidrilnih grupa. U procesu oksidativne modifikacije proteina mogu nastati i karbonil radikali, koji se uobičajeno nazivaju karbonilne grupe, a određivanje njihove koncentracije može biti jedan od pokazatelja oksidativne modifikacije proteina. Isti se mogu odrediti spektrofotometrijski, fluorimetrijski ili RIA (radioimunološkim) metodama (Oliver, 1987; Hikerji, 1990; Kellogg i sar., 1977; Fagan i sar., 1986; Wolff i sar., 1986; Schuessler i sar., 1983).

#### **2.2.4. Lipidna peroksidacija**

Lipidna peroksidacija je oksidativno oštećenje koje zahvata ćelijske membrane, lipoproteine i druge molekule koji sadrže lipide u uslovima postojanja oksidativnog stresa (Halliwell, 1985; Kagan, 1988; Slater, 1984). Lipidi ćelijske membrane (fosfolipidi, glikolipidi i holesterol) predstavljaju najčešće supstrate oksidativnog ataka. Iako najčešći negativni fenomen delovanja slobodnih radikala, proces lipidne peroksidacije predstavlja samo jednu konsekvencu oksidativnog stresa prisutnog u ćeliji pri neadekvatnom bilansu stvaranja i eliminacije slobodnih radikala. Lipidna peroksidacija je jedan od najbolje proučenih procesa oštećenja ćelije u uslovima oksidativnog stresa (Farber i sar., 1990; Halliwell, 1984). Lipidna peroksidacija kao radikalски inicirana lančana reakcija je samopropagirajuća u ćelijskoj membrani i nastaje delovanjem slobodnih radikala na nezasićene masne kiselne u membrana ćelija dovodeći do njihovog oštećenja. Izolovane oksidativne reakcije mogu imati duboke efekte na funkciju membrane. Peroksidacija membranskih lipida se uglavnom javlja kao posledica oksidativnog stresa u intaktnoj ćeliji. Slobodni radikali su inicijatori i terminatori procesa lipidne peroksidacije (posebno superoksid anjon radikal) (McCord, 1995).

Lipidnu peroksidaciju uzrokuje hidroksilni radikal ( $\text{OH}^\bullet$ ), kao i drugi radikali (npr. superoksidni) koji mogu pokrenuti proces oksidacije nezasićenih masnih kiselina.



Jednom pokrenuta reakcija peroksidacije nastavlja se autokatalitički, ima progredijentni tok, a kao krajnji ishod ima strukturno-funkcionalne promene supstrata. Lipidna peroksidacija ima 3 faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju (Štefani sar., 2007). Inicijacija procesa lipidne peroksidacije podrazumeva oduzimanje atoma vodonika od strane radikala kiseoničnog porekla visokog oksidacionog potencijala ( $\text{OH}$  i  $\text{O}_2$ ), iz metal grupe (- $\text{CH}_2-$ ) koja se nalazi u  $\alpha$  položaju od mesta dvogube veze u ugljovodoničnom lancu nezasićene masne kiseline, početna reakcija je na slici 2.3. S obzirom, da je nastajanje i dalja razgradnja primarnih produkata lipidne peroksidacije ključno mesto za proces razgranjanja i dalje propagacije lipidne peroksidacije, njihova detoksikacija predstavlja limitirajuću reakciju u terminaciji ovog autokatalitičkog oksidativnog ataka. U procesu detoksifikacije lipidnih hidroperoksida, koji podrazumevaju isecanje oksidativno modifikovane nezasićene masne

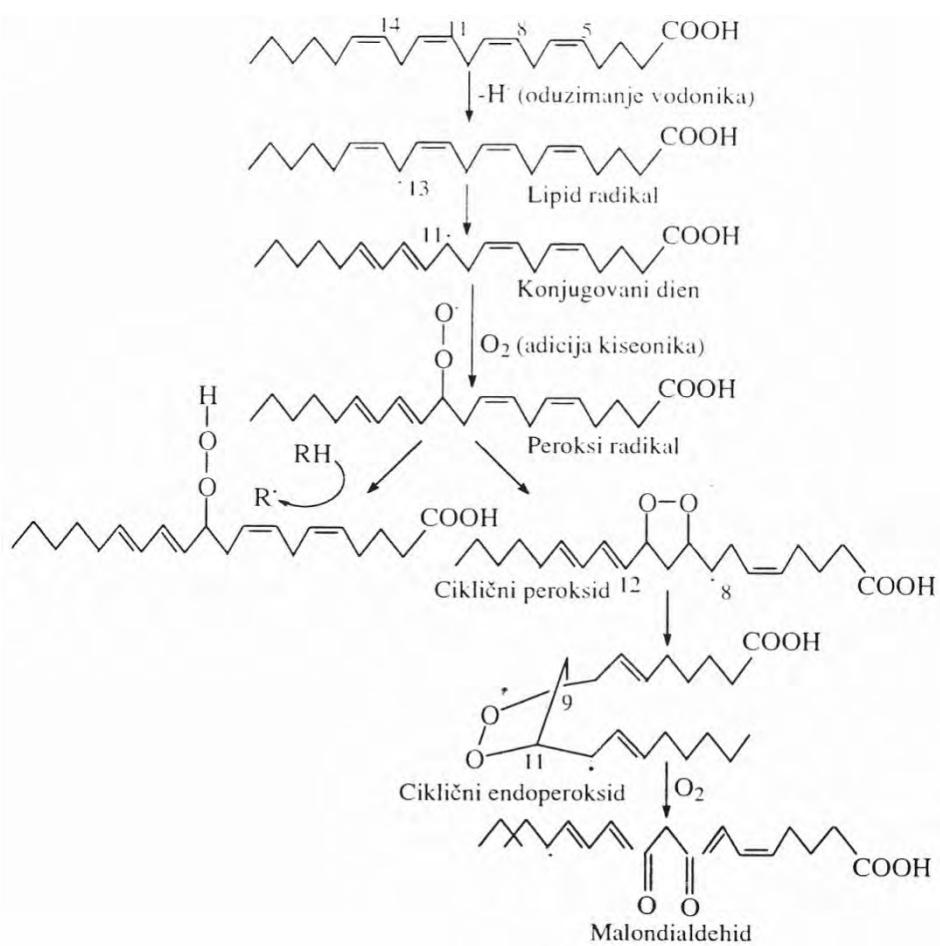
kiseline ili alkohola nastalog redukcijom lipidnih hidroperoksida, kao i repariranje postojećeg defekta (Đorđević i sar., 2000).

Za iniciranje lipidne peroksidacije i Fentonovu reakciju neophodno je prisustvo  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  u odnosu 1:1. Peroksidacija dovodi do narušavanja barijerne funkcije membrane, povećava propustljivost za vodu, jedno i dvovalentne jone, a kod većih oštećenja i visokomolekularnih jedinjenja. Oštećenje membrane lizozoma uslovljava izlazak hidrolitičkih enzima, dok narušavanje strukture membrane mitohondrija dovodi do oslobođanja  $\text{Ca}^{2+}$  i aktivacije  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisnih enzima. Proces peroksidacije lipida smanjuje hidrofobnost lipidnog dvosloja, što menja afinitet i interakciju proteina sa lipidima, procesa esencijalnih za odvijanje velikog broja funkcija membranskih proteina kao što su: deljenje, diferencijacija, endocitoza, fagocitoza, egzocitoza, transport jona i materija, prijem i prenos signala, međućelijski kontakt i homeostaza ćelije u celini (Nikolson i sar., 1978; Bellomio i sar., 1985; Thomas i sar., 1989).

Lipidna peroksidacija smanjuje fluidnost bioloških membrana (Richard i Thayer, 1983) što rezultira pojačanom propustljivošću za jednovalentne i dvovalentne jone (Myung-Suk i sar., 1987; Gubsky i sar., 1990) i inaktivacijom membranskih enzima. Fragmentacija lanaca masnih kiselina do intermedijera tipa aldehida i kratkolančanih isparljivih ugljovodonika dovodi do gubitka integriteta membrane, dok ruptura lizozomskih membrana dovodi do oslobođanja hidrolitičkih enzima koji dalje oštećuju ćeliju (Fong, 1973). Proces lipidne peroksidacije inicira odumiranje ćelija (Nikolson, 1978; Korsmeyer, 1995). Međutim, toksični efekti ovog procesa prisutni su uvek pri neadekvatnom bilansu prooksidativnih i antioksidativnih faktora ćelije (Halliwell i sar., 1992). Osim negativnih dejstava, proces lipidne peroksidacije reguliše jonski transport u mitohondrijama (Kagan, 1988).

U toku procesa lipidne peroksidacije nastaju primarni visokoreaktivni intermedijeri: alkil radikali, konjugovani dieni, peroksi- i alkoxi-radikali, kao i lipidni hidroperoksiđi što je ilustrovano na slici 2.4. Daljom razgradnjom ovih primarnih produkata nastaju sekundarni produkti lipidne peroksidacije: kratkolančani isparljivi ugljovodonici, aldehidi, 4-hidroksi-2,3-transnonenal i 4,5-dihidroksidecenal i krajnji proizvod lipidne peroksidacije, malondialdehid.

Metali sa promenljivom valencijom mogu na dva načina biti uključeni u proces lipidne peroksidacije. Prvo, mogu je inicirati stvarajući hidroksilni radikal u Fentonovoj reakciji (Aruoma i sar., 1989).



**Slika 2.3.** Inicijacija i propagacija procesa lipidne peroksidacije  
(Halliwell i Gutteridge, 1985)

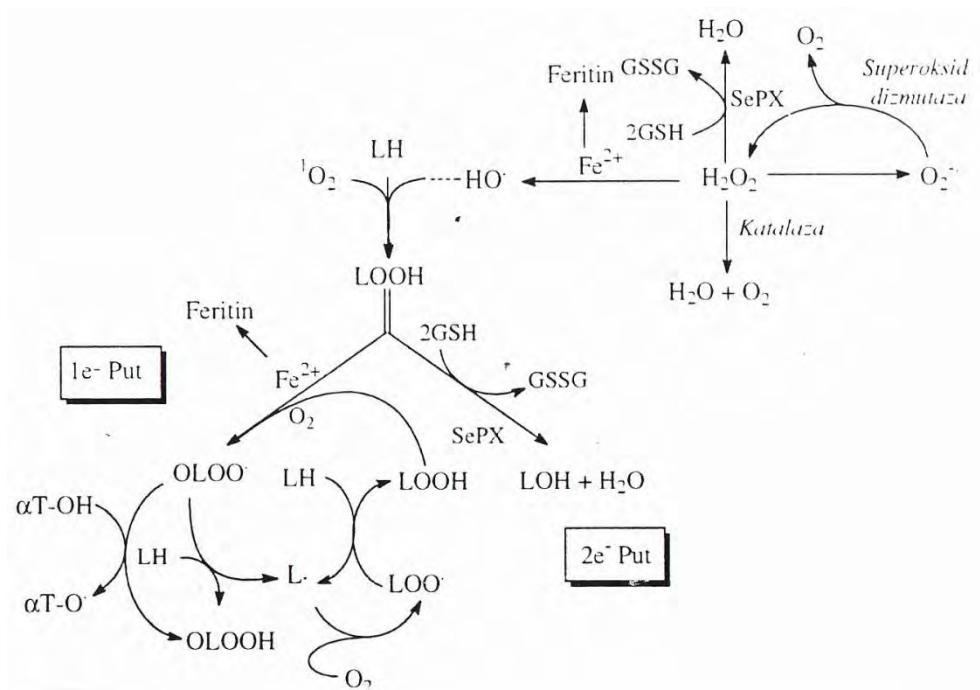
Drugo, kada se joni metala dodaju lipidnim sistemima koji već sadrže perokside, oni prevode perokside u peroksil i alkoksil radikale koji dalje mogu adirati vodonik, čime se propagira proces lipidne peroksidacije. Krajnji produkti delovanja metala na lipidne perokside su citotoksični MDA, 4-hidroksinonenal i gasovi etan i pentan (Steinberg i sar., 1990; Traysman i sar., 1991; Weitzman i sar., 1990).

**Malondialdehid (MDA)** nastaje kao krajnji proizvod procesa lipidne peroksidacije (slika 2.3.), koji se može predstaviti i u enolnom obliku:



Ovo jedinjenje je reaktivni aldehid koji izaziva oksidativni stres u ćelijama i biomarker je

nivoa oksidativnog stresa u organizmu ili pojedinim organima. MDA pokazuje izrazite citotoksične efekte. Reakcija između MDA i proteina, RNK, DNK ili fosfolipida može dovesti do modifikacije ovih supstrata i oštećenja ćelijskih membrana i intracelularnih molekula (Sreejayan i sar., 1999). Krajnji proizvod lipidne peroksidacije (MDA) kada se veže za DNK, stvara tzv. "DNK radikale" koji su odgovorni za nastanak mutacija. MDA je reaktivni potencijalni mutagen i karcinogen. MDA takođe inhibira brojne tiol zavisne enzime: glukozo 6 fosfatazu,  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPazu, adenilat ciklazu,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazu (Slater, 1984). Stepen lipidne peroksidacije procenjuje se merenjem nivoa MDA u različitim tkivima (Yiin i sar., 1995).



**Slika 2.4.** Nastajanje, metabolizam i detoksikacija lipidnih hidroperoksida

(Groitti, 1998)

Pored porasta koncentracije MDA, može se registrovati i prisustvo pentana npr. u izdahnutom vazduhu kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (Humad i sar., 1988), akutnim infarktom miokarda (Weity i sar., 1991), multiplom sklerozom (Toshiniwal i sar., 1992), respiratornim distres sindromom (Drury i sar., 1997). Povećana eliminacija etana zabeležena je nakon totalnog (Arterbery i sar., 1994), kao i kod pacijenata sa akutnim ulceroznim kolitisom (Sedghi i sar., 1994).

Malondialdehid (MDA) i drugi aldehidi mogu da reaguju sa amino-grupama proteina formirajući intramolekulske kovalentne i vodonične veze menjajući na taj način njihova strukturno-funkcionalna svojstva (Nair i sar., 1986). Proizvodi lipidne peroksidacije se lako detektuju određenim spektrofotometrijski metodama i koriste se za merenje nivoa oksidativnog stresa, najčešće se određuje koncentracija malondialdehida (Andreeva i sar., 1988). Povećane koncentracije MDA ukazuju na prisustvo oksidativnog stresa zbog narušavanja ravnoteže između proksidativnog i antioksidativnog sistema.

Lipidna peroksidacija je najizraženiji negativni mehanizam u delovanju RVK, koji se završava ireverzibilnim oštećenjima funkcije i strukture ćelijske membrane kod čoveka, životinja i biljaka. Krajnji produkt pokazatelja nivoa lipidne peroksidacije su TBA reagujuće supstance (TBARS-tiobarbiturne reagujuće supstance) (Pavlović i sar., 2006). U ovom procesu posrednu ulogu imaju toksični metali koji doprinose produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta i blokiranju –SH aktivnih grupa enzima kao i moguće interakcije preko –S donor atoma istih koje vode do građenja kordinativno kovalentnih struktura tipa –S–M.

## **2.3. Antioksidansi u procesu oksidativne modifikacije biomolekula**

### **2.3.1. Antioksidansi u biološkim sistemima**

Proces oksidativne modifikacije proteina, ugljenih hidrata, DNK i lipida je ustvari oštećenje ćelije, naročito ćelijske membrane. U fiziološkim procesima dolazi do stvaranja slobodnih radikala, zbog čega je tokom evolutivnog razvoja uspostavljen zaštitni sistem, gde sveukupnost svih antioksidanata u organizmu čoveka čini antioksidativni sistem. Antioksidanti predstavljaju sve supstance koje, prisutne i u maloj koncentraciji u odnosu na supstance koje se oksidišu, mogu da spreče ili značajno smanje njihovu oksidaciju (Hallivell, 1990).

Sa funkcionalnog aspekta antioksidativna zaštita organizma obuhvata tri nivoa delovanja. Prema prirodi i načinu delovanja antioksidanti se mogu podeliti na enzimske i neenzimske. Enzimi (superoksid-dizmutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, glutation S-transferaza) čine tzv. 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 antioksidanti predstavljaju sekundarnu liniju odbrane koja podrazumeva angažovanje sistema u uslovima normalnog i pojačanog stvaranja slobodnih radikala (Hallivell i sar., 1992).

Ova velika grupa neenzimskih antioksidanata, različitih po strukturi, obuhvata prirodno endogene produkte ćelija, nutritivne egzogene materije i sintetske produkte tj. farmakološki aktivne supstance. U neenzimske antioksidante spadaju: vitamin E, vitamin C, tiolova jedinjenja (glutation, liponska kiselina, metionin, cistein), dihidroliponska kiselina, albumin, metalotionein, bilirubin, mokraćna kiselina, estrogeni, kreatinin, koenzim Q, poliamini, karnozin, taurin i nejgovi prekusori,  $\beta$ -karoteni, flavonoidi i druga fenolna jedinjenja biljnog porekla. 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- $\alpha$ -tokoferol. To je najefikasniji lipofilni antioksidant u biološkim

membranama jer omogućava njihovu stabilnost, a modulacijom puteva signalne transdukcije modifikuje ćelijski odgovor na oksidativni stres. Antioksidativna svojstva vitamina E dolaze do izraṭaja u prevenciji i smanjenju komplikacija kod mnogih bolesti (Stampfer i sar., 1993; Tagami i sar., 1999).

L-askorbinska kiselina (vitamin C) je najefikasniji hidrosolubilni antioksidant. Stvara se u biljkama, nekim ćivotinjama, dok se kod čoveka ne može sintetisati. Lako se redukuje (Bendich i sar., 1986). Prisustvo L-askorbinske kiseline u krvnoj plazmi efikasno sprečava oksidaciju lipida 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).

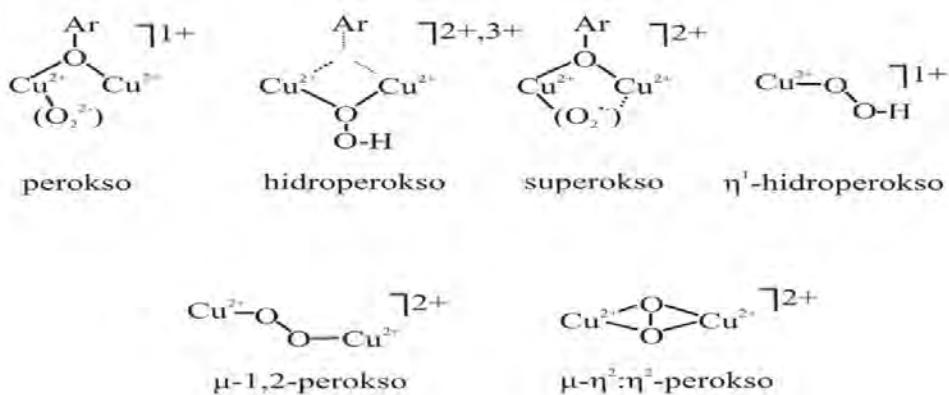
Farmakološki aktivne supstance su: nesteroidni antiinflamatorni lekovi, blokatori kalcijuma, allopurinol, N-acetilcistein, ACE inhibitori i desferoksamin, takođe ostvaruju neenzimsku antioksidativnu zaštitu preko različitih mehanizama (Đorđević, 2000).

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).

### **2.3.2. Bioligandi**

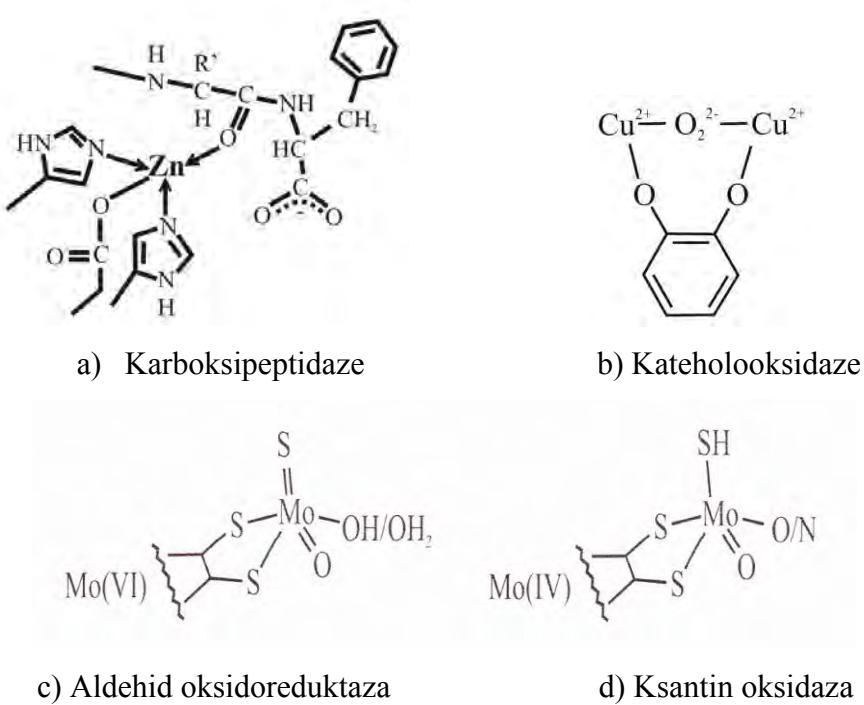
Metali koji imaju bitnu i nezamenljivu ulogu u ćivotnoj aktivnosti organizama su biometali. U biometale spadaju: natrijum, kalijum, magnezijum, kalcijum i d-metali: gvođe, kobalt, bakar, cink, molibden i mangan. Prema nekim mišljenjima u biometale treba uključiti i vanadijum, hrom, nikal i kadmijum. Za biometale iz serije d-metala 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 [ML<sub>n</sub>].

Prosti ligandi sa jednim donor atomom su monodentatni:  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{ROR}$ ,  $\text{RSH}$  i drugi. Tipično bidentatni ligandi su  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{RCOO}^-$ , aminkseline i drugi. Kiseonik i reaktivne kiseonične vrste mogu da se vezuju i kao monodentatni i bidentatni ligandi (Nikolić, 2010).



**Slika 2.5.** Vezivanje različitih kiseoničnih liganda za Cu-aktivni centar enzima  
(Nikolić, 2010)

Bioligandi, proteini, nukleinske kiseline imaju više donor atoma i mesta preko kojih ostvaruju koordinaciju sa metalima.

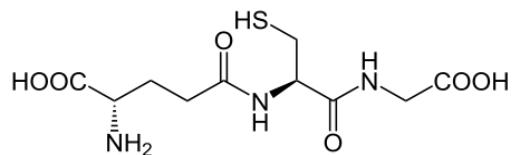


**Slika 2.6.** Šematski prikaz aktivnih mesta nekih enzima sa naglašenom kordinacijom M-L  
(Nikolić, 2010)

Stabilnost nagrađenih kompleksa zavisi od jačine interakcije M-L i različita je za O-, N- ili S- donor atoma. Kompleksi sa aminokiselinama npr. su stabilniji nego kompleksi sa peptidima. Redosled stabilnosti zavisi od prirode metala i dat je u nizu:  $\text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Fe}^{3+}$  (Crichton, 2008).

### 2.3.3. Glutation u biološkim sistemima

Glutation (GSH) je tripeptid L- $\gamma$ -glutamil-L-cistenil-glicin koji 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 i drugi. GSH je biološki redoks u metabolizmu eritrocita, a ima ulogu i u transport 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 tuci ili urina izlučuju u spoljašnju sredinu.

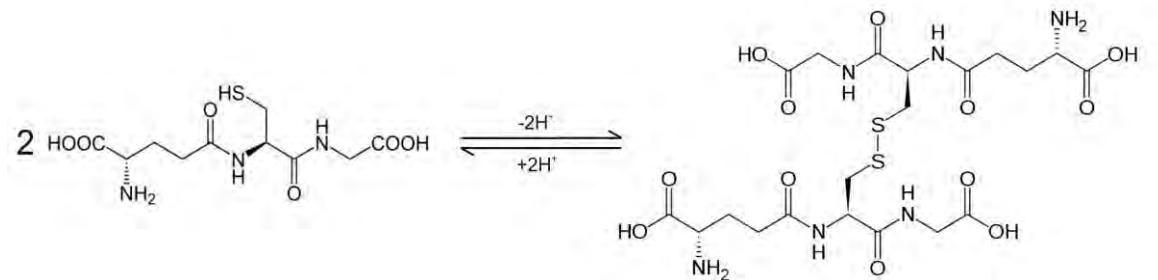


**Slika 2.7. Glutation**

Široko je rasprostranjen u humanim i tivotinjskim 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 je glavni neproteinski tiol. Ovaj peptid karakteriše neobična peptidna veza (neobičnost se ogleda u tome što u rekciju građenja peptidne veze sa cisteinom ne stupa  $\alpha$  -COOH, već  $\gamma$  - COOH glutaminske kiseline) koja sprečava nespecifičnu desaturaciju hidrolitičkim enzimima koji napadaju normalnu peptidnu vezu.

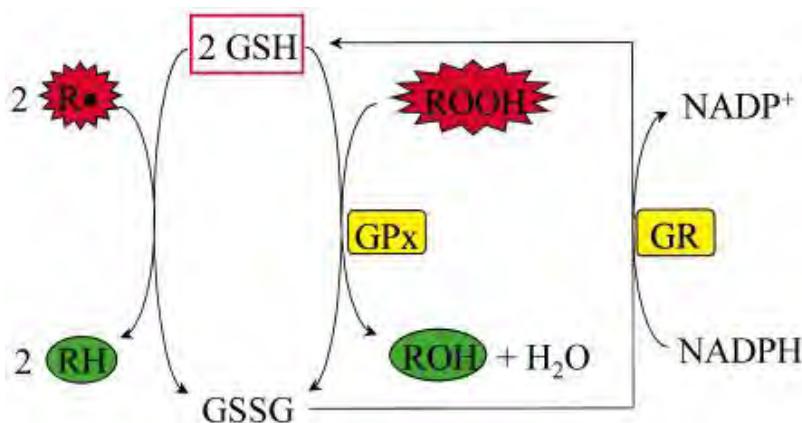
Koncentracija u ćeliji od 0,1-10 mmol svrstava glutation u red najzastupljenijih tiolnih jedinjenja (Meister, 1988). U ćeliji postoje dva puta glutationa: citoplazmatski i mitohondrijalni u koje dospeva iz citoplazme. Intracelularna koncentracija glutationa

regulisana je preko aktivnosti enzima uključenih u sintezu (Meister i Anderson, 1983), zatim preko dostupnosti aminokiselina, posebno cisteina (Bannai, 1984), intenziteta trošenja u procesu detoksikacije u ćeliji kao i preraspodelom GSH između ogana.



**Slika 2.8.** 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. Sinteza glutationa je determinisana dostupnošću cisteina, kao i aktivnošću glutamat-cistein ligaze (GCL). Brzina sinteze ovog regulatornog enzima određena je brojem translacionih ciklusa mRNA za pomenuti enzim, kao i stabilnošću iste mRNA. Aktivnost GCL holoenzima može biti regulisana S-nitrozacijom, fosforilacijom i oksidacijom.



**Slika 2.9.** 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 ukljanjanjem 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 ćivota tiol radikala može biti dosta duža od ćivota drugih slobodnih radikala.



Pri fiziološkim uslovima za određeni pH, sulfhidrilne grupe mogu i da se delimično jonizuju, 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 radikali i tiolatni anioni.

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, sluzokoča tankog creva i močdani 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 detoksifikaciji 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 međuočanske preraspodele GSH i njegovih intermedijera (Bannai i sar., 1986; Mimić, 1994). Sposobnost ekskretovanja GSH iz različitih organa, posebno iz jetre (Anderson i sar., 1980; Ookhtens 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 u resintezi i međuočanskom protoku 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.

#### **2.3.4. Liponska kiselina u biološkim sistemima**

$\alpha$ -Liponska kiselina (LA), 6,8-ditiooktanska kiselina, je ciklični disulfid, i ista je preko karboksilne grupe povezana sa proteinskim 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).

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

Liponska kiselina u čistom stanju ima neprijatan miris i ukus. Ispoljava veliku aktivnost u vrlo malim količinama. Dejstvo  $\alpha$ -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.



**Slika 2.10.** Liponska kiselina

**Slika 2.11.** Dihidroliponska kiselina

Alfa 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 LA može postojati intracelularno, ekstracelularno i na membranama. Alfa liponska kiselina je antioksidans koji se relativno široko upotrebljava. Koristi se u terapiji mnogih bolesti (Ziegler i sar., 1995).

Suplementacija liponskom kiselinom koja može delovati kao antioksidans i smanjiti oksidativni stres u ćeliji, zapaćena 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 i retinopatije) i drugih bolesti.

LA je široko zastupljena u hrani ţivotinjskog i biljnog porekla, vezana sa proteinima preko lizina u lipolizin. Ţivotinjska 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 prehrambenoj industriji i u industriji pića.

## 2.4. Hematološki parametri

Krv je tečno vezivno tkivo organizma koje se sastoji iz plazme i uobičenih elemenata: crvenih krvnih zrnaca, belih krvnih zrnaca i krvnih pločica.



### 2.4.1. Eritrocit

Eritrocit je ćelija bez jedra, bikonkavnog, diskoidnog izgleda, dijametra oko  $7,8 \mu\text{m}$ , a debljine oko  $2,4 \mu\text{m}$  na periferiji odnosno  $1 \mu\text{m}$  ili manje u centralnom delu ćelije. Ovakav oblik eritrocitu daje maksimalnu elastičnost i savitljivost, omogućavajući mu da prođe i kroz veoma uske kapilarne prostore bez rupture ćelijske membrane. Osim prilagodljivosti lumenu kapilara, ovakav oblik uslovjava i uvećanu površinu što dozvoljava efikasnu i brzu razmenu gasova.



Eritrocit sadrži vrlo koncentrovan rastvor hemoglobina (Hb), hemoglobin čini 95% svog ostatka eritrocita. Iako nema jedro, mitohondrije i ribosome, eritocit je vrlo specijalizovana ćelija, koja trivi 120 dana i za to vreme pređe krvotoku oko 300 kilometara, donoseći svim tkivima kiseonik ( $\text{O}_2$ ) (Harris i sar., 1970). Eritrocit predstavlja vrlo radnu dinamičku jedinicu. Opna eritrocita sastoji se iz bimolekulskog fosfolipidnog sloja koji se nalazi između dva belančevinska sloja. Polarni (hidrofilni) deo molekula fosfolipida, sastavljen od fosforne kiseline, čini spoljašnji sloj, dok nepolarni (hidrofobni) deo ovog sloja, sastavljen od masnih kiselina, čini unutrašnji deo fosfolipidnog sloja. Spoljašnji, uglavnom belančevinski sloj opne, sastoji se iz pločica sastavljenih iz lipoproteina i glikoproteina u koje spadaju i antigeni krvnih grupa. Unutrašnji belančevinski sloj koji je u dodiru sa hemoglobinom, sastoji se iz isprepletanih vlakna spektrina. U hemijskom pogledu, stroma eritrocita pretežno se sastoji iz lipida i belančevina (Shohet, 1971).

U toku prvih nekoliko nedelja embrionalnog trudnoće eritrociti se stvaraju u tumančanoj kesi i poseduju jedro. Kasnije tu ulogu preuzimaju jetra, slezina i limfni čvorovi, a u poslednjim mesecima trudnoće, kao i posle rođenja eritrociti se proizvode u koštanoj srži procesom eritrocitopoeze. U kosnoj srži su pluripotentne hematopoezne matične ćelije od kojih potiču sve ćelije krvi. Sukcesivnim deobama od pluripotentnih ćelija nastaju različite ćelije periferne krvi. Ove ćelije se reprodukuju tokom celog života a mali broj ostaje isti kao i matična ćelija. Predrođena matična ćelija koja proizvodi eritrocite označena je skraćenicom CFU-E (colony-forming unit – erythrocyte). Koštana srž normalno stvara oko 900 biliona

eritrocita na sat i tako zameni isti broj eritrocita koji se istovremeno razgrađuju uz pomoć mononuklearnih makrofaga histiomonocitnog sistema. Vremenom se koštana srđ zamenjuje masnim tkivom, pa se nakon dvadesete godine ove ćelije proizvode samo u membranoznim kostima, kao što su rebra, grudna kost, pršljenovi i karlične kosti. Razgradnja eritocita je posledica "starenja" eritrocita odnosno posledica gubitka enzima koji učestvuju u procesima glikolize. Smatra se da razgradnja starih eritocita ide preko sledećih procesa: fragmentacije, osmoze, eritrofagocitoze, citolize izazvane komplementom i denaturacije hemoglobina. U normalnim uslovima se najveći deo starih eritrocita razgrađuje u ćelijama histiomonocitnog sistema u koštanoj srđi, slezini i jetri. Normalni eritrocit traje 100-120 dana.

Broj eritrocita u zdravih osoba kreće se između 4,2 i 5,8 miliona u  $\mu\text{l}$  u muških, a između 3,7 i 5,2 miliona u  $\mu\text{l}$  u ženskih osoba.

**MCV**, **MCH** i **MCHC** su eritrocitni indeksi, odnosno parametri koji ukazuju na osobine crvenih krvnih ćelija.

**MCV** (mean cell volume) je srednja vrednost zapremine eritrocita (referentne vrednosti su 80-97 fL). Određuje se po broju eritrocita i VPRC na osnovu formule (Stefanović, 1981):

$$\text{MCV} = \text{VPRC/lit} / \text{broj eritrocita : milion/lit.}$$

VPRC (volume of packed red cell) je vrednost hematokrita tj. zapremina naslaganih eritrocita

**MCH** (mean cell hemoglobin) označava srednju vrednost količine hemoglobina u jednom eritrocitu (26-32 pg) dobija se iz jednačine:

$$\text{MCH} = \text{vrednost hemoglobina u g/l krvi} / \text{broj eritrocita:milioni/l}$$

**MCHC** (mean cell hemoglobin concentration) je srednja vrednost koncentracije hemoglobina u svim eritrocitima (310-360 g/L) dobija se iz sledeće formule:

$$\text{MCHC} = \text{hemoglobin u g/dl} / \text{VPRC na lit.}$$

**Hematokrit** predstavlja zapreminu eritrocita u 100 mL pune krvi, izraženu u procentima. Normalne vrednosti su za žene 0.356 - 0.470 l/l i kod muškaraca 0.41 - 0.53 l/l.

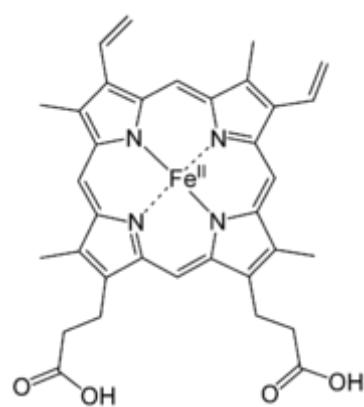
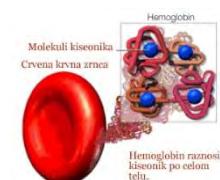
**RDW** (red cell distribution width) je mera varijabilnosti veličine eritrocita. Normalne vrednosti su 11,5-16,5 %. RDW specifično ukazuje na postojanje jedne ili više populacija

eritrocita što je karakteristika pojedinih hematoloških bolesti eritrocitne loze, a ujedno je i važan prognostički pokazatelj efikasnosti lečenja.

Promene vrednosti pojedinih eritrocitnih konstanti, naročito MCV parametra, dijagnostički su značajne u klasifikaciji pojedinih anemija i uvek se posmatraju u korelaciji sa dobijenim vrednostima broja eritrocita i koncentracije hemoglobina. Povećane vrednosti eritrocitnog indeksa MCHC sreću se kod bolesnika sa teškim oblikom dehidratacije, dok se povećane vrednosti MCV mogu naći kod megaloblastne anemije (nedostatak vitamina B12 ili folne kiseline), bolesnika sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća (hronični opstruktivni bronhitis i emfizem), smanjenom funkcijom štitaste ćelije (hipotireozom), oboljenjem jetre (ciroza) i kod teških alkoholičara.

#### 2.4.1.1. Hemoglobin

Hemoglobin je složena belančevina (hromoprotein) čiji molekul se sastoji iz belančevine globina i prostetične grupe, hema, koji hemoglobinu daje crvenu boju. Globin hemoglobina sastoji se iz 4 polipeptidna lanca. Za svaki od ovih lanaca vezan je jedan molekul hema. Hem grupa se sastoji od organskog dela i atoma gvožđa koji je odgovoran za vezivanje kiseonika. Hemoglobin prenosi kiseonik iz pluća u ostale delove tela, kao što su npr. mišići (Stefanović, 1981). On povećava prenosni kapacitet za kiseonik u litru krvi sa 5 na 250 ml/l. Hemoglobin ima i ključnu ulogu i pri prenosu CO<sub>2</sub> i vodonikovih jona, pri čemu učestvuje u regulaciji pH krvi. Empirijska hemijska formula najčešćeg ljudskog hemoglobina je C<sub>2952</sub>H<sub>4664</sub>N<sub>812</sub>O<sub>832</sub>S<sub>8</sub>Fe<sub>4</sub>.



Slika 2.12. Hem grupa

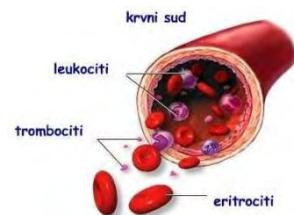
Polipeptidni lanci globina razlikuju se po broju i redosledu aminokiselina u njima, kao i po nekim drugim osobinama koje su važne za ulogu hemoglobina u izmeni gasova. Građa polipeptidnih lanaca može se podeliti u 4 podgrupe (Perutz i sar., 1969).

Primarnu građu (strukturu) čini broj i redosled pojedinih aminokiselina u polipeptidu. Sekundarnu građu (strukturu) čine zavojnice (heliksi) koje stvaraju aminokiseline u pojedinim polipeptidnim lancima, a koje su stabilizovane vodoničnim vezama između CO i NH grupa aminokiselina susednih zavoja. Tercijarnu građu predstavlja način na koji su polipeptidni lanci izuvijani da bi dobili trodimenzijski oblik koji ima donekle sferni izgled. Taj oblik održavaju Van de Waalsove sile (Muirhead i sar., 1967). Kvaternernu građu predstavlja način na koji su 4 polipeptidna lanca međusobno vezana, da bi stvorili molekul hemoglobina, koji ima izgled tetraedra.

Uloga hemoglobina je da prenosi kiseonik iz pluća do njenih kapilara, iz kojih hemoglobin prelazi u ćelije u kojima se koristi u procesima disanja. Molekul hemoglobina može maksimalno da veže četiri molekula kiseonika (Cowan, 1997). Merenje nivoa hemoglobina je jedan od najčešće izvođenih testova krvi. Rezultati se prikazuju u g/l, g/dl ili mol/l. Normalne vrednosti za nivo hemoglobina su: žene: 12,1—15,1 g/dl; muškarci: 13,8—17,2 g/dl. Ako ukupan hemoglobin padne ispod tačno određene vrednosti nastupa anemija.

#### 2.4.2. Leukociti

Leukociti ili bela krvna zrnca predstavljaju kompleksne ćelijske strukture koje su aktivno uključene i odgovorne za odbranu organizma. Poseduju jedro različitog oblika i veličine, elastičnu membranu koja im omogućuje ameboidno kretanje kao i sposobnost dijapedeze, odnosno prolazak izmedju endotelijalnih ćelija i izlazak u vezivno tkivo. Učestvuju u imunom odgovoru. To su bele krvne ćelije koje nastaju u koštanoj srži i limfnim čvorovima. Veličina leukocita je 8 – 12 mikrometara. U litri krvi ima ih od  $4 - 8 \times 10^9$ . Broj kod zdravih osoba se kreće od  $5 - 8 \times 10^9$  u  $1 \text{ cm}^3$  krvi i on se menja tokom različitih fizioloških stanja i tokom starosti.



Uloga leukocita je mnogostruka: fagocitoza je sposobnost da unese bakterije u svoju citoplazmu, da ih uništi i da stvara antitela, a sekretorna aktivnost je sposobnost leukocita da stvaraju enzime, histamin i heparin. Leukociti sadrže oko 80% vode, velike količine glikogena koji služi kao izvor energije, puno nukleoproteida, histamin i heparin. Od fizičkih

osobina najvažnije je ameboidno kretanje kojim prelaze iz krvi u tkiva. Oblik leukocita se razlikuje. Svi leukociti periferne krvi su okruglog oblika.

Na osnovu njihove geneze, dinamike i uloge leukociti se dele u dve velike grupe:

1. Fagocite, čija je glavna uloga u fagocitovanju mikroorganizama, kao i svakog drugog stranog antigena i
2. Imunocite, leukocite koji igraju glavnu ulogu u stvaranju humorarnog i ćelijskog imuniteta (Erslev i sar., 1975)

Fagocitnoj grupi pripadaju granulociti i monociti-makrofagi. Obe ove vrste ćelija vode poreklo iz kostne srži i najverovatnije da imaju zajedničku osnovnu matičnu ćeliju (Metacalf, 1971) bilo u vidu opredeljene (unipotentne) ćelije za granulocite ili monocite, bilo u vidu zajedničke prepoznate matične ćelije, mijeloblasta (mijelomonoblasta) (Horowitz i sar., 1972). Drugoj grupi pripadaju B i T-limfociti koji takođe vode poreklo iz kostne srži (Van Furth, 1975) u kojoj postoje multi-limfociti (O-limfociti) iz kojih kasnije postaju B i T-limfociti. Iako im je uloga različita u odbrani organizma, između fagocitne i imunocitne leukocitne loze postoje mnogobrojne veze od kojih je danas najbolje poznata veza između makrofaga i T i B-limfocita u stvaranju obe vrste imuniteta (Mackanes, 1970). Postoje literaturni podaci (Cline i sar., 1974) da T-limfociti stvaraju supstance koje stimulišu razmnožavanje i diferentovanje matičnih ćelija eritrocitopoeze i granulocitopoeze. Osim toga, nedavna ispitivanja (Richman i sar., 1978) su utvrdila da se opredeljene ćelije za granulocitopoezu u ljudskoj perifernoj krvi nalaze među već spomenutim nultim-limfocitima.

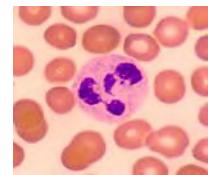
Prema poreklu, obliku jedra i izgledu citoplazme leukociti su svrstani u 3 populacije:

- 1) polimorfonuklearni leukociti (granulociti) koji se mogu podeliti na tri podpopulacije:
  - neutrofilni granulociti (granule se boje neutralnim bojama)
  - eozofilni granulociti (granule se boje kiselim bojama)
  - bazofilni granulociti (granule se boje baznim bojama)
- 2) populacije monocita
- 3) populacija limfocita.

Osnovno obeležje granulocita je segmentiranost jedra i prisustvo specifičnih granula koje sadrže aktivne materije. Sve vrste leukocita zajednički doprinose odbrani organizma. Leukopoeza predstavlja proces formiranja različitih formi leukocita diferencijacijom pluripotentne matične ćelije koštane srži, pod uticajem interleukina (IL) i kolonija stimulirajućih faktora (engl. colony-stimulating factors – CSF).

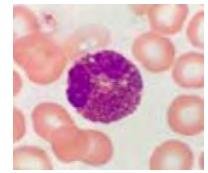
#### **2.4.2.1. Neutrofilni granulociti**

Neutrofili (NEU) su najzastupljeniji fagocitni leukociti, ima ih oko 60%, sitni su i sadrže niz enzima koji učestvuju u razgradnji fagocitovanih ćelija kao npr. amilaza, katalaza, nukleaza i drugi. Jedro zrelih granulocita ima grub, kondenzovan hromatin koji ima purpurnu boju. Citoplazma ima bledo ružičastu boju, a u njoj se nalaze vrlo fine sekundarne granule koje su ponekad toliko sitne da daju citoplazmi samo izgled zamućenog stakla. Za neutrofilne granulocite, naročito za segmentovane oblike, vrlo je karakteristična velika pokretljivost.



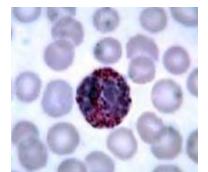
Neutrofilni granulociti imaju dve glavne uloge: zaštitu domaćina protiv infekcija, naročito piogenim bakterijama, fagocitozom i varenjem tih mikroorganizama kao i oslobođanje raznih supstanci u njihovu okolinu (sekretorna uloga neutrofilnih granulocita).

#### **2.4.2.2. Eozinofilni granulocit**



Eozinofili (EOS) je okrugla ili lako ovalna ćelija, koja ima prečnik između 12 i 17 $\mu\text{m}$ . Njegovo jedro ima skoro uvek dva segmenta, tako da liči na bisage, a velike, refraktilne narandžaste granule zauzimaju celu površinu citoplazme. Eozinofilni granulociti sadrže histamin i na taj način učestvuju u obrani organizma od alergijskih agenasa i parazitarnih infekcija. Oni se povećavaju u raznim parazitarnim bolestima, alergijskim stanjima, kao i u nekim sistemskim bolestima (sistemska vaskulitis, poliartritis). Izgleda da u tim sindromima izazivači eozinofilije mogu biti T limfociti (Basten i sar., 1970). Manje su pokretni od neutrofila. Normalne vrednosti su 0 - 6%.

#### **2.4.2.3. Bazofilni granulociti**

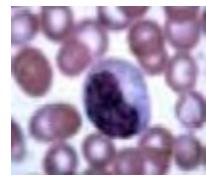


Bazofili (BASO) su najmanje zastupljena populacija leukocita u perifernoj krvi. Bazofilni granulociti odlikuju se prisustvom vrlo grubih granula, koje pokazuju metahromaziju, zbog prisustva u njima kiselih mukopolisaharida. Ove granule vrlo često potpuno prekrivaju jedro koje i u ovih ćelija ima skoro uvek samo dva segmenta. Granule sadrže velike količine heparina, ili njemu sličnih jedinjenja (Martin i sar., 1961) i histamine (Zucker-Franklin i sar., 1968). Bazofilni granulociti su slabo pokretni. Uloga bazofilnih granulocita u reakcijama rane preosetljivosti je dokazana činjenicom da su bazofilni granulociti glavni izvor histamina u krvi, jedinjenja koje aktivno učestvuje u alergijskim reakcijama. Histamin u zrncima bazofilnih granulocita izgleda da je vezan za

heparin koji se nalazi u velikim količinama u bazofilnim granulama. Normalne vrednosti bazofilnih granulocita su 0-1%.

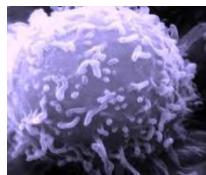
#### 2.4.2.4. Monociti

Monociti (MONO) zajedno sa neutrofilnim granulocitima čine osnovu fagocitnog odbrambenog sistema u organizmu. Promer im je 10 – 24 mikrometra. Jedro monocita je veliko i obično ekcentrično položeno. Ono najčešće ima bubrežast izgled, ali može biti i nepravilno, izgleda slova E, na primer, a ponekad i okruglo. U jedru postoji hromatin u vidu finijih vlakana, koja ponekad, imaju izgled "očešljane kose" (Bernad i sar., 1958). Citoplazma ćelije boji se sivkastoplavo i sadrži veliki broj sitnih zrnaca.



Tri glavne uloge monocita su: odbrana organizama od određenih mikroorganizama, uklanjanje ostarelih ili oštećenih ćelija ili njihovih ostataka iz tkiva i učestvovanje u aferentnom delu imunog odgovora. Normalne vrednosti su 1-10% .

#### 2.4.2.5. Limfociti



Limfociti (LY) spadaju u ćelije imunskog sistema. To su jedine ćelije sa specifičnim receptorima za antigene i zato su glavni medijatori stečene imunosti. Iako su limfociti međusobno morfološki slični, oni su različiti po svom poreklu, funkciji i fenotipu i sposobni su za kompleksne aktivnosti i biološke odgovore (Abbas i Lichtman, 2006-2007). Postoje dve osnovne subpopulacije: T limfociti, koji učestvuju u ćelijskom imunitetu i B limfociti koji se transformišu u plazma ćelije koje proizvode antitela i tako učestvuju u humorarnom imunitetu. Normalne vrednosti limfocita su 20-50%. Veličina limfocita je oko 8–12 mikrometara. Imaju veliko okruglo jedro, oskudnu citoplazmu i pokretni su. Funkcija limfocita je stvaranje globulina, a imaju i važnu ulogu u imunološkoj obrani organizma jer su im antitela pretežno gama-globulini.

#### 2.4.3. Trombociti



Trombociti su krvne pločice koje imaju okrugao, ovalan ili štapičast izgled sa svetloplavom bojom citoplazme. Na periferiji ćelija ima hijalin izgled, dok se u njenom centru nalaze azurofilna zrnca (granule). Prečnik trombocita u razmazima krvi normalnih osoba iznosi 1,5 do  $3\mu\text{m}$ , a zapremina ove ćelije iznosi između 5 i  $6 \mu\text{l}$ .

Ispitivanjem morfologije trombocita elektronskim mikrooskopom otkrila se njihova složena građa, sastavljena iz sistema opni, granula i drugih organeli, kao i sistema mikrovlakana i mikrokanaliča, koji su najbolji dokaz da se u trombocitima odigravaju mnogobrojni fizički i hemijski procesi (Brinkhous i sar., 1967; White, 1970; Hovig, 1968). Ovako posmatrana građa trombocita može se podeliti u tri zone koje su u vezi s određenim ulogama trombocita: periferna zona koja je značajna za adheziju trombocita, sol-gel zona koja igra važnu ulogu u kontrakciji trombocita i zona telašca (organeli) koja učestvuje u lučenju sadržaja trombocita. Trombociti imaju skoro sve ćelijske sastojke izuzev, zbog nedostatka jedra, DNK (Karpatkin i sar., 1972; Karpatkin i sar., 1977). Hemijski sastav trombocita čini voda (oko 77%), belančevine (oko 60%), lipidi (oko 15%) i ugljeni hidrati (oko 8%).

Prema novim literaturnim podacima trombociti su, zahvaljujući prisustvu u njima više od 80 enzima, ćelije u kojima se vrše mnogobrojne sintezne reakcije, stvara velika količina energije i koje imaju sposobnost za kontrakcije (Wintrobe i sar., 1974; Löhr i sar., 1968; Schneider i sar., 1975). Trombociti se vrlo brzo raspadaju, tako da im život traje relativno kratko (od 3 do 5 dana). Normlane vrednosti su  $140\text{--}450 \times 10^9/\text{l}$ . Morfološke osobine trombocita mogu se pratiti na osnovu dva indeksa koji se dobijaju elektronskim posmatranjem određenog volumena krvi u brojaču, a to su: **PDW** (Raspodela trombocita po volumenu) normalne vrednosti 16-25% i **MPV** (Prosečni volumen trombocita) normalne vrednosti 7,80-12 fl.

## 2.5. Endonukleaze

Aptotoza je fiziološki oblik čelijske smrti kojim se zdravlje organizma održava selektivnom eliminacijom suvišnih i nekvalitetnih čelija. Aptotoza ili drugačije nazvana programirana čelijska smrt predstavlja fiziološki kontrolisanu razgradnju čelija pri kojoj se uklanjuju čelije koje su u višku (embriogeneza), čelije koje su obavile svoju funkciju (čelije imunog sistema) i ostarele čelije (epitelne čelije). To je biološki mehanizam eliminacije u čeliji zastupljen u mnogim fiziološkim procesima kao što su npr. metamorfoza i regresija tumora (Bellamy i sar., 1995). Programiranu čelijsku smrt karakteriše fragmentacija odnosno stvaranje apoptočnih telašca koja sadrže intaktne citoplazmatske organele i fragmente jedra. U procesu aptoteze mogu učestvovati mnogi signalni putevi. U osnovi, bez obzira na početni stimulus, postoje dva mehanizma indukcije aptoteze:

- pozitivna indukcija nakon vezivanja liganda za membranske aporeceptore i
- negativna indukcija zbog prestanka supresije (Thornberry i sar., 1998).

Kao strogo regulisana čelijska smrt dešava se tokom embrionalnog razvića, tokom ţivota u fiziološkim i patološkim procesima. Enzimi uključeni u proces aptoteze su kaspaze, endonukleaze i transglutaminaze.

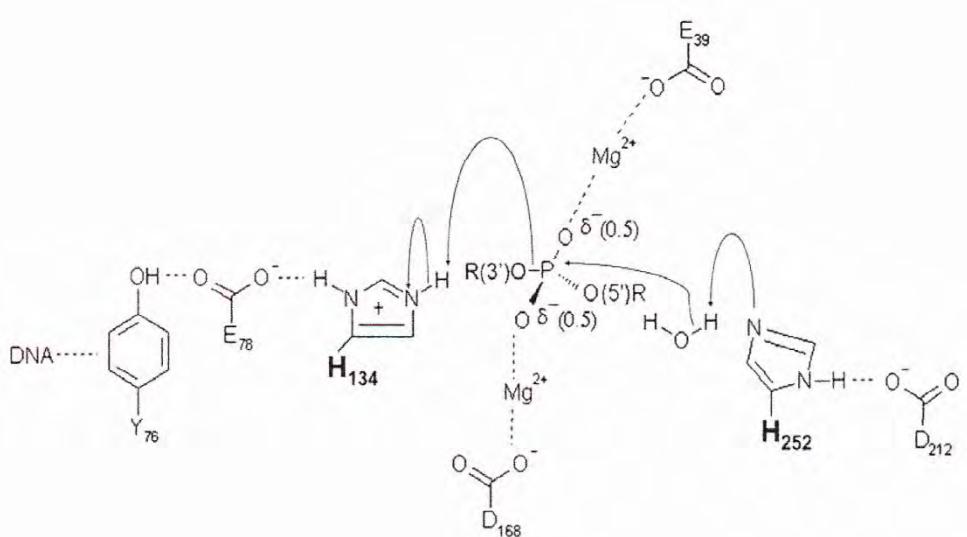
Enzimi odgovorni za internukleozomalnu razgradnju DNK ili RNK u aptozi su endonukleaze (Kocić i sar., 2003). Endonukleaze katalizuju razgradnju međunukleotidnih veza istovremeno na više mesta unutar molekula nukleinske kiseline. Zavisno od nukleinske kiseline, prema kojoj ispoljavaju specifično dejstvo, ovi enzimi se dele na:

- Dezoksiribonukleaze (desoxyribonuclease, DNaze EC 3.1.4.5) koje ispoljavaju specifično dejstvo na DNK i
- Ribonukleaze (ribonuclease, RNaze, EC 2.7.7.16) koje deluju na RNK.

### 2.5.1. Deoksiribonukleaze (DNaze)

Dezoksiribonukleaze (DNaze) su enzimi koji hidrolizuju dezoksiribonukleinsku kiselinu. One pripadaju klasi hidrolaza, u grupi fosfataza i razlažu, kako nativne, tako i denaturisane molekule DNK. Prisutne su u čelijama ţivotinja, biljaka i mikroorganizama (osim određenih virusa). DNaze se uglavnom nalaze u lizozomima u čeliji.

DNaze su pogodni enzimi za uklanjanje genomske DNK iz ćelije. O DNazama se govori kao o glavnim egzekutorima apoptoze, odgovornim za internukleozomalnu fragmentaciju DNK ćelije u apoptozi. Internukleozomalna DNK fragmentacija, kao biohemski marker apoptoze, je razlaganje hromozomske DNK na fragmente veličine oligonukleozoma (Wyllie, 1980).



**Sika 2.13.** Šematski prikaz fragmenta molekula DNaze (Chen, 2007)

Postoje:

- dezoksiribonukleaze I (nazvane DNaze I tj. alkalna DNaza) i
- dezoksiribonukleaze II (DNaze II tj. kisela DNaza).

Ranije studije govore da fragmentacija DNK u apoptozi je katalizovana od strane Ca/Mg-zavisnih endonukleaze (Wyllie, 1980). Uprkos nekoliko pokušaja da se izoluje enzim (Nikonova i sar., 1989; Stratling i sar., 1984), endonukleaze, odgovorne za DNK razlaganje tokom apoptoze, nisu još uvek definitivno identifikovane, već postoji nekoliko mogućih predloga istih (Peitsch i sar., 1993; Compton i Cidlowski, 1987; Barry i Eastman, 1993), koje se razlikuju po tkivnoj distribuciji, jonskoj zavisnosti i optimalnoj pH (Hughes i sar., 1994; Peitsch i sar., 1994).

Do sada je utvrđeno da dezoksiribonukleaza I (DNaza I) od kojih je najpoznatija Ca/Mg-zavisa endonukleaza na optimalnom pH 7,4 koja produkuje 3' OH DNK krajeve je uključena u fragmentaciju DNK u toku ćelijske smrti (Lacks, 1981), (Polzar i sar., 1993). Dezoksiribonukleaza I (DNaza I, EC 3.1.21.1) je prvi put izolovana iz pankreasa juneta u

kristalnoj formi (Kunitz, 1940). DNaza I je glikolizirani polipeptid koji hidrolizuje jedan ili oba lanca DNK pri čemu nastaju 5'-fosfo-tri/tetra-oligonukleotidi (Moore, 1981). U *in vivo* istraživanjima pokazano je da je prisustvo DNaza I veoma izraženo u bubrežima, naročito nakon ishemije i reperfuzije uzrokovane povredom ovog organa (Basnakian i sar., 2004). Ovaj enzim se smatra i digestivnim enzimom, jer se kod sisara stvara u pankreasu i parotidnoj šlezdi, ali i u hipofizi. Lokalizacija DNaze I u ćeliji je najčešće u jedru i organelama ćelije, mada se može naći i ekstracelularno npr. u serumu i urinu, naročito kad su u pitanju neki poremećaji i bolesti u organizmu. Glavna uloga DNaze I je u degradaciji hromatina u apoptozi, depolimerizaciji cirkulišuće DNK i u stimulaciji sinteze nove DNK.

Humana DNaza I sadrži u strukturi 2 molekula cisteina (Cys173 i Cys209) preko kojih se formira disulfidna veza koja omogućava stabilnost molekula. U aktivnom centru nalaze se ostaci dva histidina, glutaminske kiseline i asparaginske kiseline (Shak i sar., 1990; Pan i sar., 1998; Ulmer i sar., 1996). Za aktivnost iste su važni i Arg41 i Tyr76 koji omogućavaju kontakt DNaze I i DNK (Kish i sar., 2001), (Slika 2.13.). Osobine DNaze I mogu biti modifikovane uz pomoć dvovalentnih jona kao npr. Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ili Zn<sup>2+</sup>jona kao i u prisustvu jona dvovalentnih prelaznih metala kao što su Mn<sup>2+</sup> ili Co<sup>2+</sup> (Campbelli i sar., 1980). Jednovalentni joni (Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>) smanjuju aktivnost DNaze (Melgar i sar., 1968), dok je kalcijum neophodan za normalnu aktivnost i održavanje strukture ovih enzima (Moore i sar., 1981). DNaza I se inaktivira grejanjem na 65°C za 10 minuta.

Pre više od 50 godina otkrivena je i DNaza II ili kisela DNaza, pored DNaze I. Dezoksiribonukleaza II kod sisara je endonukleaza koja funkcioniše u optimalnoj kiseloj sredini i uz odsustvo dvovalentnih katjona (Allfrey i sar., 1952; Gordonier i sar., 1968). Na ćelijskom nivou ovaj enzim se nalazi u lizozomima sa osnovnom funkcijom degradacijom egzogenih DNK sa kojom se sreću tokom procesa fagocitoze i apoptoze ćelije (Bernardi, 1971; Liao i sar., 1989). Takođe je potvrđeno da se DNaza II u kiselim lizozomima može naći i u stanjima nekroze (Bortner i sar., 1995).

DNaza II se aktivira u mnogim ćelijama za vreme njihove programirane ćelijske smrti. U toku istraživanja na ćelijama ovarijuma kineskih hrčkova pokazano je da je nuklearna DNaza II uključena u apoptozu ćelije (Barry i sar., 1993).

DNaza II (EC 3.1.22.1, dezoksiribonukleaza 3'-oligonukleotida hidrolaza) u kiseloj sredini stvara 3'-oligonukleotide. To je jedna od najranije identifikovanih nukleaza (Catcheside i Holmes, 1947). Enzim može da se stvara u dva oblika. Jedan je sekretorni protein od 360-amino kiselina koji ima 3 dela: signalni peptid od 16 aminokiselina, propeptid

od 91 aminokiseline i region zrelog proteina od 253-aminokiseline (Yasuda i sar., 1998). Drugi oblik se naziva L-DNaza II, i predstavlja intraćelijski protein koji ima dvostruku enzimsku aktivnost: u nativnoj formi deluje kao anti-proteaza, a nakon potranslacione modifikacije postaje nukleaza (Counis i Torriglia, 2000). Pokazano je da različita tkiva i vrste imaju enzime koji se razlikuju strukturno i po hemijskim osobinama.

Funkcija DNaze II kao endonukleaze bez specifičnosti prema sekvenci u svom delovanju (Waldschmidt i sar., 1964; Takanishi i sar., 1994), ostvaruje se kroz tri faze. Inicijalna faza se karakteriše indukcijom višestrukih jednolančanih prekida u predelu fosfodiesterске kičme. Srednja faza se karakteriše stvaranjem kiselih-rastvorljivih nukleotida i oslobađanjem oligonukleotida veličine oko 1000 bp ili manje. Terminalna faza se sastoji iz sporijeg, ne-linearnog hiperhromnog pomeranja zbog dalje redukcije veličine oligonukleotida. Na osnovu detaljnijeg ispitivanja degradacionih produkata moguće je zaključiti ključno mesto na koje deluje DNaza II, a kojeg čine AGAGGA (Evans, 2002). Mehanizam delovanja ovog enzima se razlikuje od DNaze I po tome što delujući na DNK odmah daje parni i simetrični raskid u oba lanca, što dovodi do brteg razlaganja ovog makromolekula.



### **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 endonukleaza i sekundarnog produkta lipidne peroksidacije na belim pacovima Wistar soja.

Eksperimentalni rad obuhvatio je sledeće faze:

- "in vitro" ispitivanja intoksikacije teškim metalima (Pb, Cd i Cu) sa komercijalnim preparatima (enzimi alkalna i kisela DNaza tj. DNaza I i II),
- *in vivo* ispitivanja tj. gajenje eksperimentalnih ćivotinja i njihova hronična intoksikacija u određenim vremenskim intervalima u periodu od 3 nedelje,
- merenja standardnih hematoloških parametara na automatskom analizatoru na Klinici za nefrologiju, Kliničkog centra u Nišu, po proceduri koja se oficijalno primenjuje u biohemiskim laboratorijama,
- 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 kisele DNaze po metodi Bartholeyns i sar., a stvoreni "kiselisolvabilni nukleotidi" mereni su spektrofotometrijski,
- meranje aktivnosti alkalne DNaze po metodi Bartholeyns i sar., a stvoreni "kiselisolvabilni nukleotidi" mereni su spektrofotometrijski,
- merenje sadržaja proteina u tkivima unutrašnjih organa po metodi Lowrey-a i sar., spektrofotometrijski,
- merenje sadržaja toksičnih metala u homogenatima tkiva metodom potenciometrijske striping analize (PSA),
- praćenje lipidne peroksidacije u uslovima hronične intoksikacije teškim metalima merenjem vrednosti malondialdehida (MDA-sekundarnog produkta lipidne peroksidacije) spektrofotometrijskom metodom po Andreevoj i sar., koja je bazirana na reakciji MDA sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i

Dobijeni rezultati istraživanja omogućavaju da se detaljnije objasne toksični efekti intoksikacije teškim metalima (Pb, Cd i Cu) preko aktivnosti enzima endonukleaza, koji se

smatraju ključnim egzekutorima apoptoze ćelije, i protektivna uloga suplemenata S-donor liganda (mekih Lewiss-ovih baza) koje stupaju u interakcije sa jonima metala, mekih Lewiss-ovih kiselina.

## **3.2. Eksperimentalni postupak**

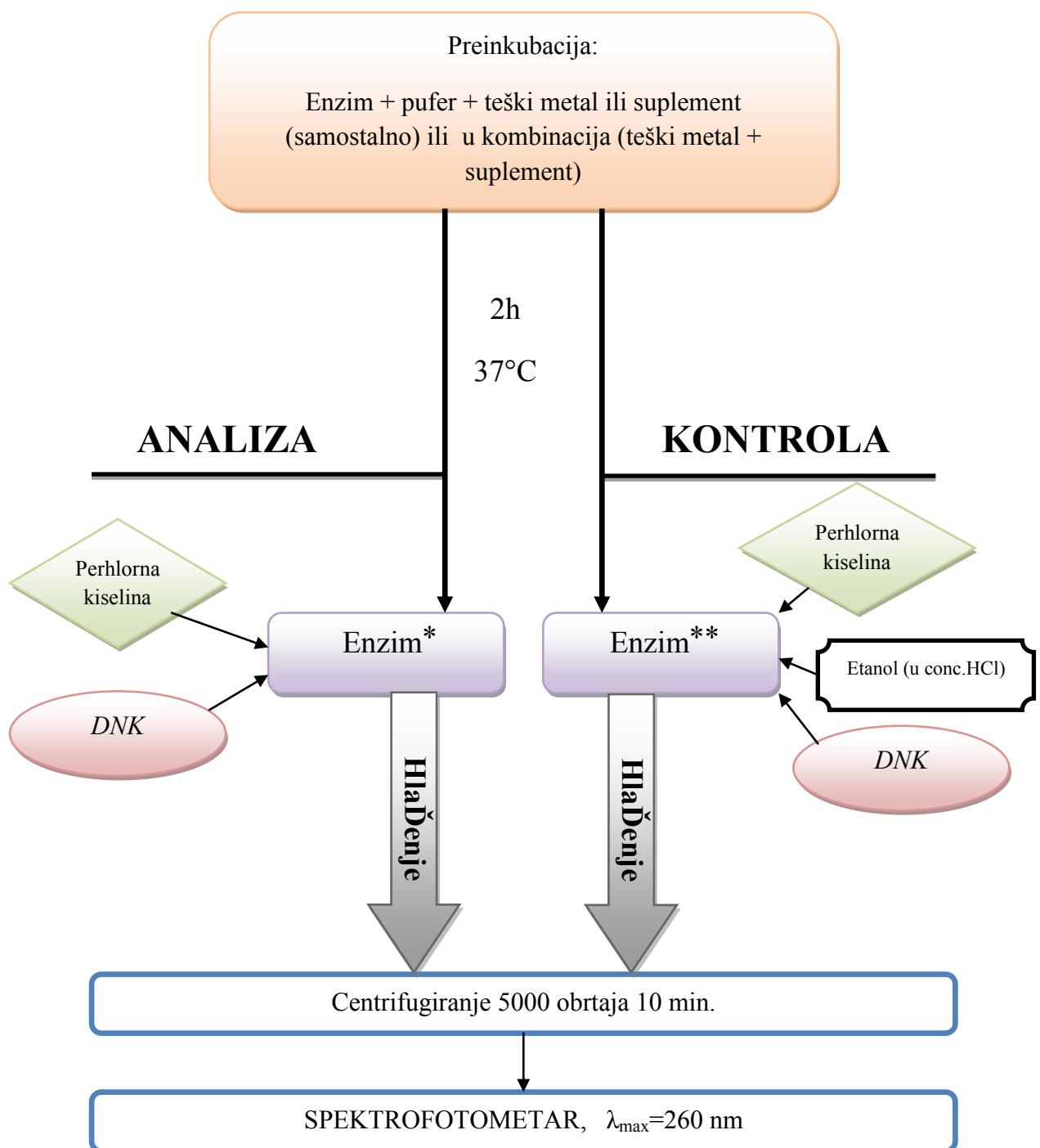
### **3.2.1. *In vitro* ispitivanja**

*In vitro* ispitivanaja spadaju u grupu pretkliničkih ispitivanja zajedno sa *in vivo* ispitivanjima na tivotnjama, koja prethode *in vivo* istraživanjima na čoveku tj. kliničkim ispitivanjima. *In vitro* ispitivanja predstavljaju zamenu tivotinskih modela i jasne su smernice za pretkliničke studije na tivotnjama. U *in vitro* ispitivanjima koriste se prečišćeni enzimi, u ovom studiji to su DNaze I i II tj. alkalna i kisela DNaza kao komercijalni čisti enzimi.

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 reperkuje 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 alkalne i kisele DNaze *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, zakišljeni etanol i 0,1% rastvoru DNK i centrifugirano 10 minuta na 5000 o/min na +40°C. Merenja su vršena na spektrofotometru Beckman DU 530 ( $\lambda_{\text{max}}=260 \text{ nm}$ ). Šema postupka određivanja alkalne i kisele DNaze *in vitro* prikazana je na slici 3.1.



**Slika 3.1.** Šematski prikaz *in vitro* postupka za određivanje aktivnosti alkalne i kisele DNaze

### **3.2.2 *In vivo* ispitivanja**

Model sistem za ispitivanje uticaja izloženosti kadmijumu, olovu i bakru bila je studija na belim (albino) Wistar pacovima tropskog pola, starosti 2 meseca, prosečne težine 200-300 grama. Šivotinje su čuvane u grupama u metalnim kavezima ( $55 \times 35 \times 30\text{cm}$ ) 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 šivotinje 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 šivotinja. Grupa I (kontrolna grupa) je bila na normalnom režimu ishrane i šivota. Grupe šivotinja II, III i IV 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  $\text{CdCl}_2$ . Grupe V, VI, VII, VIII, IX i X su uz bakar(II)-sulfat, odnosno olovo(II)-acetat, ili kadmijum(II)-hlorid dobijale i odgovarajući suplemente  $\alpha$ -liponsku kiselinu odnosno glutataion. Grupa šivotinja XI je uz normalnu ishranu dobijala suplement  $\alpha$ -liponsku kiselinu. Grupa XII je uz normalan režim ishrane dobijala suplement glutation. Pri eksperimentalnom radu u potpunosti je poštovan Etički kodeks naučnoistraživačkog rada Medicinskog fakulteta u Nišu.

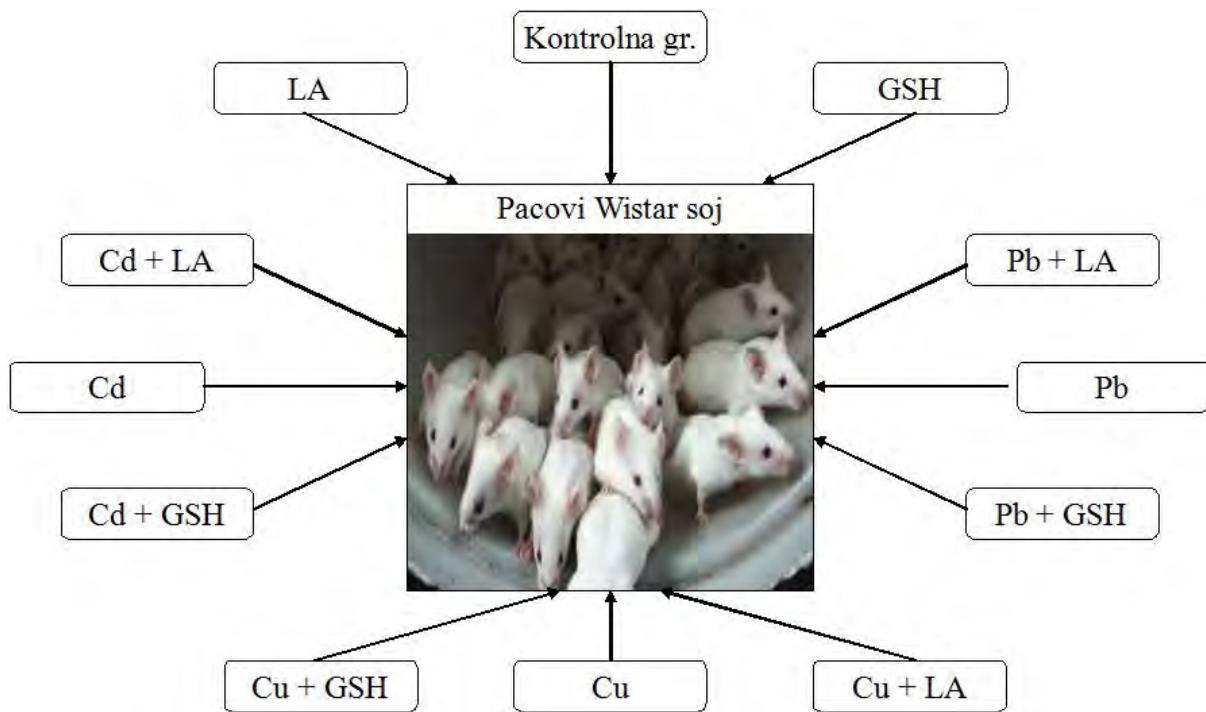
### **3.2.3. Intoksikacija teškim metalima i dodatak suplemenata**

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

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

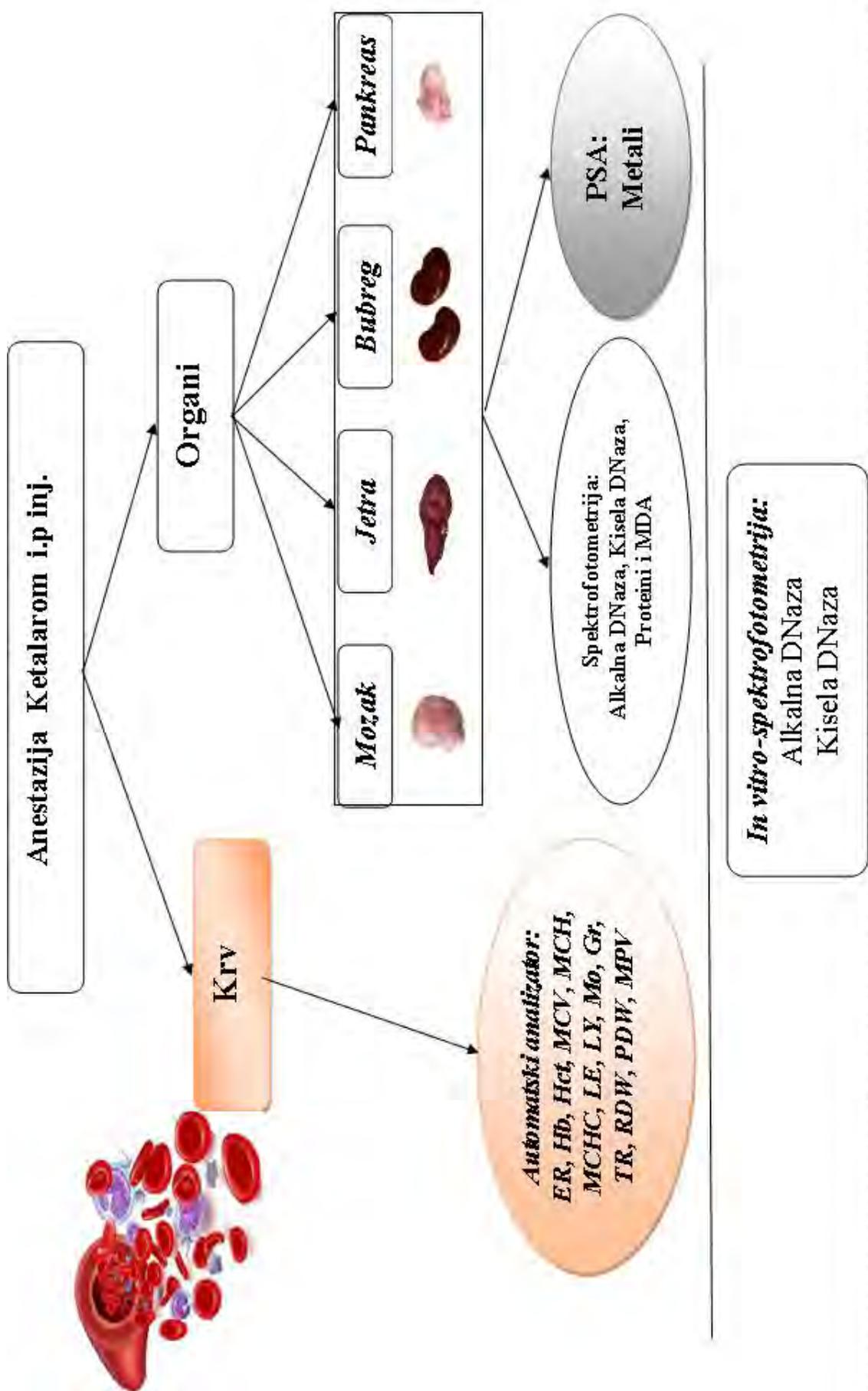
Intoksikacija kadmijumom izvedena je za 5 dana u dve doze s.c. injekcijama od po 0,9 mg kadmijum(II)-hlorida u fiziološkom rastvoru po šivotinji (Deepti i sar., 2010).

Suplementi liponska kiselina, odnosno glutation su dozirani i.p. injekcijom u ukupnoj dozi od 2,4 mg, odnosno 4 mg u fiziološkom rastvoru po šivotinji (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 3.2.** Šematski prikaz intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb i Cu) i davanje suplemenata (LA i GSH) pacovima Wistar soja parenteralnim putem

Sve procedure su obavljene nakon anestezije pacova ketalarom (35 mg/kg telesne mase) u skladu sa principima tretovanja u laboratorijama. Uzorci krvi dobijeni su iz abdominalne aorte heparinizovanim špricem za određivanje hematoloških parametra. Nakon tretovanja tivotinjama 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  $-20^{\circ}\text{C}$  i kasnije korišćeni za pravljenje homogenata. Homogenizovanje je vršeno na ledu teflonskim tučkom K Ultra Turrax® IKA® T18 basic homogenizera (slika 3.4.) 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 kisele i alkalne DNaze, vrednost ukupnih proteina i koncentracija malondialdehida (Kocić i sar., 2004; Kocić i sar., 1998). Biohemski reagensi su bili spektroskopske čistoće proizvođača Sigma–Aldrich.



Slika 3.3. Šematski prikaz *in vivo* i *in vitro* ispitivanja

### **3.3. 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, teludačni 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 (ICPOES) i potenciometrijskom striping analizom (PSA). Hematološki parametri se određuju na automatskom analizatoru. Za merenje enzimske aktivnosti i slična biohemijkska ispitivanja primenjuje se spektrofotometrija, HPLC, masena spektrometrija (Nikolić i sar., 2004; Poleć-Pawlak i sar., 2007; Kaličanin i sar., 2011).

#### **3.3.1. Određivanje hematoloških parametara**

Hematološki parametri eritrociti (ER), hemoglobin (Hb), hematokrit (Hct), pojedine vrste leukocita (LE) i trombociti (TR), kao i njihovi parametri su mereni na automatskom analizatoru na Klinici za nefrologiju, Kliničkog centra u Nišu po proceduri koja se oficijalno primenjuje u biohemijskim laboratorijama.

#### **3.3.2. Praćenje enzimske aktivnosti i određivanje vrednosti proteina**

Za određivanje aktivnosti kisele i alkalne DNaze u tkivima jetre, bubrega, pankreasa i mozga korišćen je 10% homogenat spremlijen u odgovarajućem puferu, zakišljenom etanolu (76% etanol u 1 molarnom rastvoru koncentrovane HCl) i 0,1% rastvoru DNK i centrifugiran 10 minuta na 5000 o/min na +40°C (Kocić i sar., 2004).

Aktivnost kisele i alkalne DNaze praćena je preko stvorenih kiselo-solubilnih nukleotida spektrofotometrijski (Beckman DU 530 spektrofotometar) po metodi Bartholeyns i sar., 1975. god. (Bartholeyns i sar., 1975). Merenja su vršena na spektrofotometru Beckman DU 530 spektrofotometar ( $\lambda=260$  nm).

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 zasniva na 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 absorbanca zavisi samo od koncentracije i apsorptiviteta. Veoma bitno je da se merenja vrše sa najvećom mogućom tačnošću i osetljivošću (Todorović i sar., 1997). Bitan je takođe i izbor talasne dužine na kojoj se merenje vrši. U zavisnosti od uslova merenje apsorbance se vrši:

- a) na talasnoj dužini gde je maksimalna apsorpcija,  $\lambda_{\max}$ ,
- b) na talasnoj dužini optimalne apsorbance,  $\lambda_{\text{opt}}$  i
- c) na talasnoj dužini izobestičke tačke,  $\lambda_{\text{izob.}}$

U ovoj studiji snimanje je vršeno na spektrofotometru Beckman D<sup>®</sup> 530, DNA/Protein Analyzer prikazanom na slici 3.5.

Aktivnost enzima je izražavana u internacionalnim jedinicama na gram proteina (U/g proteina). Definisana jedinica za prečišćenu DNazu I i DNazu II (povećanje apsorbance za 0.001/min u uzorku koji sadrži 0.132 mg DNK (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 7.4 ili pH 5 i 3 ml reakcione miksture). Za merenje količine proteina u homogenatima tkiva (jetre, bubrega, pankreasa i mozga) korišćena je metoda po Lowrey (1951) (Lowrey i sar., 1951; Setaro i sar., 1977).



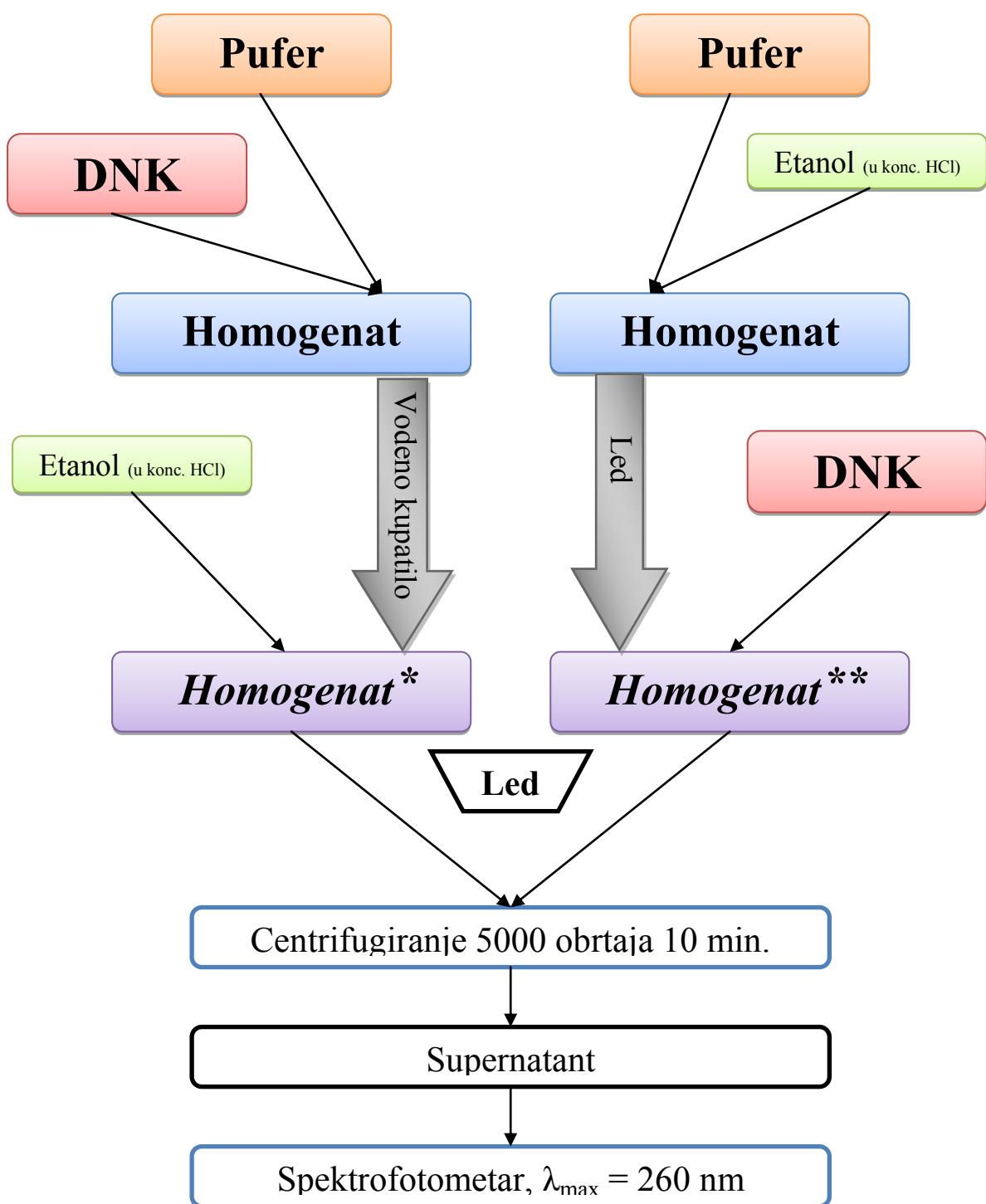
**Slika 3.4.** Homogenizator K Ultra Turrax<sup>®</sup> IKA<sup>®</sup> T18 basic



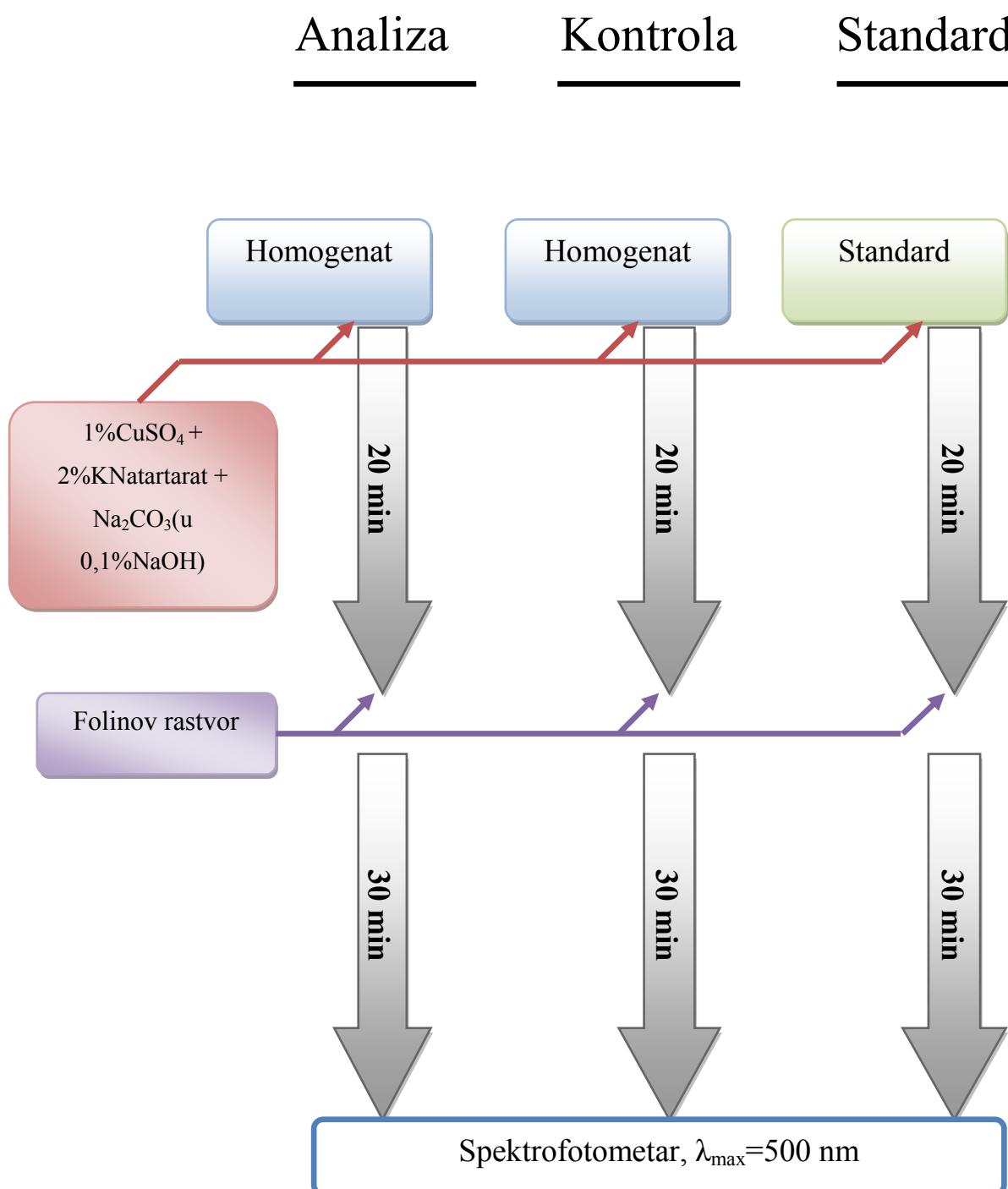
**Slika 3.5.** Spektrofotometar Beckman D<sup>®</sup> 530, DNA/Protein Analyzer

## **ANALIZA**

## **KONTROLA**



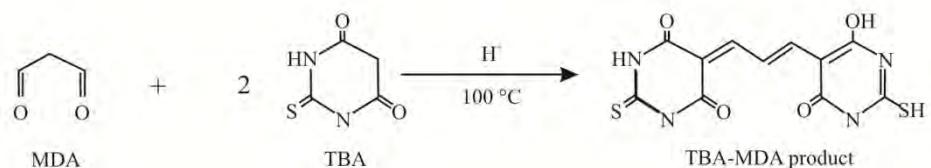
**Slika 3.6.** Šematski prikaz postupka za određivanje alkalne i kisele DNaze



**Slika 3.7.** Šematski prikaz određivanja proteina

### **3.3.3. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u homogenatima tkiva**

Intenzitet lipidne peroksidacije u tkivima predstavljen kao koncentracija TBA regujućih supstanci u homogenatu, određivam 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-TBA<sub>2</sub>), a intenzitet boje se čita na 532 nm (Andreeva i sar., 1988), slika 3.8.



**Slika 3.8.** Reakcija građenja obojenog produkta TBA-MDA (Atasayar i sar., 2004)

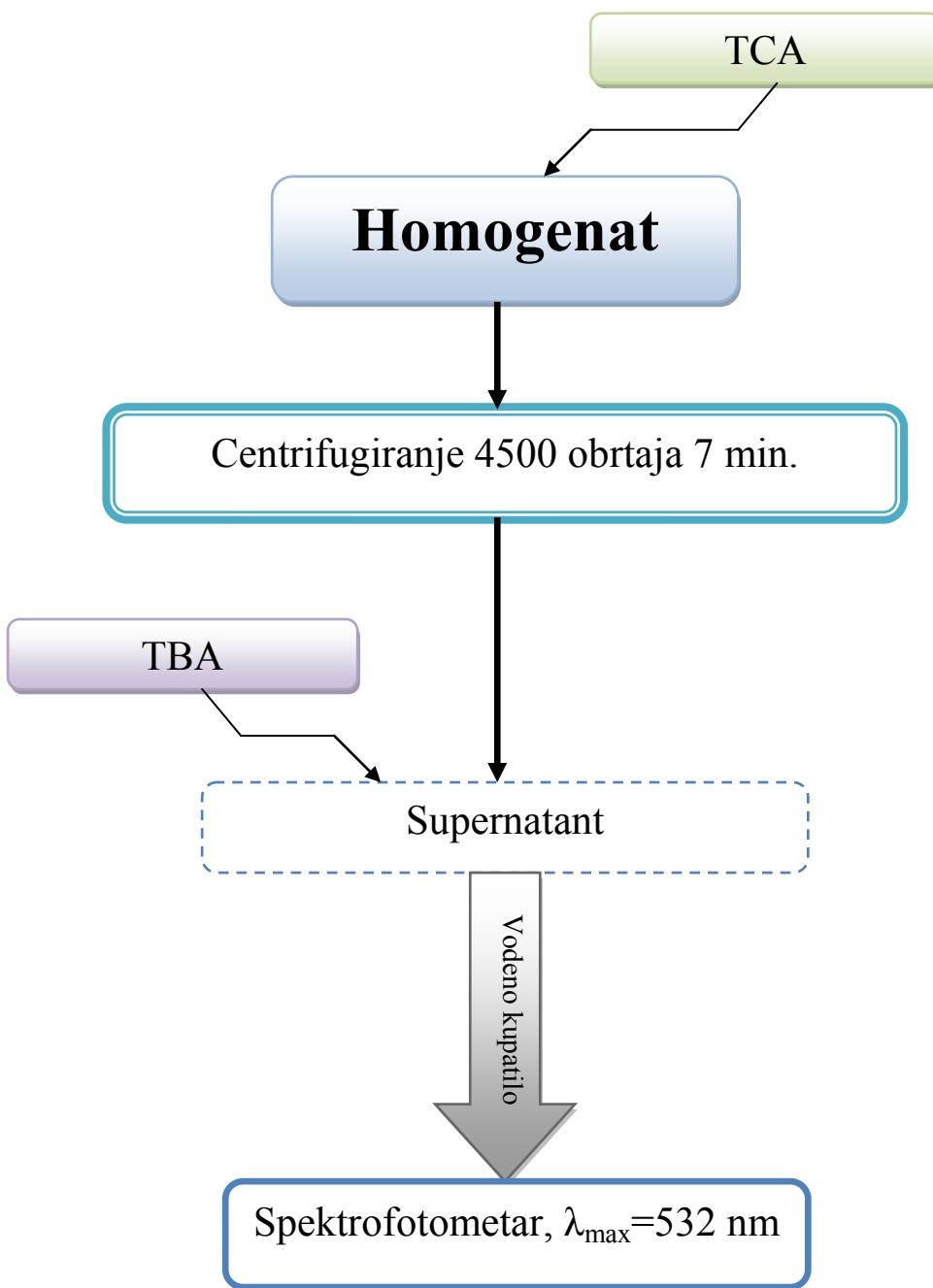
Koncentracija TBARS izračunata je korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta koji iznosi  $1,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  i izražena u  $\mu\text{mol/g}$  proteina (Jain i sar., 1990).

### **3.3.4. Određivanje koncentracija metala u homogenatima tkiva bubrega, mozga, jetre i pankreasa**

Sadržaj toksičnih metala u tkivnim homogenatima određivan je metodom potenciometrijske striping analize (PSA). Mineralizacija homogenata tkiva vršena je nitratnom kiselinom ( $c=6 \text{ mM/dm}^3$ ), potom tretiranjem hlorovodoničnom kiselinom i na kraju rastvaranjem u dvostruko dejonizovanoj vodi. Sadržaj teških metala meren je na potenciometrijskom striping analizatoru (Univerzal Leskovac–TMF Novi Sad) (Nikolić i sar., 2004; Kaličanin i sar., 2011).

## **3.4. 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).



**Slika 3.5.** Šematski prikaz postupka za određivanje MDA



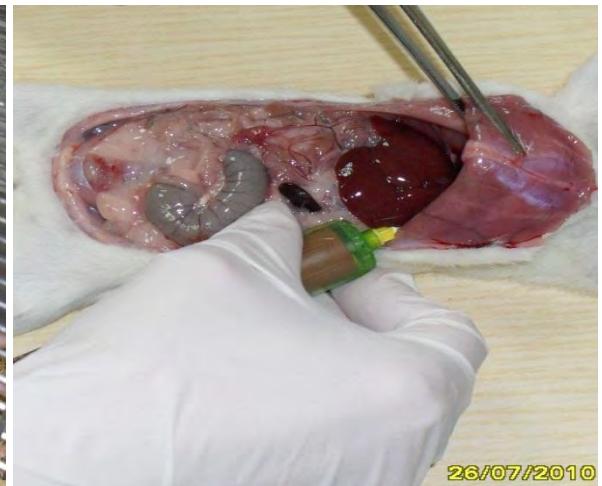
a)



b)



c)



d)



e)



f)

**Slika 3.10.** Pacovi Wistar soja: a,b,c) Gajenje,čuvanje i ishrana;

d) uzimanje krvi za hematološke analize i

e,f) uzimanje pojedinih organa za pravljenje homogenata



## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**



## **4.1. Rezultati aktivnosti alkalne i kisele DNaze u *in vitro* uslovima**

*In vitro* ispitivanja spadaju u grupu pretkliničkih ispitivanja zajedno sa *in vivo* ispitivanjima na tivotnjama, koja prethode *in vivo* istraživanjima na čoveku tj. kliničkim ispitivanjima. *In vitro* ispitivanja predstavljaju zamenu tivotinskih modela i jasne su smernice za pretkliničke studije na tivotnjama.

Jedan od ciljeva ove studije 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 DNaze. *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 (endonukleaza) pod kontrolisanim laboratorijskim uslovima. U *in vitro* ispitivanjima u ovoj studiji sa prečišćenim enzimima DNaze I i II tj. alkalna i kisela DNaze ispitivan je genotoksični i citotoksični uticaj teških metala u slučajevima kada toksična supstanca remeti homeostazu biohemijskih procesa u ćeliji i nije preporučljivo i opravdano primenjivati je *in vivo*. 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 teljeni efekat javiti i u tivom organizmu. U ovoj studiji 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.

Rezultati merenja aktivnosti alkalne i kisele DNaze usled dejstva kadmijuma, olova i bakra kao i protektora ( $\alpha$ -liponske kiseline i glutationa) dati su u tabeli 4.1. i na histogramima 4.1. i 4.2.

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 olovo ispoljavaju inhibitorni efekat na aktivnost mnogih enzima (kao npr. P5Npirimidin-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

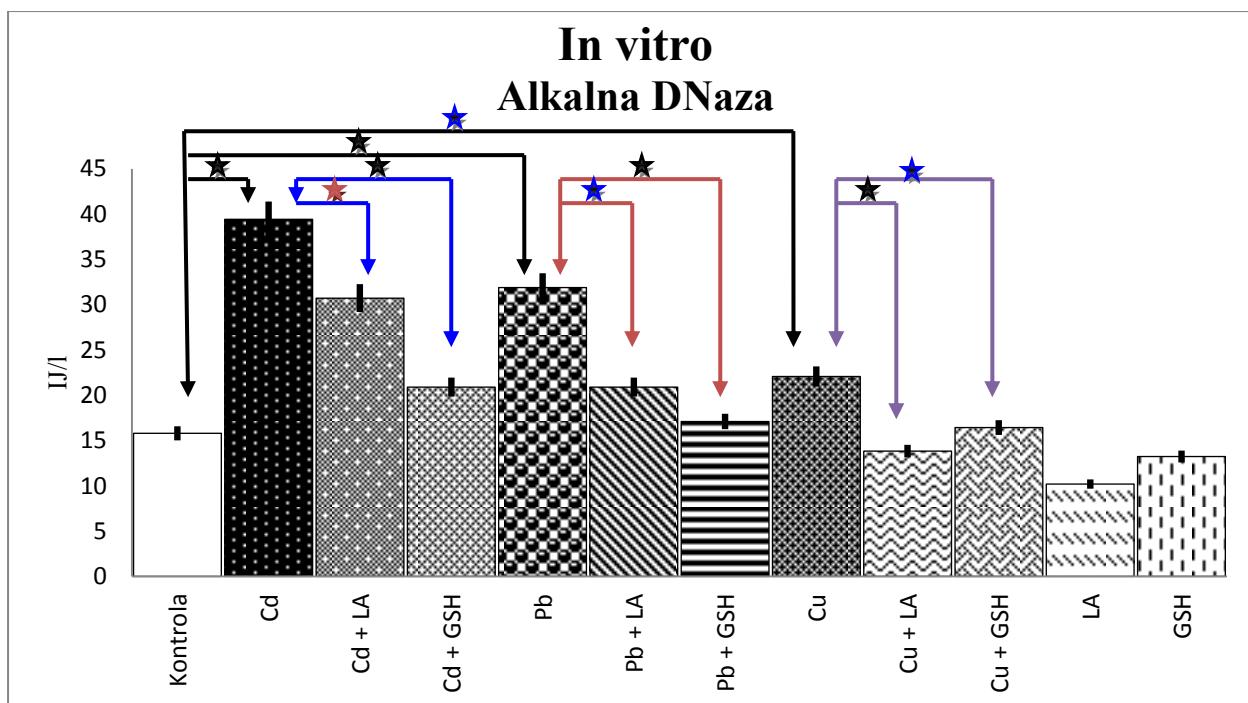
višestruko smanjuje (Mohammed-Brahim i sar., 1984). U ovoj studiji kadmijum povećava aktivnost alkalne i kisele DNaze u *in vitro* uslovima. Razlika u odnosu na *in vivo* ispitivanja je da na animalnim modelima usled intoksikacije kadmijumom dolazi do mogućnosti aktiviranja signalnih puteva i ekspresije gena jer se na taj način ćelije štite od oksidativnog stresa izazvanog ovim teškim metalom.

U *in vitro* uslovima, soli bakra i olova dovode do povećanja aktivnosti alkalne i kisele DNaze tako što dovode do stvaranja slobodnih radikala i oksidativnog stresa. Rezultati ovih ispitivanja pokazuju da se ovo može sprečiti dodavanjem protektora ( $\alpha$ -liponske kiseline ili glutationa).

Antioksidans ( $\alpha$ -liponska kiselina) može umanjiti negativne efekte teških metala (Cd, Pb i Cu) jer verovatno formira sa njima stabilne asocijate tipa kompleksa i time dovodi do smanjenja aktivnosti alkalne i kisele DNaze. Glutation, kao komponenta antioksidativnog sistema i kao metal-helatirajući agens ispoljava protektivnu ulogu i prema rezultatima ovih ispitivanja (tabela 4.1). Glutation smanjuje citotoksičnost u *in vitro* sistemu koja je izazvana dejstvom teških metala (Cd, Pb i Cu). Prema rezultatima ovih ispitivanja registrovan je pozitivan efekat tiol supstanci, –S donor liganada (LA i GSH) na aktivnost DNaza (I i II) pri intoksikaciji toksičnim metalima.

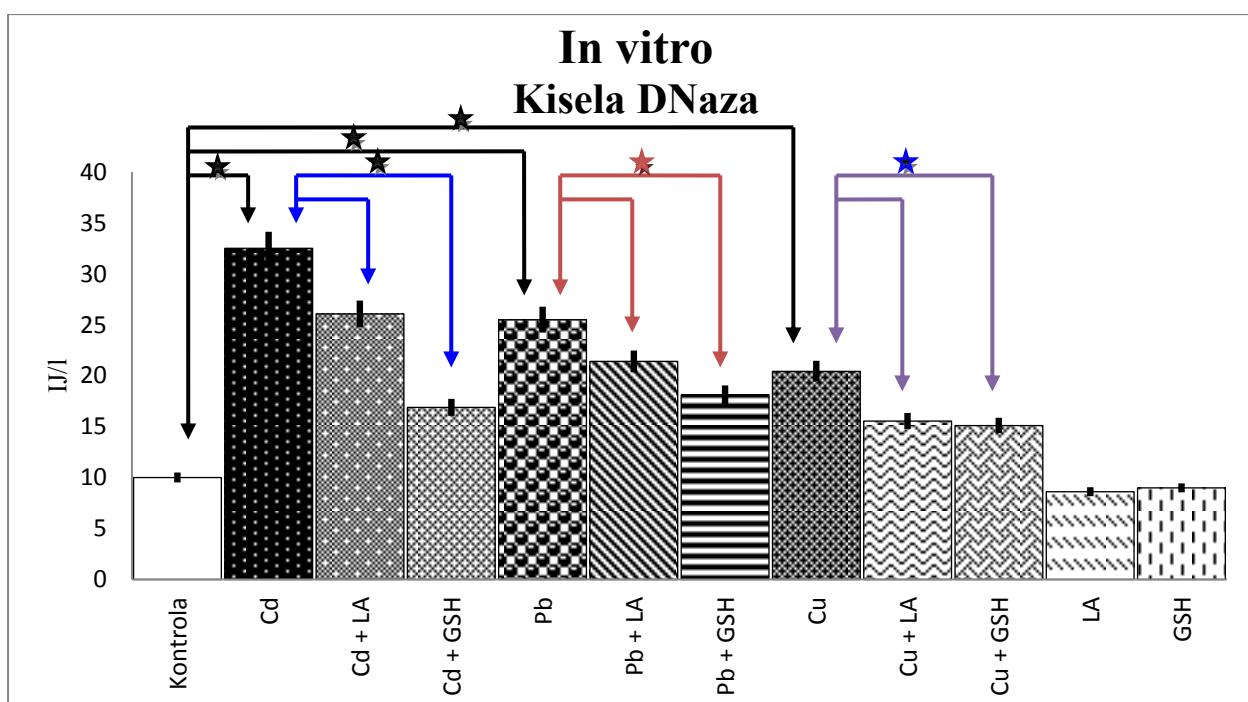
**Tabela 4.1.** Aktivnost alkalne i kisele DNaze u *in vitro* uslovima

Eksperimentalne grupe (n=6)	<b>In vitro ( IJ/l)</b>	
	<i>Alkalna DNaza</i>	<i>Kisela DNaza</i>
Kontrola	15,80 ± 2,30	10,01 ± 4,83
Cd	39,42 ± 3,25	32,50 ± 8,66
Cd + LA	30,72 ± 10,75	26,06 ± 5,28
Cd + GSH	20,90 ± 6,07	16,89 ± 3,34
Pb	31,89 ± 6,04	25,49 ± 6,31
Pb + LA	20,90 ± 6,67	21,41 ± 4,68
Pb + GSH	17,10 ± 4,64	18,12 ± 7,05
Cu	22,07 ± 4,28	20,42 ± 4,06
Cu + LA	13,83 ± 4,41	15,55 ± 8,38
Cu + GSH	16,43 ± 1,92	15,10 ± 2,97
LA	10,20 ± 2,40	8,61 ± 3,34
GSH	13,24 ± 8,73	8,99 ± 5,31



★ = $p \leq 0,01$
● = $p \leq 0,05$
■ = $p \leq 0,1$

Slika 4.1. Aktivnost alkalne DNaze u *in vitro* uslovima



★ = $p \leq 0,01$
● = $p \leq 0,05$
■ = $p \leq 0,1$

Slika 4.2. Aktivnost kisele DNaze u *in vitro* uslovima

## **4.2. Rezultati merenja uticaja teških metala i suplemenata na hematološke parametre**

Hemoglobin je najvažniji hemoprotein u humanom organizmu koji je u eritrocitima. Hemoglobin je globinski tetramer koji se sastoji iz dva para identičnih polipeptidnih lanaca, a svaki polipeptidni lanac u svom Čđepu sadrži prostetičnu grupu hem. Hem je kompleks porfirina i fero oblika gvođa Fe(II). Porfirin koji se nalazi u hemoglobinu je protoporfirin IX. Uloga hemoglobina je da prenosi kiseonik iz pluća do njenih kapilara, iz kojih hemoglobin prelazi u ćelije u kojima se koristi u procesima disanja. Eritrociti nemaju sposobnost sinteze proteina, tako da oni ne poseduju sposobnost da zamene bilo koji protein ili komponentu eritrocitne membrane koja se ošteći i postane nefunkcionalna. Od izuzetne je važnosti za eritrocit da ima sposobnost da spreči ili izvrši ispravku oštećenih esencijalnih molekula kao što su hemoglobin ili membranski lipidi i proteini. Dve su ozbiljne posledice oksidacije hemoglobina: stvoreni methemoglobin nije sposoban da vezuje kiseonik i superoksid-anjon radikal, koji se u tom procesu stvorio, je vrlo reaktiv i on može da oksidiše mnoge biološke molekule, posebno membranske lipide.

MCV je srednja vrednost zapremine eritrocita (referentne vrednosti su 80-97 fL), MCH označava srednju vrednost količine hemoglobina u jednom eritrocitu (26-32 pg) i MCHC je srednja vrednost koncentracije hemoglobina u svim eritrocitima (310-360 g/L). Hematokrit predstavlja zapreminu eritrocita u 100 mL pune krvi, izraženu u procentima. Normalne vrednosti su za žene 0.356–0.470 l/l i kod muškaraca 0.41–0.53 l/l. Normalne vrednosti nivoa hemoglobina za žene su 12,1–15,1 g/dl, a za muškarce 13,8–17,2 g/dl. Ako ukupan hemoglobin padne ispod tačno određene vrednosti nastupa anemija.

Anemija je jedan od glavnih simptoma visoke hronične intoksikacije teškim metalima (Cd i Pb) jer oni inhibiraju brojne enzime koji učestvuju u sintezi hema, a kao rezultat poremećene sinteze hema dolazi do gubitka fragilnost eritrocita i smanjenja njihovog broja u krvi (Piomelli i sar., 1981). Nedavne studije Vargasa i sar., 2003, pokazuju da intoksikacija teškim metalima uzrokuje pretvaranje hemoglobina u met-hemoglobin. Za vreme oksidacije hemoglobina uzrokovane teškim metalima, stvoren vodonik peroksid indukuje lipidnu peroksidaciju na membrani eritrocita (Vargas i sar., 2003).

*Rezultati merenja vrednosti standardnih hematoloških parametara kao i promena istih u uslovima hronične intoksikacije kadmijumom i efekti uticaja suplemenata α-liponske kiseline i glutationa prikazani su u tabeli 4.2.*

Vrlo brzo nakon unošenja kadmijuma u organizam eksperimentalne tivotinje dolazi do značajnih promena koje se manifestuju, između ostalog, promenom vrednosti svih hematoloških parametara. U krvi pacova intoksiranih kadmijumom primećujemo statistički značajan pad broja eritrocita i njegovih parametra (smanjene vrednosti hematokrita i koncentracije hemoglobina) i neznatan porast hematoloških parametara (MCV, MCH i MCHC) u odnosu na kontrolnu grupu, što se može videti iz tabele 4.2. Izloženost kadmijumu dovodi do opadanja broja eritrocita u krvi u odnosu na eksperimentalnu grupu tivotinja koja je bila na normalnom rečimu tivota i ishrane (od  $7,38 \pm 0,34 \times 10^{12}/\text{L}$  do  $5,18 \pm 0,38 \times 10^{12}/\text{L}$ ). Nivo Hb u krvi pacova hronično intoksiranih kadmijumom značajno opada u odnosu na grupu koja je bila na normalnom rečimu tivota i ishrane (od  $140,17 \pm 4,45 \text{ g/L}$  do  $108,83 \pm 5,74 \text{ g/L}$ ). Procenat hematokrita značajno opada kod grupe eksperimentalnih tivotinja koja je hronično intoksirana kadmijumom u odnosu na eksperimentalnu grupu koja je bila na normalnom rečimu tivota i ishrane (od  $40,55 \pm 1,52\%$  na  $29,65 \pm 1,79\%$ ). Ovi rezultati su slični onima koje su dobili Tung i saradnici prateći efekte izloženosti pilića uticaju kadmijum(II)-hlorida (Tung i sar., 1975). Veza dospelog kadmijuma u krv pacova sa eritrocitom dovodi do destrukcije crvenih krvnih zrnaca i povećanja hemolize što se ogleda u smanjenju koncentracije hemoglobina i procenta hematokrita, smanjenoj intestinalnoj apsorpciji gvožđa i pojavu anemije. Ovi pomenuti parametri predstavljaju osetljive indikatore kadmijumove toksičnosti.

Kadmijum uzrokuje oksidativna oštećenja u eritrocitima i u različitim tkivima dovodeći do gubitka funkcije membrane ovih ćelija, pojavu anemije usled smanjenja eritrocita, koncentracije hemoglobina i vrednosti hematokrita, kao i smanjenje gvožđa u krvi (Kostić i sar., 1993).

U ovoj studiji dodavanje suplemenata glutationa, odnosno liponske kiseline dan nakon unošenja kadmijuma, nivo Hb i eritrocita u krvi se skoro približava vrednostima kontrolne grupe tivotinja (eritrociti od  $5,18 \pm 0,38 \times 10^{12}/\text{L}$  na  $6,07 \pm 0,20 \times 10^{12}/\text{L}$  za GSH, odnosno na  $5,49 \pm 0,12 \times 10^{12}/\text{L}$  za LA i hemoglobin od  $108,83 \pm 5,74 \text{ g/L}$  na  $121,17 \pm 2,79 \text{ g/L}$  za GSH, odnosno na  $115,33 \pm 33 \text{ g/L}$  za LA). Iz dobijenih rezultata u tabeli 4.2. zapaženo je i povećanje procenta hematokrita (od  $29,65 \pm 1,79\%$  kod pacova koji su dobijali kadmijum na  $33,65 \pm 1,33\%$  kod pacova koji su pored kadmijuma dobijali i suplement glutation odnosno na

$32,03\pm0,94\%$  kod pacova koji su pored kadmijuma dobijali  $\alpha$ -liponsku kiselinu kao suplement). Kadmijum unet parenteralno veže se za aktivno mesto liponske kiseline i glutationa (-SH) i tako „blokira” i onemogućuje njegovo toksično dejstvo. To može biti osnova pretpostavke da se unošenjem hrane bogate proteinima može smanjiti resorpcija kadmijuma. Prema podacima iz tabele 4.2. i sa slike 4.3. vidi se da je liponska kiselina „dobar protivotrov” kod trovanja kadmijumom.

U ovom studiji vrednosti korpuskularne zapremine eritrocita (MCV) i korpuskularne zapremine hemoglobina (MCH) su neznatno povećane kod tivotinja koji su pored kadmijuma dobijale i neki suplement kao npr. glutation ili  $\alpha$ -liponsku kiselinu u odnosu na grupu tivotinja intoksiciranih kadmijumom (MCV od  $56,78\pm1,80\text{fL}$  na  $58,47\pm1,24\text{fL}$  za GSH odnosno  $58,25\pm0,71\text{fL}$  za LA i MCH od  $20,63\pm0,77\text{Pg}$  na  $22,02\pm0,59\text{Pg}$  za GSH odnosno  $21,18\pm0,37\text{Pg}$  za LA).

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 4.2. u ovoj studiji smanjen je broj granulocita usled akutne intoksikacije kadmijumom u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja (od  $13,03\pm1,56\%$  na  $12,85\pm0,67\%$ ), što je verovatno indukovano migracijom neutrofila u tkiva koja će inhibirati inflamatorni odgovor izazvan kadmijumom. Broj limfocita, kao ćelija humorarnog i ćelijskog imunskog odgovora, je povećan usled akutne intoksikacije kadmijumom u odnosu na eksperimentalnu grupu tivotinja na normalnom režimu tivota i ishrane (od  $65,93\pm2,91\%$  na  $69,32\pm2,06\%$ ). Broj trombocita kod tivotinja intoksiciranih Cd je smanjen u odnosu na kontrolnu grupu ( $1095,17\pm30,91\times10^3/\mu\text{L}$  na  $872,83\pm43,98\times10^3/\mu\text{L}$ ) zbog oksidativnog stresa izazvanog kadmijumom (Ruparelia i sar., 1990).

Aplikovanje nekog od suplemenata (LA ili GSH) u kombinaciji sa kadijumom dovodi do delimičnog smanjenja ili ublažavanja štetnog efekta ovog toksičnog metala. LA i GSH igraju značajnu ulogu kao antioksidansi kod pacova jer poboljšavaju imunitet održavanjem structure i funkcije važnih imunskih ćelija. Tako da se govori o efikasnosti suplemenata u borbi protiv toksičnosti kadmijuma na hematološke parametre, aktivnost enzima i lipidnu peroksidaciju kod pacova. Aplikovanje kadmijuma kod eksperimentalne grupe tivotinja uzrokuje sistemsku inflamatornu reakciju koja se karakteriše leukocitozom, promenama u odnosu pojedinih ćelija krvi i povećanom aktivnošću citokina (Shaikh i sar., 1999).

**Tabela 4.2.** Vrednosti hematoloških parametara eksperimentalne grupe tijovinja intoksicirane kadmijumom i uticaj suplemenata (LA i GSH) dan nakon izlaganja kadmijumu

Hematološki parametri	Kontrola	Cd	Cd + LA	Cd + GSH
ER [ $\times 10^{12}/\text{L}$ ]	$7,38 \pm 0,34$	$5,18 \pm 0,38$	$5,49 \pm 0,12$	$6,07 \pm 0,20$
Hb [g/L]	$140,17 \pm 4,45$	$108,83 \pm 5,74$	$115,33 \pm 1,97$	$121,17 \pm 2,79$
Hct [%]	$40,55 \pm 1,52$	$29,65 \pm 1,79$	$32,03 \pm 0,94$	$33,65 \pm 1,33$
MCV [fL]	$54,45 \pm 0,77$	$56,78 \pm 1,80$	$58,25 \pm 0,71$	$58,47 \pm 1,24$
MCH [Pg]	$19,00 \pm 0,31$	$20,63 \pm 0,77$	$21,18 \pm 0,37$	$22,02 \pm 0,59$
MCHC [g/L]	$345,17 \pm 3,71$	$366,33 \pm 3,14$	$364,17 \pm 4,66$	$364,83 \pm 2,40$
LE [ $\times 10^9/\text{L}$ ]	$2,53 \pm 0,37$	$5,40 \pm 0,32$	$5,58 \pm 0,47$	$6,42 \pm 0,22$
LY [%]	$65,93 \pm 2,91$	$69,32 \pm 2,06$	$66,40 \pm 2,45$	$66,33 \pm 2,12$
MO [%]	$21,73 \pm 1,42$	$18,13 \pm 0,53$	$30,02 \pm 1,75$	$24,79 \pm 1,22$
GR [%]	$13,03 \pm 1,56$	$12,85 \pm 0,67$	$17,22 \pm 1,19$	$19,35 \pm 1,11$
TR [ $\times 10^3/\mu\text{L}$ ]	$1095,17 \pm 30,91$	$872,83 \pm 43,98$	$1009,00 \pm 17,90$	$938,67 \pm 11,31$
RDW [%CV]	$15,03 \pm 0,56$	$15,13 \pm 1,38$	$16,53 \pm 0,77$	$18,35 \pm 0,77$
PDW [%]	$15,50 \pm 0,69$	$15,60 \pm 0,62$	$15,48 \pm 0,61$	$15,78 \pm 0,21$
MPV [fL]	$2,80 \pm 0,31$	$2,35 \pm 0,27$	$2,23 \pm 0,17$	$1,90 \pm 0,14$

Rezultati merenja vrednosti standardnih hematoloških parametara kao i promena istih u uslovima hronične intoksikacije olovom i efekti uticaja suplemenata  $\alpha$ -liponske kiseline i glutationa prikazani su u tabeli 4.3.

Nivo olova u krvi je pogodan i direktni pokazatelj njegove toksičnosti. Trovanje olovom dovodi do signifikantnog poremećaja na nivou hematoloških parametara, jer olovo inhibira pojedine faze u sintezi hema, tako da se hematološki efekti uticaja ovog metala mogu uočiti u smanjenom broju eritrocita, količini hemoglobina, procentu hematokrita i vrednosti MCV i

MCH. Literaturni podaci ukazuju da je kod izloženosti zečeva olovu značajno smanjen broj crvenih krvnih zrnaca, koncentracija hemoglobina i vrednosti hematokrita (Bersenyi i sar., 2003). Oko 99 % olova u krvi se vezuje za eritrocite jer ove krvne ćelije imaju veliki afinitet da se vežu za teške metale, naročito za olovu, tako da su eritrociti osjetljiviji na okidativna oštećenja i lipidnu peroksidaciju koja se dešava na membrani eritrocita, za razliku od drugih ćelija i tkiva. Eritrociti mogu da se šire putem krvi do različitih organa u telu (Sivaprasad i sar., 2003).

Vrednosti hematoloških parametara pokazuju da se efekti sistematskog trovanja olovom mogu pratiti merenjem nivoa hemoglobina, eritrocita i hematokrita (tabela 4.3.). Izloženost olovu dovodi do opadanja broja eritrocita u krvi, od  $7.38 \pm 0,34 \times 10^{12}/\text{L}$  za kontrolnu grupu ćivotinja do  $4.68 \pm 0,26 \times 10^{12}/\text{L}$  za grupu ćivotinja koja je intoksicirana olovom. Nivo Hb u krvi značajno opada, za oko 35% u odnosu na grupu koja je bila na normalnom režimu ćivota i ishrane (od  $140,17 \pm 4,45 \text{ g/L}$  do  $95,67 \pm 3,33 \text{ g/L}$ ). Procenat hematokrita značajno opada kod grupe eksperimentalnih ćivotinja koja je hronično intoksicirana olovom u odnosu na eksperimentalnu grupu koja je bila na normalnom režimu ishrane i ćivota (od  $40,55 \pm 1,52\%$  na  $26,65 \pm 0,73\%$ ).

Eritrociti imaju visok afinitet za olovu i oni sadrže velike količine cirkulišućeg olova koji je dospeo intoksikacijom u organizam laboratorijskih ćivotinja (Leggett i sar., 1993). Postoji veliki broj faktora koji doprinose povećanoj osjetljivosti eritrocita na olovu: hemoglobin može lako da se auto-oksiduje, pretvaranje oksihemoglobina u methemoglobin i membranske komponente crvenih krvnih zrnaca koje su veoma osjetljive na lipidnu peroksidaciju. Oovo indukuje oksidativni stres u krvi i drugim mekim tkivima što objašnjava jedan od mogućih mehanizama olovne toksičnosti (Pande i sar., 2001).

Dodatak suplemenata liponske kiseline i glutationa eksperimentalnim ćivotnjama dan nakon trovanja olovom značajno umanjuje negativne efekte olova na hematološke parametre krvi (RBC, Hb i Hct). To je verovatno zbog mogućnosti blokiranja  $\text{Pb}^{2+}$ -jona i građenja helatnog kompleksa preko dva aktivna –SH centra po molekulu LA i GSH.

Prema rezultatima iz tabele 4.3. glutation kao suplement značajno povećava broj eritrocita u krvi pacova (od  $4,68 \pm 0,26 \times 10^{12}/\text{L}$  za eksperimentalnu grupu ćivotinja koja je dobijala samo olovu na  $5,34 \pm 0,41 \times 10^{12}/\text{L}$  za eksperimentalnu grupu ćivotinja koja je pored intoksikacije olovom dobijala i suplement glutation), povećava nivo hemoglobina (od  $95,67 \pm 3,33 \text{ g/L}$  kod Wistar pacova koji su dobijali olovu na  $107,17 \pm 5,84 \text{ g/L}$  kod Wistar pacova koji su pored olova dobijali i suplement glutation) i povećava vrednost hematokrita (od  $26,65 \pm 0,73\%$

pacovi koji su dobijali olovo na  $29,18 \pm 2,30\%$  kod pacova koji su pored olova dobijali i suplement glutation).

**Tabela 4.3.** Vrednosti hematoloških parametara eksperimentalne grupe tivotinja intoksicirane olovom i uticaj suplemenata (LA i GSH) dan nakon izlaganja olovu

Hematoloski parametri	Kontrola	Pb	Pb + LA	Pb + GSH
ER [ $\times 10^{12}/L$ ]	$7,38 \pm 0,34$	$4,68 \pm 0,26$	$6,01 \pm 0,32$	$5,34 \pm 0,41$
Hb [g/L]	$140,17 \pm 4,45$	$95,67 \pm 3,33$	$131,33 \pm 4,27$	$107,17 \pm 5,84$
Hct [%]	$40,55 \pm 1,52$	$26,65 \pm 0,73$	$37,60 \pm 0,47$	$29,18 \pm 2,30$
MCV [fL]	$54,45 \pm 0,77$	$53,22 \pm 0,49$	$57,40 \pm 0,99$	$56,72 \pm 0,78$ fL
MCH [Pg]	$19,00 \pm 0,31$	$18,47 \pm 1,13$	$21,22 \pm 0,58$	$20,85 \pm 0,56$
MCHC [g/L]	$345,17 \pm 3,71$	$373,50 \pm 3,15$	$363,33 \pm 4,08$	$358,67 \pm 6,22$
LE [ $\times 10^9/L$ ]	$2,53 \pm 0,37$	$4,50 \pm 0,48$	$5,53 \pm 0,51$	$5,98 \pm 0,22$
LY [%]	$65,93 \pm 2,91$	$54,38 \pm 1,81$	$53,62 \pm 1,130$	$50,45 \pm 0,47$
MO [%]	$21,73 \pm 1,42$	$26,50 \pm 1,01$	$38,28 \pm 0,49$	$31,78 \pm 0,81$
GR [%]	$13,03 \pm 1,56$	$20,28 \pm 0,60$	$22,40 \pm 1,03$	$25,08 \pm 0,33$
TR [ $\times 10^3/\mu L$ ]	$1095,17 \pm 30,91$	$357,00 \pm 10,77$	$881,67 \pm 31,37$	$781,33 \pm 28,05$
RDW [%CV]	$15,03 \pm 0,56$	$16,48 \pm 0,38$	$15,07 \pm 0,58$	$15,37 \pm 0,38$
PDW [%]	$15,50 \pm 0,69$	$17,68 \pm 0,34$	$16,37 \pm 0,39$	$16,78 \pm 0,29$
MPV [fL]	$2,80 \pm 0,31$	$3,77 \pm 0,21$	$3,23 \pm 0,30$	$4,18 \pm 0,36$

LA, dodata dan nakon intoksikacije olovom, povećava broj eritrocita u odnosu na grupu tivotinja koja je intoksicirana olovom (od  $4,68 \pm 0,26 \times 10^{12}/L$  na  $6,01 \pm 0,32 \times 10^{12}/L$ ), povećava

nivo hemoglobina (od  $95,67 \pm 3,33$  g/L na  $131,33 \pm 4,27$  g/L) i povećava procenat hematokrita dovodeći je približno na vrednost kontrolne grupe tivotinja (od  $26,65 \pm 0,73\%$  na  $37,60 \pm 0,47\%$ ). Vremenska razlika između unošenja olova i liponske kiseline (jedan dan), odnosno glutationa ukazuje na mogućnost da liponska kiselina, tj. glutation može biti dobar suplement u cilju smanjenja toksičnog dejstva olova (Karlson, 1992). Nepotični efekti se mogu uspešno smanjiti, skoro eliminisati pomoću liponske kiseline i glutationa koji se dodaju uz redovnu ishranu.

Prema literaturnim podacima prisustvo olova u hrani kod zečeva tropskog pola dovodi do blage anemije i smanjenja MCH, MCV i MCHC (Falke i sar., 1990). U ovom radu vrednosti korpuskularne zapremine eritrocita (MCV) i korpuskularne zapremine hemoglobina (MCH) su kod tivotinja intoksiciranih olovom neznatno smanjene (od  $54,45 \pm 0,77$ fL na  $53,22 \pm 0,49$ fL za MCV i od  $19,00 \pm 0,31$ Pg na  $18,47 \pm 1,13$ Pg za MCH) u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja, što ukazuje na mikrocitnu hipohromnu anemiju. Kod pacova koji su dobijali neki supplement α-liponsku kiselinsku ili glutation primećen je porast ovih parametra krvi u odnosu na grupu tivotinja hronično intoksiciranih olovom (MCV od  $53,22 \pm 0,49$ fL na  $57,40 \pm 0,99$ fL za LA ili na  $56,72 \pm 0,78$ fL za GSH i MCH od  $18,47 \pm 1,13$ Pg na  $21,22 \pm 0,58$ Pg za LA odnosno  $20,85 \pm 0,56$ Pg za GSH).

U ovom radu studija različitih vrsta leukocita otkrila je povećanje limfocita kod pacova koji su dobijali olovo u odnosu na grupe sa dodatkom suplementa, LA odnosno GSH, (od  $54,38 \pm 1,81\%$  na  $53,62 \pm 1,13\%$  odnosno na  $50,45 \pm 0,47\%$ ) i povećanje monocita i granulocita u odnosu na kontrolnu grupu (od  $21,73 \pm 1,42\%$  na  $26,50 \pm 1,01\%$  za monocite i od  $13,03 \pm 1,56\%$  na  $20,28 \pm 0,60\%$  za granulocite). Razne studije pokazuju da intoksikacija olovom dovodi do monocitoze i neutrofilije verovatno zbog moguće upale prouzrokovane ovim teškim metalom (Hogan i sar., 1979), dok druge studije govore o kontraverznim rezultatima tj. izraženoj monocitopeniji i eozinopeniji, što se objašnjava olovom indukovanim upalom (Xintaras, 1992).

Prema rezultatima ovog rada zapaženo je značajno smanjenje krvnih pločica tj. trombocita kod tivotinja nakon duge intokacije olovom u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja (od  $1095,17 \pm 30,91 \times 10^3/\mu L$  na  $357,00 \pm 10,77 \times 10^3/\mu L$ ), što se poklapa sa rezultatima u drugim radovima (Xintaras, 1992).

*Rezultati merenja vrednosti standardnih hematoloških parametara kao i promena istih u uslovima hronične intoksikacije bakrom i efekti uticaja suplemenata α-liponske kiseline i glutationa prikazani su u tabeli 4.4.*

Bakar je sastavni deo brojnih enzima kao što su superoksid dizmutaza, lizil oksidaza, citochrom oksidaza, monoamino oksidaza, feroksidaza I i tirozinaza (Sharma i sar., 2007). Bakar ima značajnu ulogu i u apsorpciji i transportu gvođa i sintezi hemoglobin (Sharma, 1999). Još uvek ne postoje čvrsti dokazi o interakciji bakra sa gvođem (Seelig, 1972), uticaju bakra na metabolizam gvođa morfologiju eritrocita i druge hematološke parametre (Gipp i sar., 1973). Bakar je aktivni centar preko 12 metaloenzima koji su uključeni u stvaranju hemoglobina, biosintezi kateholamina, u sintezi melanina, oksidaciji difenola, transportu elektrona (Uauy, 1998). Bakar kao esencijalni biometal katalizuje biosintezu hemoglobina pomažući ugradnju gvođa u hem, a sa kalcijumom bakar učestvuje u metabolizmu fosfora (Tomin, 1999). Bakar je esencijalan element za normalnu eritropoezu što je demonstrirano od strane Harta i sar. 1928.god., koji su dokazali da ishrana punomasnim mlekom, dopunjena gvođem kod pacova uzrokuje anemiju koja je izlečena dodavanjem bakra u hrani (Hart i sar., 1928). Fernandes i saradnici, 1988.god. smatraju da hronična intoksikacija velikom količinom bakra dovodi do mikrocytne anemije i hemolize eritrocita (Fernandes i sar., 1988).

Eksperimentalne studije na svinjama su dokazale da nedostatak bakra u ishrani uzrokuje smanjenje hemoglobina, hematokrita, eritrocita, vrednosti MCV, MCH, MCHC i ceruloplazmina u plazmi (National Research Council, 1968).

Izloženost bakru dovodi do neznatnog opadanja broja eritrocita u krvi, od  $7.38 \pm 0,34 \times 10^{12}/L$  za kontrolnu grupu životinja do  $7.25 \pm 0,26 \times 10^{12}/L$  za grupu životinja koja je dobijala bakar. Nivo Hb u krvi značajno raste u odnosu na grupu koja je bila na normalnom režimu života i ishrane (od  $140,17 \pm 4,45 g/L$  do  $149,33 \pm 10,48 g/L$ ) verovatno jer je bakar neophodan za sintezu hemoglobina tako što pomaže ugradnju Fe u hem i katalizuje biosintezu porfirina i sazrevanje retikulocita. Jednom rečju ovaj teški metal je neophodan za hematopoezu. U našoj studiji potvrđeno je da bakar katalizuje biosintezu Hb tako da povećava sadržaj Hb za oko 8% i taj efekat je u prisustvu GSH, odnosno LA još izraženiji.

Dok procenat hematokrita opada kod grupe eksperimentalnih životinja koja je hronično intoksicirana bakrom u odnosu na eksperimentalnu grupu koja je bila na normalnom režimu ishrane i života (od  $40,55 \pm 1,52\%$  na  $34,6 \pm 0,58\%$ ).

U ovoj studiji vrednost korpuskularne zapremine eritrocita (MCV) su kod Wistar pacova hronično intoksiciranih bakrom smanjene u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja (od  $54,45 \pm 0,77$ fL na  $45,57 \pm 2,46$ fL), dok su vrednosti korpuskularne zapremine hemoglobina (MCH) neznatno povećane u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja (od  $19,00 \pm 0,31$ Pg na  $20,57 \pm 1,42$ Pg). Kod eksperimentalnih grupa koje su dan nakon intoksikacije bakrom dobijale neki suplement glutation ili  $\alpha$ -liponsku kiselinu zapaćeno je povećanje vrednosti MCV i MCH u odnosu na eksperimentalnu grupu tivotinja intoksiciranih bakrom (MCV od  $45,57 \pm 2,46$  na  $47,08$ fL za LA ili na  $46,85 \pm 2,31$ fL za GSH i MCH od  $20,57 \pm 1,42$ Pg na  $21,42 \pm 1,57$ Pg za LA odnosno  $22,00 \pm 1,46$ Pg za GSH).

Sistemsko izlaganje tivotinja uticaju bakra ima za posledicu povećanje pojedinih vrsta leukocita, naročito je izraćen efekat na limfocite što se može videti iz tabele 4.4. Procenat limfocita se povećava kod eksperimentalne grupe koja je dobijala bakar u odnosu na kontrolnu grupu (od  $65,93 \pm 2,91\%$  na  $66,92 \pm 3,49\%$ ), tako da se može govoriti o nepovoljnem uticaju bakra na imunski sistem.

Vrlo brzo nakon unošenja bakra u organizmu eksperimentalnih tivotinja dolazi do značajnih promena koje se manifestuju, između ostalog, smanjenjem broja trombocita u odnosu na eksperimentalnu grupu Wistar pacova koji su bili na normalnom rečimu tivota i ishrane (od  $1095,17 \pm 30,91 \times 10^3/\mu\text{L}$  na  $937,17 \pm 13,56 \times 10^3/\mu\text{L}$ ).  $\alpha$ -liponska kiselina ili glutation, koji se dodaju uz redovnu ishranu, mogu skoro eliminisati nepoželjni efekat hronične intoksikacije bakrom. Njegov efekat na pojedine vrste leukocita ogleda se u smanjenju limfocita u odnosu na eksperimentalnu grupu tivotinja koja je intoksicirana bakrom i to (od  $66,92 \pm 3,49\%$  na  $63,70 \pm 1,58\%$  za LA ili na  $64,52 \pm 2,11\%$  za GSH). Aplikacija  $\alpha$ -liponske kiseline ili glutationa ima za posledicu ublažavanje inflamatornog odgovora u organizmu izazvanog dejstvom teškog metala. Broj trombocita nakon aplikacije protektora (LA ili GSH) povećava u odnosu na eksperimentalnu grupu tivotinja intoksiciranih bakrom i približava vrednostima kontrolne grupe tivotinja (od  $937,17 \pm 13,56 \times 10^3/\mu\text{L}$  na  $1004,33 \pm 5,64 \times 10^3/\mu\text{L}$  za LA ili na  $976,50 \pm 12,14 \times 10^3/\mu\text{L}$  za GSH).

$\alpha$ -liponska kiselina, kao prirodno sulfhidrilno tiol jedinjenje, pronađeno je u prirodi u mnogim biljnim i tivotinjskim vrstama i koristi se u terapiji mnogih bolesti (Teichert i sar., 2005). Glutation kao tripeptid je najzastupljenije tiol jedinjenje u ćelijama sisara sa koncentracijom od 12 Mm (Cooper i sar., 1997). Pokazano je u ovom istraživanju da  $\alpha$ -liponska kiselina odnosno glutation dozirani samostalno ili kao suplementi pri intoksikaciji teškim metalima povoljno utiču na sadržaj hemoglobina u krvi, broj eritrocita i procenat

hematokrita u odnosu na kontrolnu grupu. Usled doziranja LA odnosno GSH broj eritrocita u krvi pacova pokazuje porast u odnosu na eksperimentalnu grupu tivotinja na normalnom ređumu tivota i ishrane (od  $7,38 \pm 0,34 \times 10^{12}/\text{L}$

**Tabela 4.4.** Vrednosti hematoloških parametara eksperimentalne grupe tivotinja intoksicirane bakrom i uticaj suplemenata (LA i GSH) dan nakon izlaganja bakru

Hematološki parametri	Kontrola	Cu	Cu + LA	Cu + GSH
ER [ $\times 10^{12}/\text{L}$ ]	$7,38 \pm 0,34$	$7,25 \pm 0,30$	$7,75 \pm 0,23$	$7,34 \pm 0,19$
Hb [g/L]	$140,17 \pm 4,45$	$149,33 \pm 10,48$	$167,67 \pm 5,54$	$162,00 \pm 2,97$
Hct [%]	$40,55 \pm 1,52$	$34,6 \pm 0,58$	$39,67 \pm 0,83$	$36,98 \pm 1,10$
MCV [fL]	$54,45 \pm 0,77$	$45,57 \pm 2,46$	$47,08 \pm 2,81$	$46,85 \pm 2,31$
MCH [Pg]	$19,00 \pm 0,31$	$20,57 \pm 1,42$	$21,42 \pm 1,57$	$22,00 \pm 1,46$
MCHC [g/L]	$345,17 \pm 3,71$	$352,83 \pm 13,01$	$349,00 \pm 4,19$	$345,17 \pm 4,66$
LE [ $\times 10^9/\text{L}$ ]	$2,53 \pm 0,37$	$3,84 \pm 0,31$	$4,76 \pm 0,28$	$4,51 \pm 0,38$
LY [%]	$65,93 \pm 2,91$	$66,92 \pm 3,49$	$63,70 \pm 1,58$	$64,52 \pm 2,11$
MO [%]	$21,73 \pm 1,42$	$22,18 \pm 2,39$	$23,20 \pm 1,69$	$23,77 \pm 2,55$
GR [%]	$13,03 \pm 1,56$	$11,63 \pm 0,95$	$12,27 \pm 2,21$	$12,50 \pm 2,11$
TR [ $\times 10^3/\mu\text{L}$ ]	$1095,17 \pm 30,91$	$937,17 \pm 13,56$	$1004,33 \pm 5,64$	$976,50 \pm 12,14$
RDW [%CV]	$15,03 \pm 0,56$	$16,07 \pm 1,08$	$15,65 \pm 0,57$	$15,75 \pm 0,29$
PDW [%]	$15,50 \pm 0,69$	$15,96 \pm 0,99$	$15,72 \pm 0,39$	$15,73 \pm 0,67$
MPV [fL]	$2,80 \pm 0,31$	$3,18 \pm 0,66$	$3,03 \pm 0,29$	$3,10 \pm 0,50$

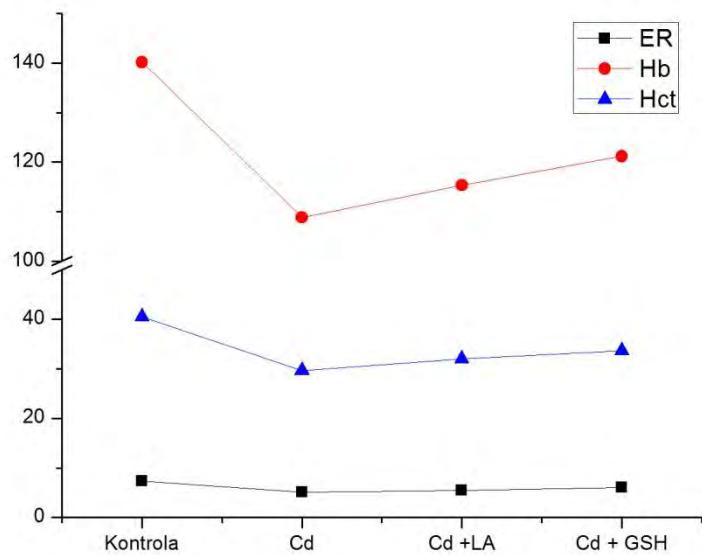
**Tabela 4.5.** Vrednosti hematoloških parametara kontrolne grupe tivotinja i eksperimentalnih grupa koja su dobijale protektore (LA ili GSH)

Hematološki parametri	Kontrola	LA	GSH
ER [ $\times 10^{12}/\text{L}$ ]	$7,38 \pm 0,34$	$7,73 \pm 0,28$	$7,51 \pm 0,032$
Hb [g/L]	$140,17 \pm 4,45$	$159,60 \pm 1,14$	$150,80 \pm 1,48$
Hct [%]	$40,55 \pm 1,52$	$45,26 \pm 0,99$	$43,30 \pm 0,24$
MCV [fL]	$54,45 \pm 0,77$	$53,28 \pm 0,69$	$53,82 \pm 0,29$
MCH [Pg]	$19,00 \pm 0,31$	$18,00 \pm 0,29$	$18,54 \pm 0,27$
MCHC [g/L]	$345,17 \pm 3,71$	$341,60 \pm 1,52$	$343,20 \pm 1,64$
LE [ $\times 10^9/\text{L}$ ]	$2,53 \pm 0,37$	$1,50 \pm 0,22$	$1,78 \pm 0,29$
LY [%]	$65,93 \pm 2,91$	$70,00 \pm 0,72$	$63,56 \pm 0,57$
MO [%]	$21,73 \pm 1,42$	$16,36 \pm 0,42$	$18,38 \pm 0,39$
GR [%]	$13,03 \pm 1,56$	$10,88 \pm 0,53$	$12,08 \pm 0,25$
TR [ $\times 10^3/\mu\text{L}$ ]	$1095,17 \pm 30,91$	$1110,20 \pm 1,30$	$1007,60 \pm 1,52$
RDW [%CV]	$15,03 \pm 0,56$	$17,04 \pm 0,72$	$16,62 \pm 0,24$
PDW [%]	$15,50 \pm 0,69$	$13,10 \pm 0,35$	$14,10 \pm 0,22$
MPV [fL]	$2,80 \pm 0,31$	$2,22 \pm 0,28$	$2,40 \pm 0,25$

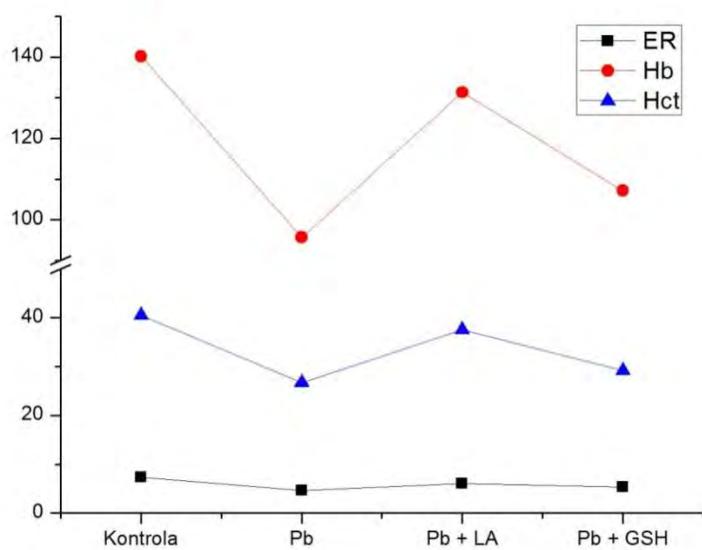
Pokazano je u ovom istraživanju da  $\alpha$ -liponska kiselina odnosno glutation dozirani samostalno ili kao suplementi pri intoksikaciji teškim metalima povoljno utiču na sadržaj hemoglobina u krvi, broj eritrocita i procenat hematokrita u odnosu na kontrolnu grupu. Usled doziranja LA odnosno GSH broj eritrocita u krvi pacova pokazuje porast u odnosu na eksperimentalnu grupu tivotinja na normalnom rečimu tivota i ishrane (od  $7,38 \pm 0,34 \times 10^{12}/\text{L}$  do  $7,73 \pm 0,28 \times 10^{12}/\text{L}$  za LA odnosno  $7,51 \pm 0,03 \times 10^{12}/\text{L}$  za GSH). U ovom eksperimentu

zapaćene su i veće vrednosti količine hemoglobina eksperimentalne grupe tivotinja koja je dobijala LA odnosno GSH u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja (od  $140,17 \pm 4,45$  g/L do  $159,60 \pm 1,14$  g/L za LA odnosno  $150,80 \pm 1,48$  g/L), kao i veći procenat hematokrita (od  $40,55 \pm 1,52\%$  do  $45,26 \pm 0,99\%$  za LA odnosno  $43,30 \pm 0,24\%$  za GSH) u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja. Preko svojih aktivnih mesta –SH grupe LA i GSH dodati kao suplementi posle intoksikacije teškim metalima (kadmijumom, olovom i bakrom) omogućavaju vezivanje metala i građenje kompleksa sa njima (Sigel i sar., 1978). LA i GSH su moćna tiol helatna sredstva protiv trovanja teškim metalima (naročito olovom, bakrom i kadmijumom) sa kojima formiraju stabilan kompleks, ublažavaju štetan efekat metala na eritrocite i na taj način ispoljavaju svoj antioksidativni efekat (Ou i sar., 1995; Gurer i sar., 1999). Eritrociti predstavljaju dobar model sistem za antioksidativno dejstvo  $\alpha$ -liponske kiseline i glutationa protiv oksidativnog stresa svih bioloških membrana ćelija.

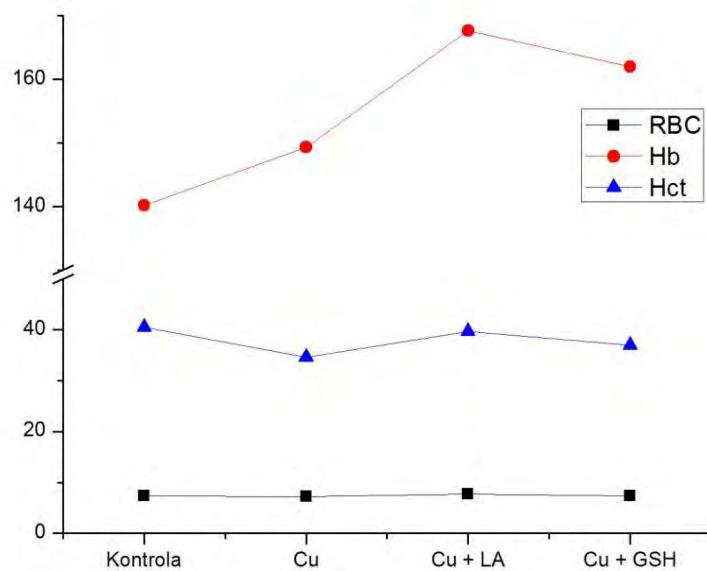
U ovoj studiji iz tabele 4.5. uočava se da LA odnosno GSH dozirani samostalno ispoljavaju dobar efekat na pojedine vrste leukocita, naročito na limfocite tj. zapaćen je bolji imuni odgovor kod eksperimentalne grupe tivotinja koja je dobijala LA u odnosu na eksperimentalnu grupu tivotinja koja je bila na normalnom rečimu tivota i ishrane (od  $65,93 \pm 2,91\%$  na  $70,00 \pm 0,72$ ). Značajne promene se manifestuju i promenom broja trombocita tj. povećanjem krvnih pločica koje učestvuju u procesu zgrušavanja krvi kod eksperimentalne grupe tivotinja dozirane LA u odnosu na kontrolnu grupu (od  $1095,17 \pm 30,91 \times 10^3$  / $\mu$ L na  $1110,20 \pm 1,30$ ). Zato se i govori o pozitivnom antioksidativnom dejstvu ovih tiol jedinjenja i predlaže se da se ove supstance na osnovu mehanizma njihovog delovanja naročito LA koristi u prevenciji i terapiji mnogih bolesti i komplikacija (Jovanović i sar., 2011).



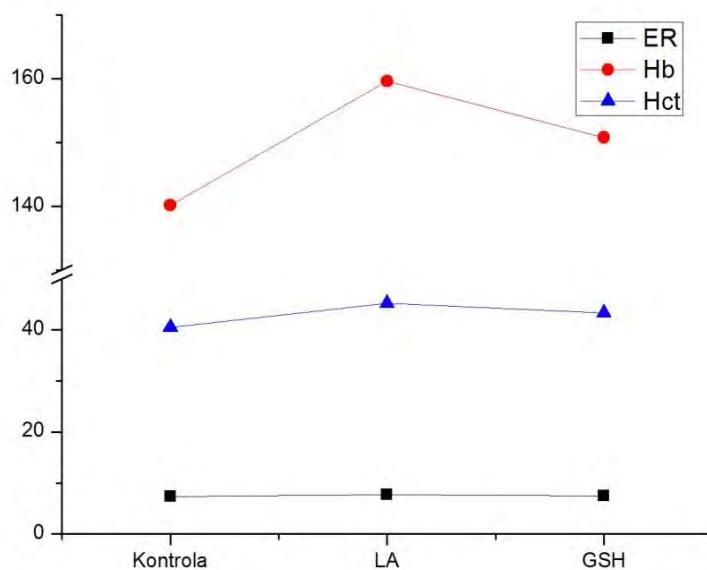
**Slika 4.3.** Trend promene tipičnih hematoloških parametara (ER, Hb i Hct) posle akutne intoksikacije kadmijumom sa ili bez protektora (LA i GSH)



**Slika 4.4.** Trend promene tipičnih hematoloških parametara (ER, Hb i Hct) posle hronične intoksikacije olovom sa ili bez protektora (LA i GSH)



**Slika 4.5.** Trend promene tipičnih hematoloških parametara (ER, Hb i Hct) posle hronične intoksikacije bakrom sa ili bez protektora (LA i GSH)



**Slika 4.6.** Trend promene tipičnih hematoloških parametara (ER, Hb i Hct) posle davanja protektora LA i GSH

U ovoj studiji rezultati tipičnih hematoloških parametara (ER, Hb i Hct) posle akutne i hronične intoksikacije (Cd, Pb i Cu) sa ili bez suplemenata (LA i GSH) prikazani su na slikama 4.3, 4.4 i 4.5. Ove analize krvi pokazuju sistemski efekat izlaganja teškim metalima koji može biti praćen merenjem nivoa hemoglobina, procenta hematokrita i broja eritrocita.

Nivo hemoglobina u krvi Wistar soja pacova signifikantno opada kod grupa intoksiciranih kadmijumom i olovom, jer ovi toksični metali verovatno inhibiraju brojne enzime koji učestvuju u sintezi hema a samim tim i stvaranju eritrocita. Od davnina je poznato toksično dejstvo olova na eritropoezu što je povezano sa razvojem anemije. Postoji mali broj informacija o efektu olova na biosintezu hema i razvoj anemije nakon izlaganja olovu (Sassa, 1978). Za razliku od prethodnih grupa, grupa tivotinja koja je intoksicirana bakrom pokazuje porast koncentracije hemoglobina u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja. Još uvek ne postoje čvrsti dokazi o interakciji bakra sa gvožđem (Seelig 1972), uticaju bakra na metabolizam gvožđa morfologiju eritrocita i druge hematološke parametre (Gipp i sar., 1973). Fernandes i saradnici 1988. god., smatraju da hronična intoksikacija velikom količinom bakra dovodi do mikrocytne anemije i hemolize eritrocita (Fernandes i sar., 1988). U ovoj studiji rezultati hematološke analize krvi (ER, Hb i Hct) u uslovima hronične intoksikacije Wistar pacova i.p inj. CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O kao i uticaj suplemenata S-donor liganada prikazani su na slici 4.5. Prisustvo bakra je neophodno za sintezu hemoglobina jer se smatra da ovaj metal verovatno pomaze ugradnju gvožđau hemoglobin i vrši sazrevanje eritrocita.

Kao rezultat poremećene sinteze hema je smanjen broj eritrocita i procenat hematokrita (za oko 40%) kod eksperimentalnih grupa tivotinja akutno i hronično intoksicirani teškim metalima (Cd i Pb), dok intoksikacija bakrom dovodi do neznatnog smanjenja broja eritrocita i procenta hematokrita u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja, slika 4.3, 4.4, 4.5. Dodatkom suplemenata ( $\alpha$ -liponske kiseline ili glutationa), dan nakon intoksikacije kadmijumom, olovom ili bakrom nivo hemoglobina i crvenih krvnih zrnaca pokazuje tendenciju rasta tj. porast vrednosti ovih hematoloških parametara koje se približavaju vrednostima eksperimentalne grupe tivotinja na normalnom rečimu tivota i ishrane, slika 4.3, 4.4. i 4.5. To je verovatno zato što se teški metal (Cd, Pb ili Cu) veže za aktivno mesto -SH grupe protektora i na taj način se blokira i smanjuje toksično dejstvo teških metala. Dodatak suplemenata, dan nakon intoksikacije teškim metalima, eliminiše se negativni efekti teških metala (Cd, Pb i Cu) koji se manifestuju na hematološke parametre (ER, Hb i Hct).

## **4.3. Rezultati merenja aktivnosti alkalne i kisele DNaze**

Slobodni radikali i neradikalne reaktivne vrste kiseonika mogu izazvati smrt ćelije putem 2 mehanizma ćelijske smrte: nekroze i apoptoze. Apoptoza je odložena forma ćelijske smrte koja održava homeostazu organizma, ali se može aktivisati i u patološkim stanjima. Apoptoza je uobičajeni genetski kontrolisan proces koji se aktivije kada ćelija nije potrebna ili je teško oštećena. Svaka ćelija koja dođe do apoptoze mora da aktivije program ćelijske smrte (programmed cell death, PCD) koji obuhvata sledeće činioce: induktore, ćelijske receptore, transkripcione faktore, aktivaciju genoma, sintezu proteina, aktivaciju enzima razgradnje, što dovodi do smrte ćelije. Programiranu ćelijsku smrt mogu indukovati:

1. fiziološki aktivatori, uključujući i signale smrte,
2. aktivatori nastali usled oštećenja, kao što su slobodni radikali,
3.  $\gamma$  i UV zračenje i
4. toksini.

Apoptozu mogu izazvati primena malih doza vodonik peroksida ili lipidnih peroksida, pad intraćelijskog redukovanih glutationa (GSH) ili primena hemikalija koje inhibišu sintezu GSH i primena hemikalija koje doprinose sintezi reaktivnih vrsti kao npr. teški metali (Cd, Pb i Cu), dok sprečavanje apoptoze može se izvršiti endogenim i egzogenim antioksidansima (npr.  $\alpha$ -liponska kiselina i glutation).

*Rezultati merenja aktivnosti DNaze jetre, bubrega, mozga i pankreasa u uslovima hronične intoksikacije albino pacova Wistar soja jonima Cd<sup>2+</sup> kao i uticaj suplemenata S-donor liganada prikazani su u tabeli 4.6.* Iz dobijenih rezultata se vidi da kadmijum značajno povećava nivo alkalne DNaze jetre (od  $7,16 \pm 1,73$  na  $22,24 \pm 2,28$ ), bubrega (od  $5,91 \pm 1,23$  na  $13,96 \pm 0,83$ ), mozga (od  $0,55 \pm 0,09$  na  $1,36 \pm 0,27$ ) i pankreasa (od  $5,76 \pm 1,70$  na  $18,15 \pm 2,97$ ). Vrednosti kisele DNaze nakon hronične intoksikacije kadmijumom su povećane u jetri (od  $4,10 \pm 1,44$  na  $20,73 \pm 3,79$ ), u bubregu (od  $5,54 \pm 0,40$  na  $13,64 \pm 0,73$ ), mozgu (od  $0,57 \pm 0,12$  na  $1,28 \pm 0,39$ ) i pankreasu (od  $5,54 \pm 0,81$  na  $19,64 \pm 3,15$ ) u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja koja je bila na normalnom rečimu ishrane i tivota bez intoksikacije teškim metalima i bez dodavanja suplemenata.

Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da intoksikacija kadmijumom značajno menja nivo endonukleaza. Prepostavka je da je kadmijum verovatni uzročnik nastanka oksidativnih oštećenja DNK, proteina i lipida što se manifestuje povećanom aktivnošću alkalne i kisele DNaze (tabela 4.6). Kadmijum može da dovede do povećanog stvaranja slobodnih

kiseoničnih radikala, tako da se može govoriti o genotoksičnom uticaju ovog metala na enzimske i neenzimske komponente antioksidativnog sistema odbrane organizma. Postoje literaturni podaci o stvaranju slobodnih radikala kod ćivotinja 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 povećanom oštećenju molekula DNK, kao i povećanju aktivnosti alkalne i kisele DNaze koje učestvuju u reparaciji ili stvaranju nove DNK. Taj efekat je jako izražen u tkivu jetre, bubregu i pankreasu (tabela 4.6).

Neposredna posledica izloženosti kadmijumu je iscrpljivanje fizioloških antioksidanasa, 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.

Prema rezultatima iz tabele 4.6. glutation kao suplement značajno smanjuje aktivnost DNaza (alkalne i kisele) jetre (od  $22,24 \pm 2,28$  na  $10,04 \pm 1,42$  za alkalnu DNazu i od  $20,73 \pm 3,79$  na  $10,18 \pm 3,10$  za kiselu DNazu), bubrega (od  $13,96 \pm 0,83$  na  $6,61 \pm 0,44$  za alkalnu DNazu i od  $13,64 \pm 0,73$  na  $9,22 \pm 0,25$  za kiselu DNazu), mozga (od  $1,36 \pm 0,27$  na  $0,75 \pm 0,31$  za alkalnu DNazu i od  $1,28 \pm 0,39$  na  $0,72 \pm 0,16$  za kiselu DNazu) i pankreasa (od  $18,15 \pm 2,97$  na  $10,90 \pm 1,27$  za alkalnu DNazu i od  $19,64 \pm 3,15$  na  $10,83 \pm 1,40$  za kiselu DNazu) u odnosu na eksperimentalnu grupu ćivotinja koja je intoksicirana kadmijumom.

Dodavanjem GSH, dan nakon izlaganja ovom metalu tokom trajanja eksperimenta, oko 50% delimično redukuje efekat toksičnog uticaja metala na aktivnost kiselih DNaza. 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 je  $[M(GSH)_2]$ . Stabilnost kompleksa koje GSH može da nagradi sa jonom teškog metala ( $Cd^{2+}$ ) zavisi od veličine jona, acidobaznih osobina jona kao i afiniteta -SH grupe. GSH igra prvu liniju odbrane i značajnu ulogu u odbrani od kadmijumove citotoksičnosti (Singhal i sar., 1987).

**Tabela 4.6.** Aktivnost a) alkalne DNaze i b) kisele DNaze kod eksperimentalnih grupa u uslovima akutne intoksikacije kadmijumom i uz dodatak odgovarajućih suplemenata

Eksperimentalne grupe n=6	Alkalna DNaza [IJ/mg]			
	Jetra	Bubreg	Mozak	Pankreas
Kontrola	7,16 ± 1,73	5,91 ± 1,23	0,55 ± 0,09	5,76 ± 1,70
Kadmijum (Cd)	22,24 ± 2,28	13,96 ± 0,83	1,36 ± 0,27	18,15 ± 2,97
Cd + LA	12,93 ± 1,15	5,96 ± 0,46	0,69 ± 0,29	10,87 ± 3,04
Cd + GSH	10,04 ± 1,42	6,61 ± 0,44	0,75 ± 0,31	10,9 ± 1,27
LA	14,01 ± 0,91	8,24 ± 1,19	0,28 ± 0,10	4,66 ± 1,05
GSH	8,18 ± 0,68	7,95 ± 1,29	0,43 ± 0,08	5,20 ± 0,81

Eksperimentalne Grupe n=6	Kisela DNaza [IJ/mg]			
	Jetra	Bubreg	Mozak	Pankreas
Kontrola	4,10 ± 1,44	5,45 ± 0,40	0,57 ± 0,12	5,54 ± 0,81
Kadmijum (Cd)	20,73 ± 3,79	13,64 ± 0,73	1,28 ± 0,39	19,64 ± 3,15
Cd + LA	13,70 ± 2,36	9,27 ± 0,34	0,57 ± 0,13	11,22 ± 1,54
Cd + GSH	10,18 ± 3,10	9,22 ± 0,25	0,72 ± 0,16	10,83 ± 1,40
LA	14,78 ± 2,37	9,92 ± 0,90	0,27 ± 0,08	4,28 ± 0,70
GSH	7,42 ± 1,35	9,26 ± 0,65	0,46 ± 0,04	4,37 ± 0,95

Prema rezultatima merenja aktivnosti alkalne DNaze jetre, pankreasa, bubrega i mozga  $\alpha$ -liponska kiselina je dobar suplement u uslovima akutnog trovanja kadmijumom subletalnom dozom intraperitonealnom injekcijom, na osnovu vrednosti merenja aktivnosti alkalne DNaze jetre, pankreasa, bubrega i mozga. Prema aktivnosti DNaza pankreasa LA smanjuje nivo istih (od  $18,15 \pm 2,97$  na  $10,87 \pm 3,04$ ) ali je to još uvek visoko u odnosu na nivo aktivnosti kontrolne grupe ( $5,76 \pm 1,70$ ). Prema vrednostima aktivnosti kisele DNaze LA smanjuje nivo istih izmeren u uslovima intoksikacije kadmijumom i normalizuje njihovu vrednost u jetri, bubrezima i pankreasu.

Sumarno na osnovu rezultata iz tabele 4.6. LA ispoljava bolje protektivno dejstvo u pojedinim organima kao što su bubreg i mozak što se može zaključiti merenjem nivoa alkalne DNaze u bubregu ( $13,96 \pm 0,83$  na  $5,96 \pm 0,46$ ) i mozgu ( $1,36 \pm 0,27$  na  $0,69 \pm 0,29$ ). U pankreasu su vrednosti alkalne DNaze približno jednake i pri dodavanju LA ( $18,15 \pm 2,97$  na  $10,87 \pm 3,04$ ) ili GSH ( $18,15 \pm 2,97$  na  $10,9 \pm 1,27$ ) kao suplementa. Merenjem nivoa kisele DNaze u mozgu LA ( $1,28 \pm 0,39$  na  $0,57 \pm 0,13$ ) važi za boljeg protektora u odnosu na GSH.

Zapaženo je da GSH kao suplement ispoljava bolje protektivno dejstvo na osnovu merenja kisele DNaze u jetri ( $20,73 \pm 3,79$  na  $10,18 \pm 3,10$ ) i pankreasu ( $19,64 \pm 3,15$  na  $10,83 \pm 1,40$ ), dok su vrednosti kisele DNaze pri dodavanju LA ( $13,64 \pm 0,73$  na  $9,27 \pm 0,34$ ) ili GSH ( $13,64 \pm 0,73$  na  $9,22 \pm 0,25$ ) kao suplementa približno jednake u bubrezima. Merenjem nivoa alkalne DNaze GSH ( $22,24 \pm 2,28$  na  $10,04 \pm 1,42$ ) je bolji protektor u jetri u odnosu na LA. Antoksidansi GSH i LA kao moćni helatori neophodni su u detoksifikaciji reaktivnih kiseoničnih vrsta kod pacova koji su izloženi trovanju kadmijumom. Ova tiol jedinjenja vezuje za sebe kadmijum gradeći sa njim komplekse i delujući kao moćna antioksidativna sredstva. U svojim reakcijama sa slobodnim radikalima dovode do ekspresije gena, proliferacije, eritropoeze, imunološkog odgovora i smanjuju oksidativni stres i lipidnu peroksidaciju.

Tako da je zastupljenost ovih suplemenata, liponske kiseline i glutataiona u ishrani od izuzetnog značaja za normalno odvijanje životnih procesa u ćeliji. Glavni izvori glutationa u namirnicama su: brokoli, spanać, avokado, karfiol, kupus i kelj.

*Rezultati merenja aktivnosti DNaza jetre, bubrega, mozga i pankreasa u uslovima hronične intoksikacije Wistar pacova jonima Pb<sup>2+</sup> kao i uticaj suplemenata S-donor liganada prikazani su u tabeli 4.7. Iz dobijenih rezultata se vidi da olovo značajno povećava nivo alkalne DNaze jetre ( $7,16 \pm 1,73$  na  $18,45 \pm 1,49$ ), bubrega ( $5,91 \pm 1,23$  na  $10,43 \pm 0,69$ ), mozga ( $0,55 \pm 0,09$  na  $1,35 \pm 0,35$ ) i pankreasa ( $5,76 \pm 1,70$  na  $16,18 \pm 1,60$ ). Vrednosti kisele DNaze*

nakon hronične intoksikacije olovom su povećane u jetri ( $4,10\pm1,44$  na  $16,34\pm2,84$ ), u bubregu ( $5,54\pm0,40$  na  $12,57\pm0,45$ ), mozgu ( $0,57\pm0,12$  na  $0,78\pm0,23$ ) i u pankreasu ( $5,54\pm0,81$  na  $15,73\pm1,10$ ) u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja koja je bila na normalnom rečimu ishrane i tivota bez intoksikacije teškim metalima i bez dodavanje suplemenata.

Iz dobijenih rezultata prikazanih u tabeli 4.7. se može zaključiti da dejstvo olova vodi pojačanom izazivanju oksidativnog stresa, naročito u tkivima jetre, pankreasa i bubrega, što se manifestuje značajnim povećanjem produkcije DNaza. Istovremeno se narušavaju antioksidativni mehanizmi odbrane kod ovih tivotinja a koji su inače prisutni u grupi tivotinja na normalnom rečimu ishrane i bez intoksikacije teškim metalima.

Kada su ćelije izložene uticaju olova dolazi do oštećenja DNK i povećanja genotoksičnog efekta u ćeliji što dovodi do aktiviranja DNaza koje će učestvovati u reparaciji DNK. Dodatkom suplemenata, dan nakon izloženosti uticaju metala, u toku trajanja eksperimenta, delom se umanjuje efekat trovanja pa time i aktivnost enzima. LA 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 LA vezuje teške metale i time umanjuje njihovo toksično dejstvo što se vidi iz smanjenog nivoa produkcije DNaza. Na ćelijskom nivou LA je dobar antioksidans, lako se oksiduje u dihidroliponsku kiselinsku i tako regeneriše oksidovani glutation, vitamin C i vitamin E i utiče na održavanje red-ox ćelijskog statusa. Literaturni podaci se uglavnom odnose na efekte LA u sanaciji nitrozativnog stresa u dijabetesu, nefropatiji i koronarnoj bolesti (Gaurav i sar., 2010). U ovom istraživanju administracija LA značajno inhibiše sadržaj proteina, aktivnost DNaza i nivo lipidnih peroksida, zbog podstaknutih aktivnosti enzima antioksidativne zaštite kao što su superoksid-dizmutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT).

Istaknuto je da  $\alpha$ -liponska kiselina formira stabilne helatne komplekse sa  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  kao i to da uklanja teške metale iz pojedinih ciljanih organa i na taj način deluje kao dobar suplement i antioksidans u borbi protiv toksičnosti teških metala. LA može biti tiol-helator i potencijalni izbor u tretmanu kod trovanja olovom. Ona je poželjan suplement zbog prisutne  $-SH$  grupe koja preko S-donor atoma ima mogućnost kompleksiranja sa teškim metalima.

**Tabela 4.7.** Aktivnost a) alkalne DNaze i b) kisele DNaze kod eksperimentalnih grupa u uslovima hronične intoksikacije olovom i uz dodatak odgovarajućih suplemenata

Eksperimentalne Grupe n=6	Alkalna DNaza [IU/mg]			
	Jetra	Bubreg	Mozak	Pankreas
Kontrola	7,16 ± 1,73	5,91 ± 1,23	0,55 ± 0,09	5,76 ± 1,70
Olovo (Pb)	18,45 ± 1,49	10,43 ± 0,69	1,35 ± 0,35	16,18 ± 1,60
Pb + LA	8,39 ± 1,06	8,38 ± 0,43	0,67 ± 0,13	11,23 ± 1,29
Pb + GSH	10,12 ± 2,59	7,63 ± 0,59	1,00 ± 0,21	12,92 ± 0,98
LA	14,01 ± 0,91	8,24 ± 1,19	0,28 ± 0,10	4,66 ± 1,05
GSH	8,18 ± 0,68	7,95 ± 1,29	0,43 ± 0,08	5,20 ± 0,81

Eksperimentalne Grupe n=6	Kisela DNaza[IU/mg]			
	Jetra	Bubreg	Mozak	Pankreas
Kontrola	4,10 ± 1,44	5,45 ± 0,40	0,57 ± 0,12	5,54 ± 0,81
Olovo (Pb)	16,34 ± 2,84	12,57 ± 0,45	0,78 ± 0,23	15,73 ± 1,10
Pb + LA	11,78 ± 2,54	8,71 ± 0,60	0,59 ± 0,25	10,42 ± 2,46
Pb + GSH	12,41 ± 1,44	7,36 ± 0,85	0,68 ± 0,29	11,76 ± 1,93
LA	14,78 ± 2,37	9,92 ± 0,90	0,27 ± 0,08	4,28 ± 0,70
GSH	7,42 ± 1,35	9,26 ± 0,65	0,46 ± 0,04	4,37 ± 0,95

LA može biti tiol-helator i potencijalni izbor u tretmanu kod trovanja olovom. Ona je pošteni suplement zbog prisutne -SH grupe koja preko S-donor atoma ima mogućnost kompleksiranja sa teškim metalima. LA posredno doprinosi smanjenju proizvodnje slobodnih

radikala što pojačava antioksidativni sistem. Dobijeni rezultati u ovoj studiji ukazuju na moguću aplikaciju LA kod hronične intoksikacije ovim teškim metalom. Primenom ovog suplementa zadržava se metabolički efekat enzima i u značajnoj meri normalizuje aktivnost endonukleaza jetre, pankreasa i bubrega. Zapaženo je smanjenje oksidativne modifikacije DNK pri suplementaciji  $\alpha$ -liponskom kiselinom. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 4.7. LA, dodata dan nakon intoksikacije olovom, smanjuje nivo alkalne DNaze najviše u jetri ( $18,45 \pm 1,49$  na  $8,39 \pm 1,06$ ), zatim u pankreasu ( $16,18 \pm 1,60$  na  $11,23 \pm 1,29$ ), u bubregu ( $10,43 \pm 0,69$  na  $8,38 \pm 0,43$ ) i u mozgu ( $1,35 \pm 0,35$  na  $0,67 \pm 0,13$ ) u odnosu na eksperimentalnu grupu koja je intoksicirana olovom. Smanjena je i vrednost kisele DNaze pri suplementaciji LA dan nakon intoksikacije olovom u jetri ( $16,34 \pm 2,84$  na  $11,78 \pm 2,54$ ), u bubrežima ( $12,57 \pm 0,45$  na  $8,71 \pm 0,60$ ), pankreasu ( $15,73 \pm 1,10$  na  $10,42 \pm 2,46$ ) i mozgu ( $0,78 \pm 0,23$  na  $0,59 \pm 0,25$ ).

Prema rezultatima iz ove tabele glutation kao suplement značajno smanjuje aktivnost DNaza (alkalne i kisele) jetre (od  $18,45 \pm 1,49$  na  $10,12 \pm 2,59$  za alkalnu DNazu i od  $16,34 \pm 2,84$  na  $12,41 \pm 1,44$  za kiselu DNazu), bubrega (od  $10,43 \pm 0,69$  na  $7,63 \pm 0,59$  za alkalnu DNazu i od  $12,57 \pm 0,45$  na  $7,36 \pm 0,85$  za kiselu DNazu), mozga (od  $1,35 \pm 0,35$  na  $1,00 \pm 0,21$  za alkalnu DNazu i od  $0,78 \pm 0,23$  na  $0,68 \pm 0,29$  za kiselu DNazu) i pankreasa (od  $16,18 \pm 1,60$  na  $12,92 \pm 0,98$  za alkalnu DNazu i od  $15,73 \pm 1,10$  na  $11,76 \pm 1,93$  za kiselu DNazu) u odnosu na eksperimentalnu grupu intoksiciranu olovom. Osnovna uloga glutationa kao značajnog antioksidansa ostvaruje se direktnim ukljanjanjem slobodnih radikala kroz neenzimsku reakciju, u održanju integriteta ćelijske membrane i normalnom odvijanju transportnih procesa, stabilizaciji receptora, transportu aminokiselina i aktivnosti citoskeleta. Verovatno davanje glutationa dovodi do reakcije tiol grupe GSH sa olovom i na taj način smanjuje u određenoj meri toksično dejstvo ovog metala. Prepostavka je da GSH preko S-tiolne grupe u strukturi reaguje sa olovom i verovatno umanjuje toksično dejstvo povećanom ekskrecijom olova iz organizma.

Oovo inače "kao meka Lewis-ova kiselina—ima izražen afinitet za interakciju sa "mekim bazama—kao što su S-atomi tiol grupe u antioksidansima, prirodnim biomolekulima i suplementima u ovom slučaju u glutationu. Može se reći da je GSH počeljan suplement i antioksidans u detoksikaciji reaktivnih kiseoničnih vrsta kod pacova koji su izloženi trovanju olovom. Gubitak glutationa i oksidativno oštećenje predstavljaju jedan od ranih signala u programiranoj ćelijskoj smrti tj. apoptozi ćelije (Kane i sar., 1993). Dosadašnje studije ukazuju da glutation igra ulogu u regulisanju apoptoze (Hall i sar., 1999).

U ovom eksperimentu je pokazana korisna uloga suplemenata GSH i LA sa antioksidativnim karakterom u prevenciji i smanjenju nepočelnih efekata hronične intoksikacije olovom. Antioksidansi posredno štite ćelije od oksidativnog stresa tako što predstavljaju potencijalne skavendžere slobodnih radikala i zaustavljaju lančanu reakciju lipidne peroksidacije koje mogu dovesti do oštećenja i degradacije DNK što se može videti na slikama 2.1. i 2.3. LA povećava efekat glutationa važnog antioksidansa koji se nalazi u ćelijama (Han i sar., 1997). Ovi suplementi verovatno učestvuju u zaštiti ćelije od toksičnog dejstva teških metala i regulisanju antioksidativnog sistema odbrane ćelije. Mehanizam njihovog delovanja upućuje na to da se mogu koristiti kao terapeutski korisna sredstva kod mnogih poremećaja i bolesti. Prema rezultatima praćenja efekata hronične intoksikacije Pb<sup>2+</sup> ionima na ovom model sistemu LA i GSH se potencijalno mogu koristiti u uslovima prevencije i zaštite kod populacije ljudi izložene hroničnoj intoksikaciji olovom u životnoj i radnoj sredini.

Sumarno upoređujući rezultate iz tabele 4.7. LA ispoljava bolje protektivno dejstvo na osnovu merenja alkalne DNaze u jetri ( $18,45 \pm 1,49$  na  $8,39 \pm 1,06$ ), mozgu ( $1,35 \pm 0,35$  na  $0,67 \pm 0,13$ ) i pankreasu ( $16,18 \pm 1,60$  na  $11,23 \pm 1,29$ ), a merenjem kisele DNaze u istim organima i to u jetri ( $16,34 \pm 2,84$  na  $11,78 \pm 2,54$ ), mozgu ( $0,78 \pm 0,23$  na  $0,59 \pm 0,25$ ) i pankreasu ( $15,73 \pm 1,10$  na  $10,42 \pm 2,46$ ). Dok GSH je bolji protektor u odnosu na LA samo u bubrežima na osnovu vrednosti i alkalne ( $10,43 \pm 0,69$  na  $7,63 \pm 0,59$ ) i kisele DNaze ( $12,57 \pm 0,45$  na  $7,36 \pm 0,85$ ). Na osnovu ovih rezultata iz tabele 4.7. zapaženo je antigenotoksično i antimutageno dejstvo LA i GSH i efikasnost ovih suplemenata u zaštiti od citotoksičnog dejstva olova kao teškog metala.

*Rezultati hronične intoksikacije albino pacova Wistar soja solima bakra subletalnom dozom subkutanom injekcijom u toku tri nedelje trajanja eksperimenta prikazani su u tabeli 4.8.*

Iz ovih rezultata se vidi da bakar značajno povećava nivo alkalne DNaze jetre ( $7,16 \pm 1,73$  na  $12,63 \pm 1,02$ ), bubrega ( $5,91 \pm 1,23$  na  $9,73 \pm 1,23$ ), mozga ( $0,55 \pm 0,09$  na  $0,97 \pm 0,16$ ) i pankreasa ( $5,76 \pm 1,70$  na  $11,48 \pm 0,75$ ). Vrednosti kisele DNaze nakon hronične intoksikacije bakrom su povećane u jetri ( $4,10 \pm 1,44$  na  $15,53 \pm 3,28$ ), u bubregu ( $5,54 \pm 0,40$  na  $9,48 \pm 1,50$ ), mozgu ( $0,57 \pm 0,12$  na  $0,79 \pm 0,12$ ) i pankreasu ( $5,54 \pm 0,81$  na  $9,94 \pm 0,92$ ) u odnosu na kontrolnu grupu životinja koja je bila na normalnom režimu ishrane i života bez intoksikacije teškim metalima i bez dodavanje suplemenata.

Bakar se deponuje u jetri, tako da dolazi do stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala u jetri kod eksperimentalnih ćivotinja tj. pacova koje su dobijali bakar što je pokazano u radu Kadiiska i sar., 1993 god. (Kadiiska i sar., 1993). U prisustvu superoksid anjona smanjuje se koncentracija askorbibnske kiseline i glutationa i dolazi do formiranja OH<sup>•</sup> (hidroksil radikala iz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Hidroksil radikal reaguje sa brojnim molekulskim vrstama u organizmu i izaziva oksidativna oštećenja ćelija. Višak Cu kod pacova povećava oksidativna oštećenja membrane lipida i DNK u jetri, pankreasu i bubrežima što povećava enzimsku aktivnost (Campbell i sar., 1980; Bremner 1998). Prema literaturnim podacima, u većim dozama, od 10<sup>-6</sup> mol/dm<sup>3</sup>, Cu inhibira neke enzime (kisela fosfataza), onemogućava vezivanje drugih esencijalnih mikroelemenata, ili se vezuje za neke kofaktore, glutation npr. Cu 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).

Bakar učestvuje i u produkciji reaktivnih kiseončnih vrsta koje dovode do oksidativnog stresa koji kasnije dovodi do oksidativne modifikacije molekula DNK. Antioksidansi koji su uneti u organizam, u ovoj studiji, α-liponska kiselina i glutation štite organizam od toksičnosti bakrom što je u skladu sa autorima drugih radova koji govore o antioksidansima koji smanjuju oksidativno oštećenje ćelija izazvano viškom bakra u organizmu eksperimentalnih ćivotinja (Bremner, 1998).

Prema rezultatima ovih istraživanja LA je dobar suplement na osnovu vrednosti aktivnosti alkalne i kisele DNaze jetre, pankreasa i bubrega. Suplementacija LA dan nakon intoksikacije bakrom, smanjuje nivo alkalne DNaze u bubregu (9,73±1,23 na 6,93±0,58), u pankreasu (11,48±0,75 na 8,71±1,00) i mozgu (0,97±0,16 na 0,66±0,10) u odnosu na eksperimentalnu grupu koja je intoksicirana bakrom. Smanjena je i vrednost kisele DNaze pri suplementaciji LA dan nakon intoksikacije bakrom u jetri (15,53±3,28 na 13,17±2,58), u bubregu (9,48±1,50 na 6,98±1,02), pankreasu (9,94±0,92 na 8,56±1,11) i mozgu (0,79±0,12 na 0,71±0,13) u odnosu na grupu ćivotinja koja je dobijala bakar.

Preterano izlaganje bakru može dovesti do negativnih efekata po zdravlje, uključujući oštećenje jetre, anemiju i drugo. Bakar se može vezati za sulfhidrilne grupe nekih enzima kao npr. glukozo-6-fosfataze i glutation reduktaze ometajući zaštitu ćelija od slobodnih radikala.

**Tabela 4.8.** Aktivnost a) alkalne DNaze i b) kisele DNaze kod eksperimentalnih grupa u uslovima hronične intoksikacije bakrom i uz dodatak odgovarajućih suplemenata

Eksperimentalne Grupe n=6	Alkalna DNaza [IJ/mg]			
	Jetra	Bubreg	Mozak	Pankreas
Kontrola	7,16 ± 1,73	5,91 ± 1,23	0,55 ± 0,09	5,76 ± 1,70
Bakar (Cu)	12,63 ± 1,02	9,73 ± 1,23	0,97 ± 0,16	11,48 ± 0,75
Cu + LA	13,16 ± 1,82	6,93 ± 0,58	0,66 ± 0,10	8,71 ± 1,00
Cu + GSH	11,10 ± 1,24	6,23 ± 1,59	0,74 ± 0,20	9,56 ± 1,42
LA	14,01 ± 0,91	8,24 ± 1,19	0,28 ± 0,10	4,66 ± 1,05
GSH	8,18 ± 0,68	7,95 ± 1,29	0,43 ± 0,08	5,20 ± 0,81
Eksperimentalne Grupe n=6	Kisela DNaza [IJ/mg]			
	Jetra	Bubreg	Mozak	Pankreas
Kontrola	4,10 ± 1,44	5,45 ± 0,40	0,57 ± 0,12	5,54 ± 0,81
Bakar (Cu)	15,53 ± 3,28	9,48 ± 1,50	0,79 ± 0,12	9,94 ± 0,92
Cu + LA	13,17 ± 2,58	6,98 ± 1,02	0,71 ± 0,13	8,56 ± 1,11
Cu + GSH	11,85 ± 3,05	6,91 ± 1,17	0,72 ± 0,08	9,64 ± 1,42
LA	14,78 ± 2,37	9,92 ± 0,90	0,27 ± 0,08	4,28 ± 0,70
GSH	7,42 ± 1,35	9,26 ± 0,65	0,46 ± 0,04	4,37 ± 0,95

GSH koji se prema strukturi sa Cu može vezivati i preko –N i preko –S pa i –O donor atoma ispoljava protektivnu ulogu na osnovu podataka o aktivnosti DNaza.

Prema rezultatima iz tabele 4.8. glutation kao suplement značajno smanjuje aktivnost DNaza (alkalne i kisele) jetre (od  $12,63 \pm 1,02$  na  $11,10 \pm 1,24$  za alkalnu DNazu i od  $15,53 \pm 3,28$  na  $11,85 \pm 3,05$  za kiselu DNazu), bubrega (od  $9,73 \pm 1,23$  na  $6,23 \pm 1,59$  za alkalnu DNazu i od  $9,48 \pm 1,50$  na  $6,91 \pm 1,17$  za kiselu DNazu), mozga (od  $0,97 \pm 0,16$  na  $0,74 \pm 0,20$  za alkalnu DNazu i od  $0,79 \pm 0,12$  na  $0,72 \pm 0,08$  za kiselu DNazu) i pankreas (od  $11,48 \pm 0,75$  na  $9,56 \pm 1,42$  za alkalnu DNazu i od  $9,94 \pm 0,92$  na  $9,64 \pm 1,42$  za kiselu DNazu).

Sumarno upoređujući rezultate iz tabele 4.8. LA ispoljava bolje protektivno dejstvo na osnovu merenja alkalne DNaze u mozgu ( $0,97 \pm 0,16$  na  $0,66 \pm 0,10$ ) i pankreasu ( $11,48 \pm 0,75$  na  $8,71 \pm 1,00$ ), a merenjem kisele DNaze u istim organima i to u pankreasu ( $9,94 \pm 0,92$  na  $8,56 \pm 1,11$ ) i mozgu ( $0,79 \pm 0,12$  na  $0,71 \pm 0,13$ ). Dok GSH je bolji protektor u odnosu na LA u jetri (od  $12,63 \pm 1,02$  na  $11,10 \pm 1,24$ ) i bubrežima (od  $9,73 \pm 1,23$  na  $6,23 \pm 1,59$ ) na osnovu vrednosti alkalne DNaze i istim organima ( $15,53 \pm 3,28$  na  $11,85 \pm 3,05$ –jetra i  $9,48 \pm 1,50$  na  $6,91 \pm 1,17$ –bubreg) na osnovu merenja kisele DNaze. Davanje  $\alpha$ -liponske kiseline i glutationa je pokazalo da oni dozirani samostalno ili kao suplementi štite od oksidativnog stresa izazvanog dejstvom bakra i da čuvaju antioksidativni mehanizam odbrane (Scott i sar., 1994).

Pacovi kao najosetljivije životinjske vrste pokazuju povišenu aktivnost endonukleaza jetre, bubrega, pankreas i mozga što se može smatrati biohemijskim markerom oksidativnog oštećenja pojedinih ćelija u homogenatima ispitivanih organa usled intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb i Cu). Do povećane aktivnosti DNaza koje se uključuju da bi sanirale i smanjile oštećenje u ispitivanim organima dolazi zbog rezultata inflamatornog odgovora u ćeliji izazvanog toksičnim dejstvom teških metala (Cd, Pb i Cu).

U današnje vreme predmet mnogih ispitivanja je zastupljenost antioksidanasa u hrani i terapiji mnogih bolesti. U ovoj studiji kao antioksidansi korišćeni su  $\alpha$ -liponska kiselina i glutation, koji pored svog antioksidativnog delovanja pokazuju da je i helator teških metala.

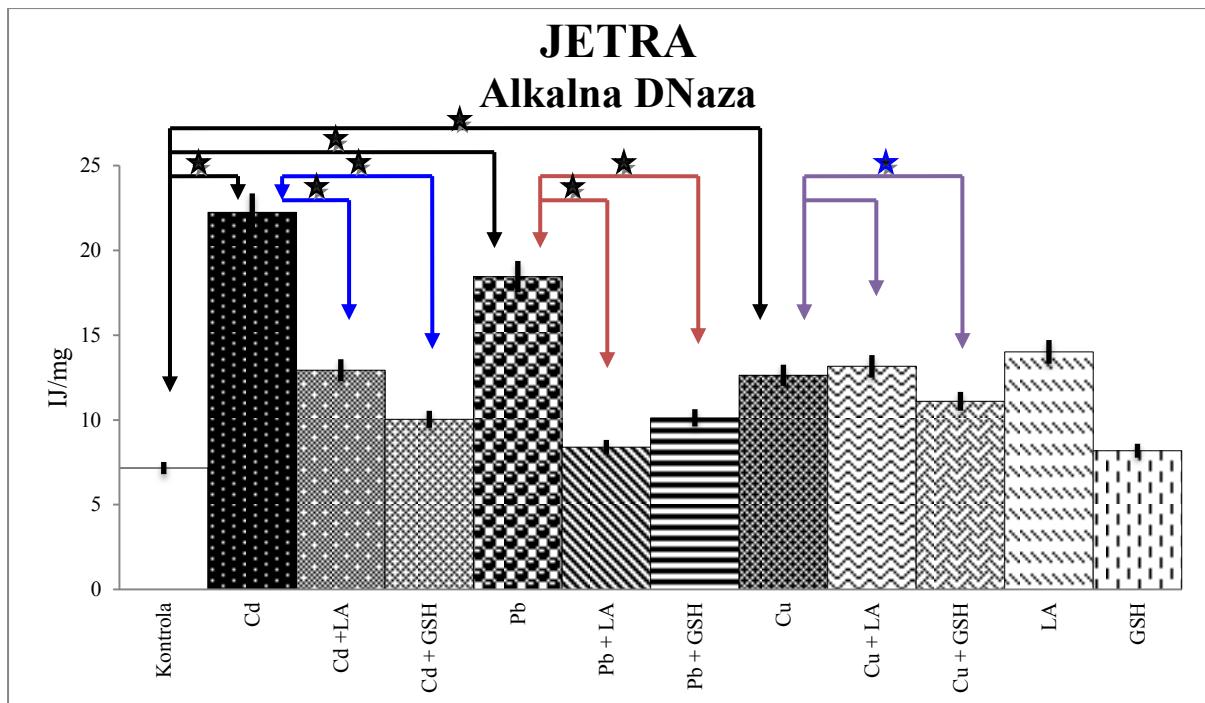
#### **4.3.1. Poređenje rezultata merenja aktivnosti endonukleaza (DNaza I i II) pojedinih organa u uslovima intoksikacije Cd, Pb i Cu**

Poređenje uticaja toksičnih metala (Cd, Pb i Cu) na aktivnost enzima kao i protektivna uloga suplemenata (LA i GSH) merena preko aktivnosti DNaza u homogenatu tkiva jednog

organa (jetra, bubreg, mozak ili pankreas) može se uočiti na slikama 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 i 4.14.

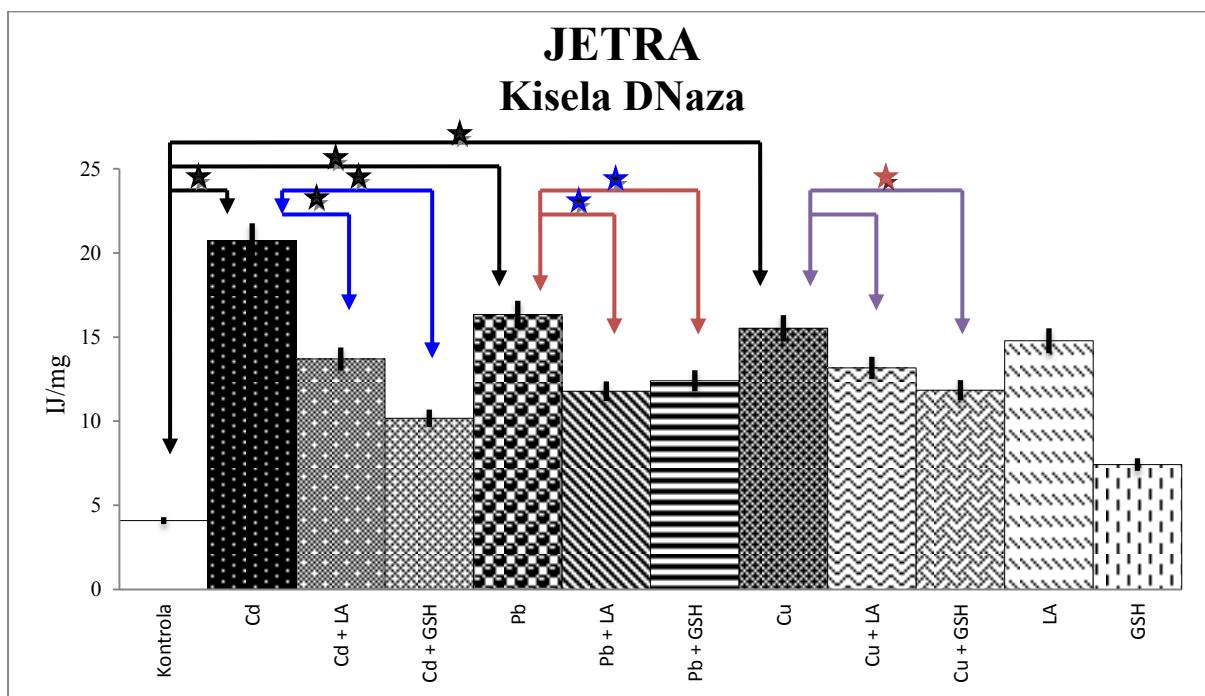
Na slikama 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 i 4.14. prikazani su uporedno rezultati nivoa aktivnosti alkalne i kisele DNaze u jetri u uslovima intoksikacije Cd, Pb i Cu i protektivna uloga suplemenata S-donor liganada LA i GSH. Sa slika 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 i 4.14. se vidi da kadmijum unet u organizam pacova stimuliše proizvodnju slobodnih radikala, što rezultira oksidativnim oštećenjem DNK i najvećim povećanjem vrednosti alkalne i kisele DNaze u jetri, zatim u pankreasu, a potom u bubregu u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja koja je bila na normalnom režimu ishrane i koja je u toku 21 dan dobijala 0,9% NaCl raspoređenih u 7 doza i.p. injekcijom. Najmanje vrednosti ovih endonukleaza iz dobijenih rezultata zapaćene su u mozgu što potvrđuje činjenicu da niska aktivnost DNaza ne dovodi do obnavljanja niti popravke DNK, tako da su promene ireverzibilne. Zato slobodni radikali, oksidativni stres i antoksidativna zaštita jesu važan aspekt istraživanja na model sistemima. Dodavanjem suplementa (LA ili GSH) kao protektora aktivnost DNaza I i II u bubregu, jetri, mozgu i pankreasu se smanjuje i približava vrednostima kontrolne grupe tivotinja, ali većim vrednostima od kontrolne grupe eksperimentalnih tivotinja, zbog prethodne intoksikacije teškim metalima (Pb, Cd, Cu). Glutation kao helatni agens sadrži tiolnu grupu preko koje formira merkaptidnu vezu sa jonima teških metala (Pb i Ag), ali i druge funkcionalne grupe sa –O i –N donor atomima preko kojih može da formira asocijate tipa kompleksnih čestica i tako umanji efekat njihovog toksičnog delovanja (Cu, Pb i Cd) i u određenoj meri eliminiše hepatotoksično i nefrotoksično dejstvo metala. 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 opada u nizu:  $Cd^{2+} > Pb^{2+} > Cu^+/Cu^{2+}$  (K. Poleć i sar., 2007).

Na ćelijskom nivou LA je dobar antioksidans. U ovom istraživanju aplikovanje LA značajno smanjuje aktivnost DNaza u pankreasu i mozgu, moguće zbog podstaknutih aktivnosti enzima antioksidativne zaštite kao što su superoksid-dizmutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT). Literaturni podaci se uglavnom odnose na efekte LA u sanaciji nitrozativnog stresa u dijabetesu, nefropatiji i koronarnoj bolesti (Gaurav i sar., 2010).



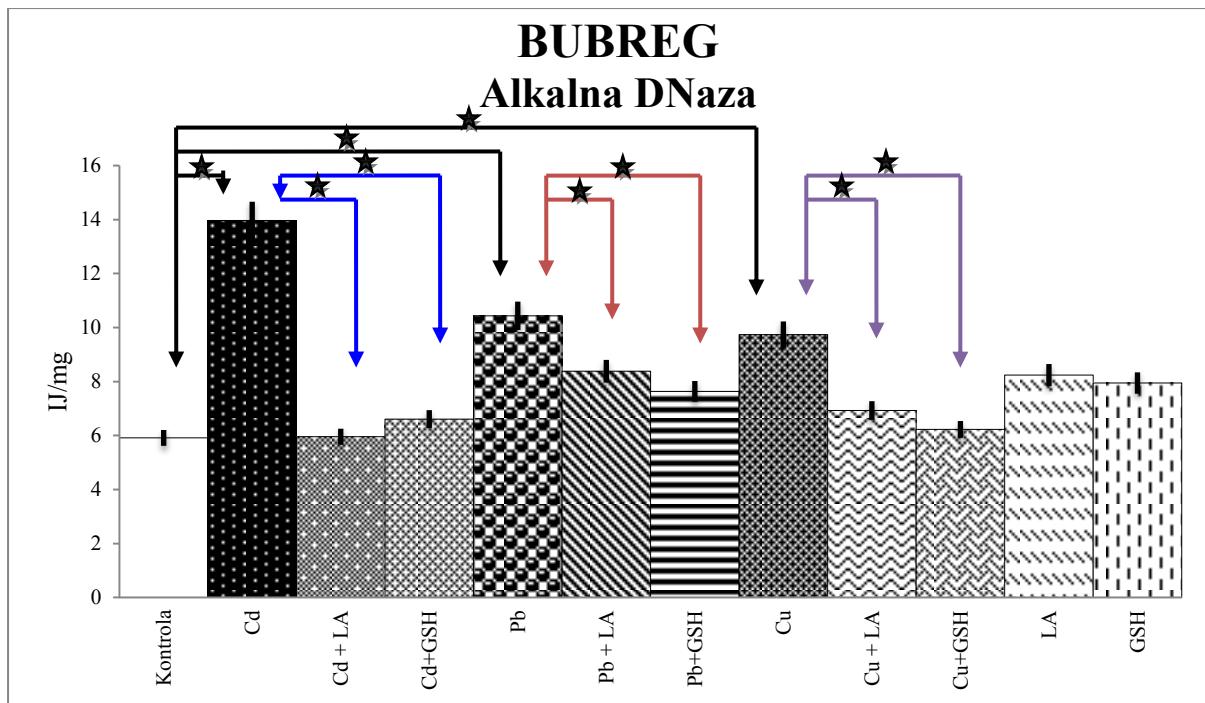
★ =  $p \leq 0,01$   
\* =  $p \leq 0,05$

Slika 4.7. Aktivnosti alkalne DNaze u jetri



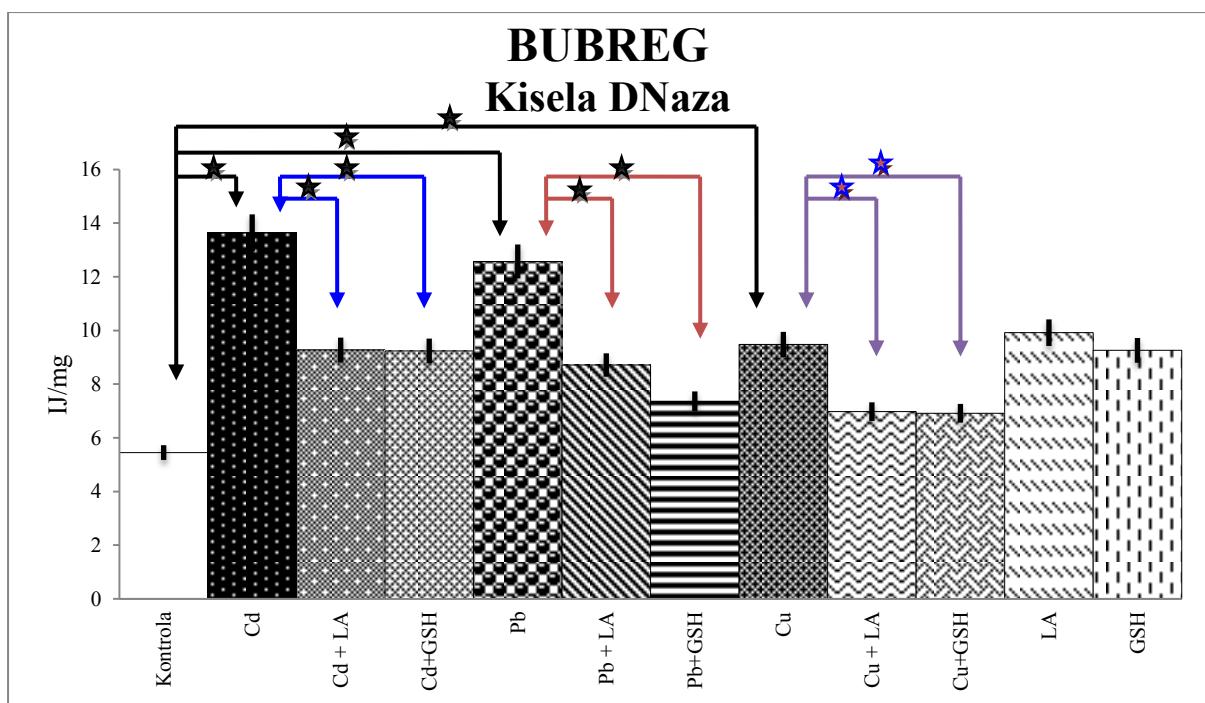
★ =  $p \leq 0,01$   
\* =  $p \leq 0,05$   
\* =  $p \leq 0,1$

Slika 4.8. Aktivnosti kisele DNaze u jetri



\* =  $p \leq 0,01$

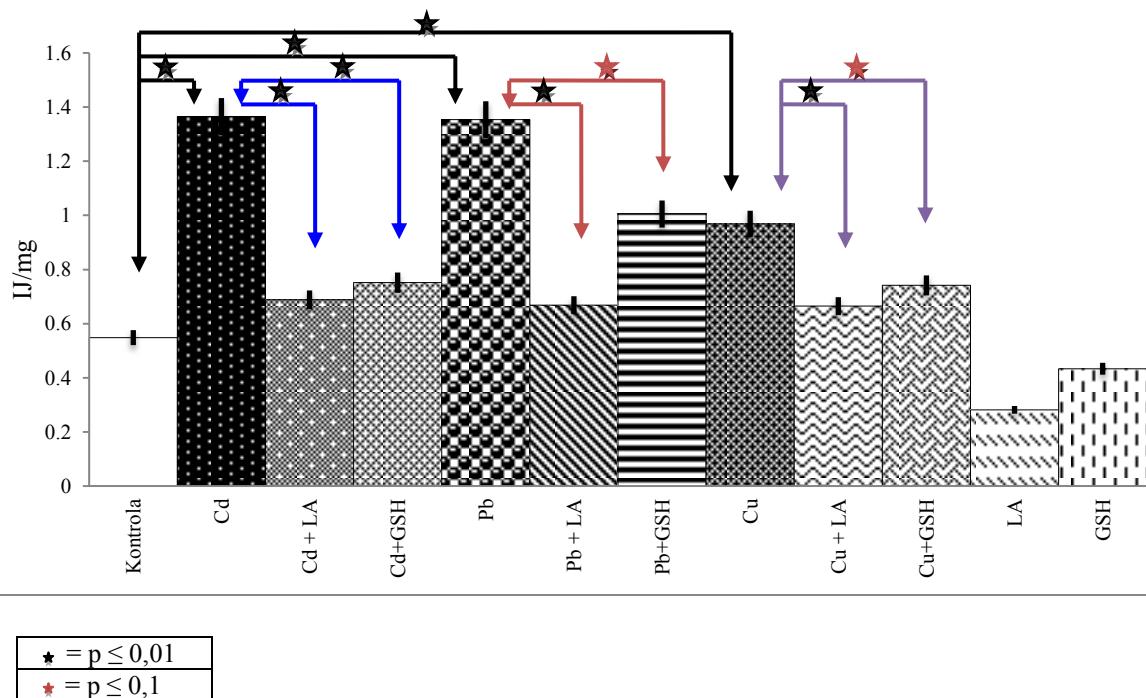
Slika 4.9. Aktivnosti alkalne DNaze u bubregu



\* =  $p \leq 0,01$   
\* =  $p \leq 0,05$

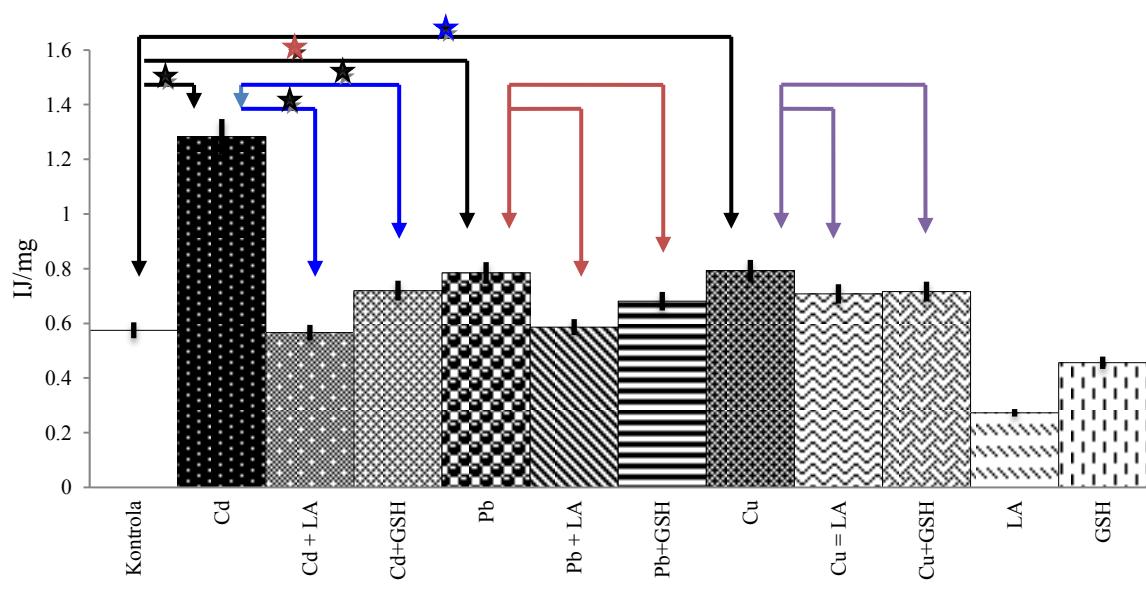
Slika 4.10. Aktivnosti kisele DNaze u bubregu

## MOZAK Alkalna DNaza



Slika 4.11. Aktivnosti alkalne DNaze u mozgu

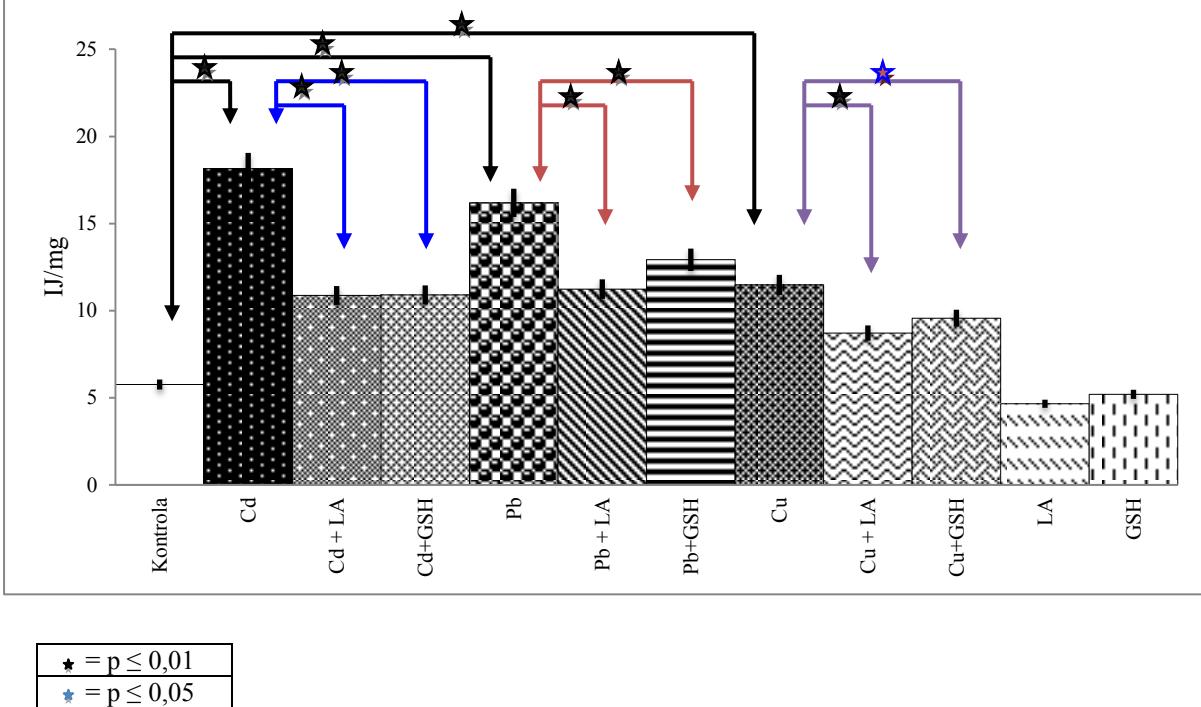
## MOZAK Kisela DNaza



★ = $p \leq 0,01$
▲ = $p \leq 0,05$
* = $p \leq 0,1$

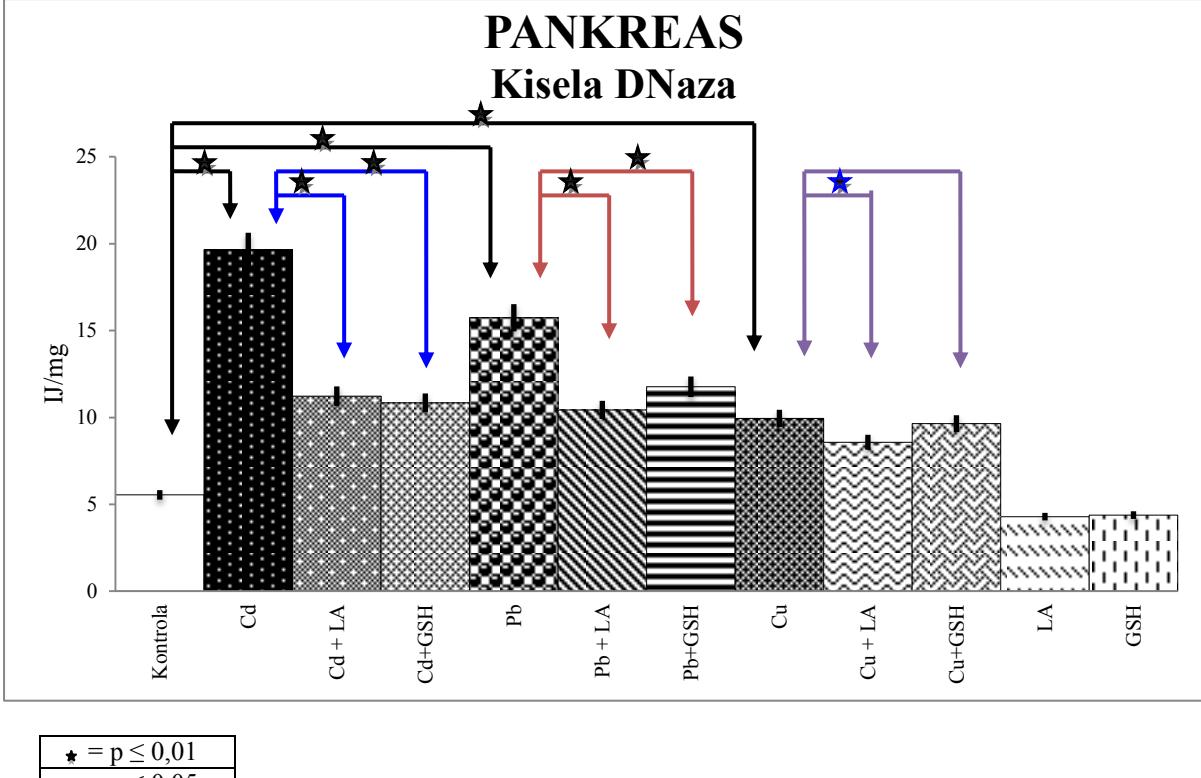
Slika 4.12. Aktivnosti kisele DNaze u mozgu

## PANKREAS Alkalna DNaza



Slika 4.13. Aktivnosti alkalne DNaze u pankreasu

## PANKREAS Kisela DNaza



Slika 4.14. Aktivnosti kisele DNaze u pankreasu

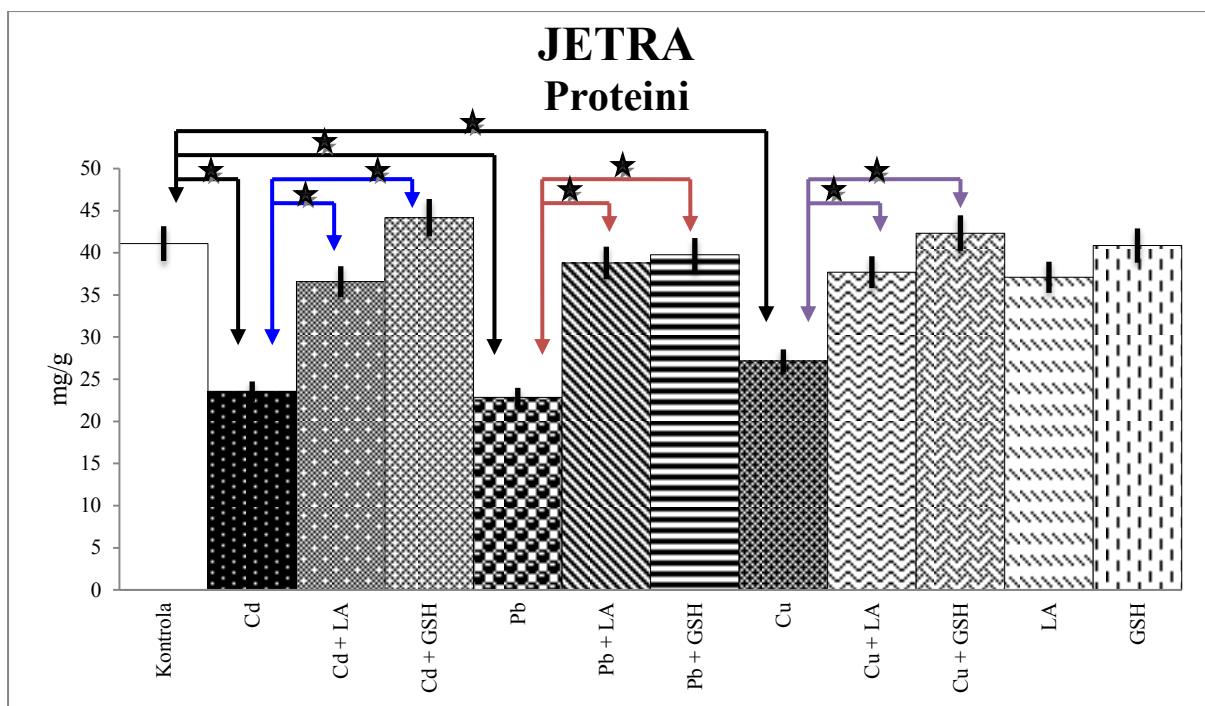
Rezultati ovog istraživanja ukazuju na statističku značajanost ( $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,1$ ) povećanja aktivnosti endonukleaza (DNaza I i II) eksperimentalne grupe tivotinja akutno intoksiciranih kadmijumom u odnosu na grupu Wistar pacova koja je bila na normalnom režimu tivota i ishrane. Iz histograma 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 i 4.14 koji predstavljaju aktivnost DNaza I i II u tkivima jetre, bubrega, pankreasa i mozga može se videti da kadmijum koji je dat eksperimentalnoj grupi tivotinja izaziva i do 3 puta veću aktivnost alkalne i kisele DNaze, zatim povećanje aktivnosti endonukleaza je izraženo i kod eksperimentalne grupe tivotinja hronično intoksicirane olovom ali u manjoj meri, dok je hronična intoksikacija Wistar pacova bakrom dala najmanje povećanje aktivnosti DNaza. To verovatno ukazuje na stvaranje slobodnih kiseoničnih radikala usled intoksikacije teškim metalima sa posledicom oksidativnog oštećenja molekula DNK pri čemu će se povećati aktivnost endonukleaza koje učestvuju u reparaciji oštećenog molekula. Dodatkom suplemenata LA i GSH kod eksperimentalnih grupa tivotinja intoksiciranih teškim metalima aktivnost DNaza I i II u jetri se vidno smanjuje kod eksperimentalnih grupa tivotinja intoksiciranih kadmijumom i olovom. To je verovatno zbog mogućeg kompleksiranja metala sa dodatim suplementima. Blokiranjem jona metala smanjuje se njihova efektivna koncentracija u ispitivanim fiziološkim sistemima što se manifestuje smanjenim stvaranjem slobodnih radikala, smanjenim oštećenjem molekula DNK i smanjenom aktivnošću endonukleaza.

LA dozirana samostalno, takođe povećava aktivnost DNaza jetre i bubrega u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja. U tkivima mozga i pankreasa zapaženo je smanjenje aktivnosti DNaze I i II pri samostalnoj aplikaciji LA i GSH u odnosu na eksperimentalnu grupu tivotinja na normalnom režimu tivota i ishrane. Na osnovu iznetih eksperimentalnih podataka, može se pretpostaviti da su -S donor ligandi (LA i GSH) potencijalno interesantni u prevenciji i lečenju nekih patoloških stanja i bolesti.

Ova studija na eksperimentalnim tivotnjama, kao model sistemu za ispitivanje izloženosti toksičnom dejству olova, kadmijuma i bakra pokazala je da sistematsko izlaganje uticaju ovih metala ima za posledicu višestruko povećane nivoje endonukleaza tako da isti mogu biti pokazatelji negativnih efekata izloženosti uticaju toksičnih metala. Ovi nepoželjni efekti se mogu uspešno smanjiti pomoću liponske kiseline i glutationa koji se mogu dodavati uz redovnu ishranu kao suplementi u slučaju intoksikacije Cd, Pb i Cu. Rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da se Pb, Cd i Cu delom akumuliraju u jetri i bubrežima i da se taj efekat njihovog prisustva i toksičnog delovanja može pratiti preko aktivnosti endonukleaza jetre, pankreasa, mozga i bubrega putem kisele i alkalne DNaze.

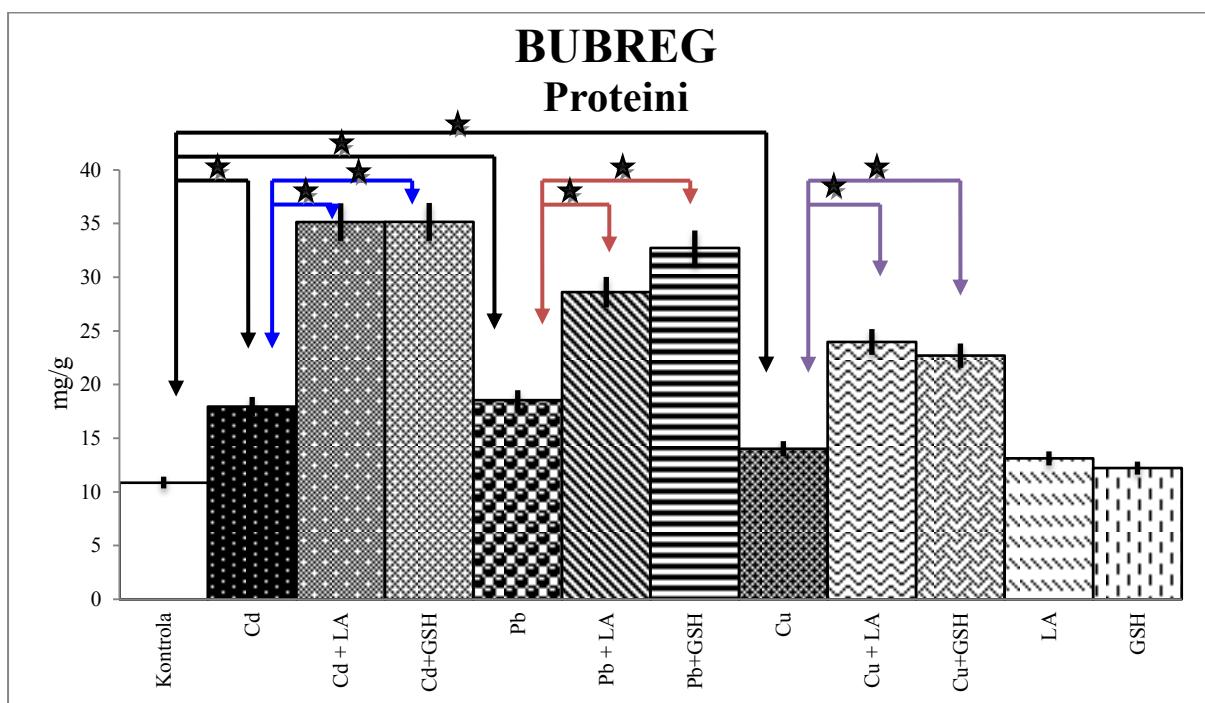
#### **4.3.2. Merenje vrednosti proteina u ispitivanim organima**

Izračunavanje sadržaja proteina u tkivima pojedinih organa (jetra, bubreg, mozak i pankreas) je važan parametar u postupku merenja aktivnosti DNaza (alkalne i kisele) jer je sadržaj proteina jedan od pokazatelja aktivnosti DNaza. Nivo proteina može biti značajan biohemski parametar koji se može primeniti za dijagnozu i prognozu mnogih bolesti. 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 istih u prisustvu suplemenata se donekle normalizuje u odnosu na kontrolnu grupu što uslovljava trend promene vrednosti DNaza. Smanjenje koncentracije proteina u homogenatima ispitivanih organa (jetri, bubregu, mozgu i pankreasu) usled akutne i hronične intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb i Cu) ukazuje na negativan azotni bilans, dok povišene vrednosti u ispitivanim organima pri aplikovanju suplemenata ( $\alpha$ -liponske kiseline i glutationa) ukazuju na pozitivan azotni bilans i na 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 histogramima 4.15, 4.16, 4.17, i 4.18.



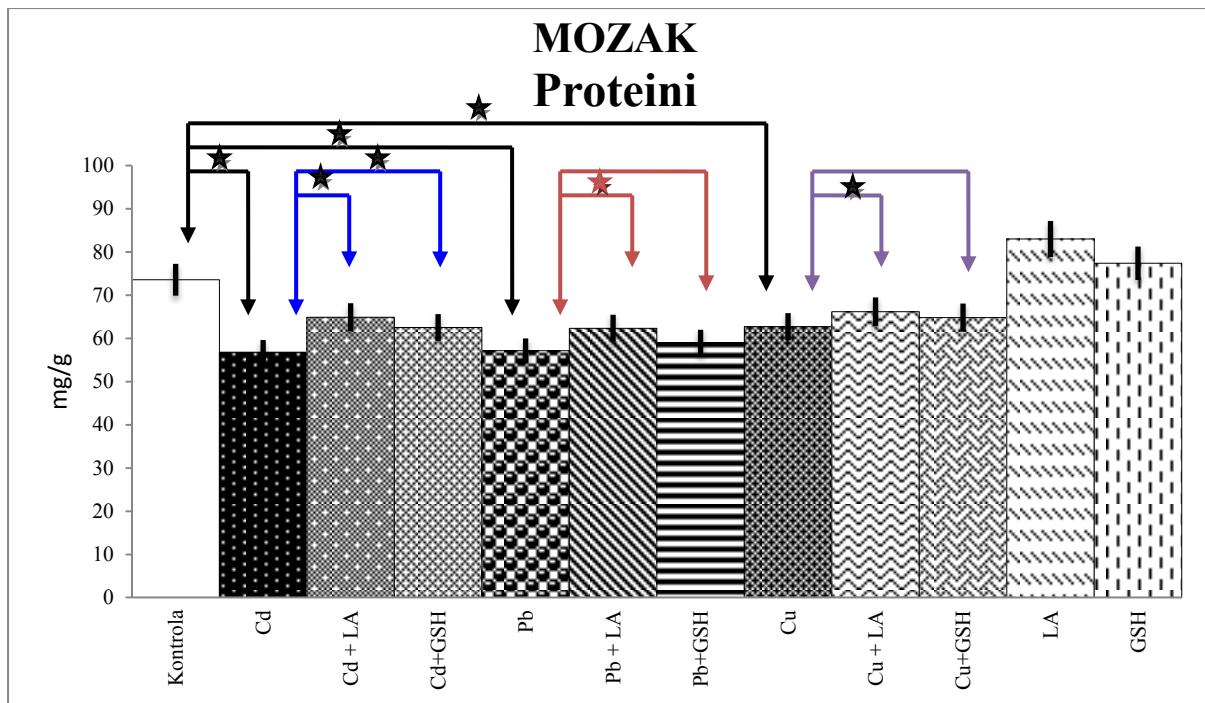
★ =  $p \leq 0,01$

**Slika 4.15.** Vrednosti koncentracije proteina u jetri



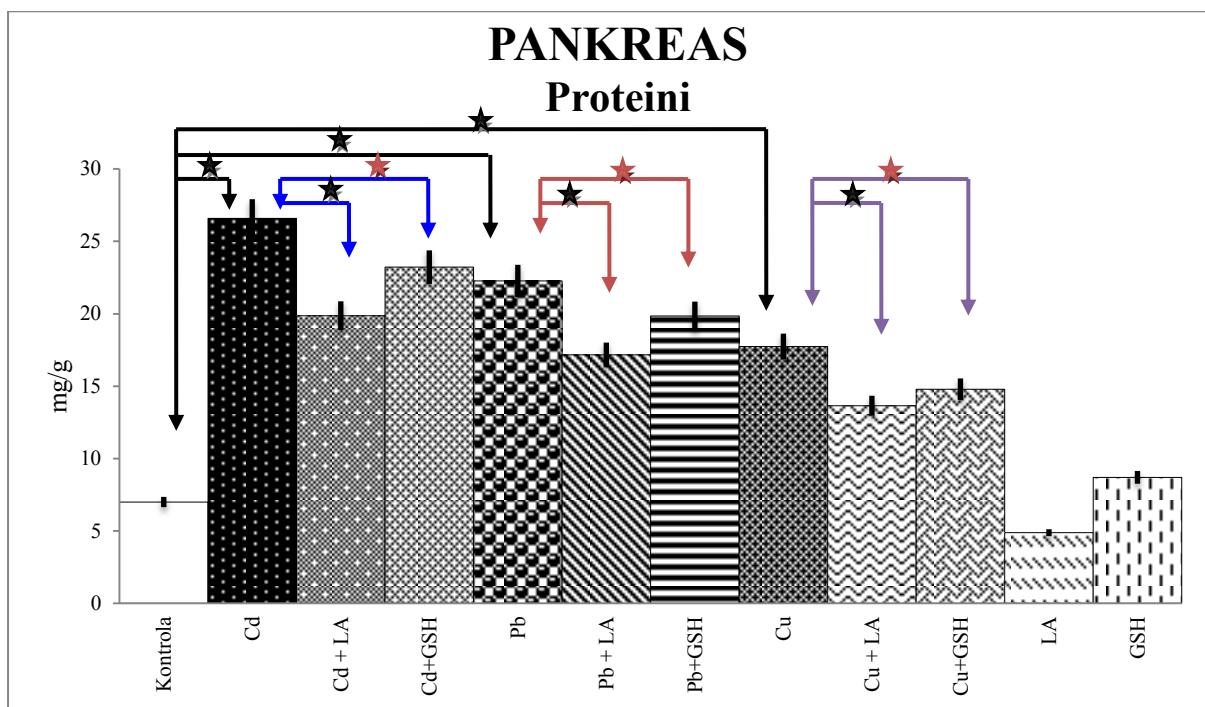
★ =  $p \leq 0,01$

**Slika 4.16.** Vrednosti koncentracije proteina u bubregu



★ =  $p \leq 0,01$   
★ =  $p \leq 0,1$

Slika 4.17. Vrednosti koncentracije proteina u mozgu



★ =  $p \leq 0,01$   
★ =  $p \leq 0,1$

Slika 4.18. Vrednosti koncentracije proteina u pankreasu

## **4.4. Dejstvo metala i suplemenata na koncentraciju malondialdehida (MDA) u pojedinim organima**

Lipidna peroksidacija je pokazatelj oksidativnog stresa u ćelijama i tkivima. U procesu lipidne peroksidacije degradiraju se nezasićene masne kiseline ćelijskih membrana što dovodi do oštećenja istih i smanjenja aktivnosti enzima vezanih za ćelijske membrane (glukozo-6-fosfataza i citohrom P-450) (Yoshikawa i sar., 2000). Rezultati merenja vrednosti malondialdehida (MDA), sekundarnog produkta lipidne peroksidacije koji se koristi kao indikator za praćenje oštećenja ćelijskih membrana kod oksidativnog stresa, u pojedinim organima (jetri, bubregu, mozgu i pankreasu) dati su u tabelama 4.9. i 4.10.

*Rezultati akutne intoksikacije albino pacova Wistar soja kadmijum(II)-hloridom s.c. injekcijom u subletalnoj dozi u toku 5 dana prikazani su u tabeli 4.9.*

Iz ovih rezultata se vidi da se u uslovima akutne intoksikacije kadmijumom nivo MDA povećava u odnosu na kontrolnu grupu ćivotinja 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  $1,83 \pm 0,19$ ), u mozgu (od  $1,01 \pm 0,10$  na  $3,08 \pm 0,46$ ) i u pankreasu (od  $0,75 \pm 0,18$  na  $2,92 \pm 0,43$ ). 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 ćivotnoj sredini je izlaganje pacova kadmijumu u dozi od  $0,9 \text{ mg/kg}$  što je niže od ekspozicije ovom metalu u visoko zagađenim sredinama (World Health Organization, 1992; Chalkley i sar., 1998).

U grupi eksperimentalnih ćivotinja 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, od  $3,08 \pm 0,46$  na  $2,49 \pm 0,48$  u mozgu i od  $2,92 \pm 0,43$  na  $0,96 \pm 0,25$  u pankreasu) u odnosu na grupu koja je trovana kadmijumom, što se može videti u tabeli 4.9.

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 prooksidativno 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 intoksikacije pacova kadmijumom.

Iz ovih rezultata iz tabele 4.9. može da se vidi da u grupi eksperimentalnih životinja u kojoj je uz kadmijum aplikovana  $\alpha$ -liponska kiselina kao suplement značajno je smanjena koncentracija TBARS (od  $2,20 \pm 0,22$  na  $0,99 \pm 0,08$  u jetri, od  $1,83 \pm 0,19$  na  $0,62 \pm 0,14$  u bubrežima, od  $3,08 \pm 0,46$  na  $2,43 \pm 0,22$  u mozgu i od  $2,92 \pm 0,43$  na  $1,27 \pm 0,36$  u pankreasu) u odnosu na grupu koja je trovana kadmijumom.

**Tabela 4.9.** Nivo malondialdehida (MDA) u različitim organima u uslovima a) akutne intoksikacije kadmijumom i protektivna uloga suplemenata

Eksperimentalne Grupe n=6	MDA [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ]			
	Jetra	Bubreg	Mozak	Pankreas
Kontrola	$0,45 \pm 0,14$	$0,48 \pm 0,06$	$1,01 \pm 0,10$	$0,75 \pm 0,18$
Kadmijum (Cd)	$2,20 \pm 0,22$	$1,83 \pm 0,19$	$3,08 \pm 0,46$	$2,92 \pm 0,43$
Cd + LA	$0,99 \pm 0,08$	$0,62 \pm 0,14$	$2,43 \pm 0,22$	$1,27 \pm 0,36$
Cd + GSH	$1,06 \pm 0,08$	$0,58 \pm 0,20$	$2,49 \pm 0,48$	$0,96 \pm 0,25$
LA	$0,23 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,11$	$0,68 \pm 0,17$	$0,62 \pm 0,04$
GSH	$0,40 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,16$	$0,77 \pm 0,15$	$0,41 \pm 0,04$

Prema literaturnim podacima liponska kiselina se oksiduje u dihidroliponsku kiselinu posredstvom dihidrolipoamid dehidrogenaze, koja kao koenzim u jetri poseduje NADPH ili NADH, dok je u srcu, mozgu i bubrežima prisutniji NADH koenzim čak 70-90%. Redukovana forma liponske kiseline ima sposobnost da regeneriše oksidovani glutation, vitamin C i vitamin E, što je od egzistencijalnog značaja za održanje redoks celijskog statusa

(Da Ros i sar., 2005; Stoyanovsky i sar., 2005). Aplikacija  $\alpha$ -liponske kiseline verovatno smanjuje stvaranje slobodnih radikala i na taj način sprečava oštećenja tkiva slobodnim radikalima. Obzirom da se podaci u literaturi odnose na efekte liponske kiseline u sanaciji nitrozativnog stresa u dijabetesu, nefropatiji ili koronarnoj bolesti, podaci dobijeni u ovoj studiji ukazuju na moguću aplikaciju liponske kiseline u stanjima oštećenja jetre, bubrega i pankreasa izazvanih intoksikacijom teškim metalom (kadmijumom). Činjenica da dolazi do smanjenja nivoa TBARS kao direktnog pokazatelja lipidne peroksidacije, ukazuje i na to da je LA u stanju da smanji nivo nus produkata negativnog delovanja teških metala.

Sumarno na osnovu rezultata iz tabele 4.9. vidi se da LA ispoljava bolje protektivno dejstvo u jetri što se može zaključiti na osnovu nivoa TBARS u jetri (od  $2,20 \pm 0,22$  na  $0,99 \pm 0,08$ ), dok je koncentracija TBARS u mozgu približno jednaka i pri dodavanju LA (od  $3,08 \pm 0,46$  na  $2,43 \pm 0,22$ ) ili GSH (od  $3,08 \pm 0,46$  na  $2,49 \pm 0,48$ ). Merenjem koncentracije TBARS u bubregu i pankreasu može se reći da glutation ispoljava bolju protektivnu ulogu u odnosu na LA (od  $1,83 \pm 0,19$  na  $0,58 \pm 0,20$  u bubregu i od  $2,92 \pm 0,43$  na  $0,96 \pm 0,25$  u pankreasu).

*Rezultati merenja nivoa lipidnih peroksidova (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 4.10.*

Iz ovih rezultata vidi se da se u uslovima hronične intoksikacije olovom nivo MDA povećava u odnosu na kontrolnu grupu ţivotinja i to u jetri (od  $0,45 \pm 0,14$  na  $2,48 \pm 0,23$ ), u bubregu (od  $0,48 \pm 0,06$  na  $1,49 \pm 0,38$ ), u mozgu (od  $1,01 \pm 0,10$  na  $2,72 \pm 0,35$ ) i u pankreasu (od  $0,75 \pm 0,18$  na  $2,34 \pm 0,32$ ).

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 Druge i sar., 1994. dovodi do kaskadnih reakcija aktiviranja ćelija imunskog sistema (Druge i sar., 1994). 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.

**Tabela 4.10.** Nivo malondialdehida (MDA) u različitim organima u uslovima hronične intoksikacije olovom i protektivna uloga suplemenata

Eksperimentalne Grupe n=6	MDA [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ]			
	Jetra	Bubreg	Mozak	Pankreas
Kontrola	$0,45 \pm 0,14$	$0,48 \pm 0,06$	$1,01 \pm 0,10$	$0,75 \pm 0,18$
Oovo (Pb)	$2,48 \pm 0,23$	$1,49 \pm 0,38$	$2,72 \pm 0,35$	$2,34 \pm 0,32$
Pb + LA	$1,18 \pm 0,22$	$0,81 \pm 0,20$	$1,95 \pm 0,10$	$1,38 \pm 0,21$
Pb + GSH	$1,24 \pm 0,18$	$0,71 \pm 0,18$	$2,29 \pm 0,18$	$0,96 \pm 0,20$
LA	$0,23 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,11$	$0,68 \pm 0,17$	$0,62 \pm 0,04$
GSH	$0,40 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,16$	$0,77 \pm 0,15$	$0,41 \pm 0,04$

Poznato je da oovo ima toksični uticaj na ćelijske membrane i njene funkcije (npr. membrane mitohondrija, 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. Nakon izlaganja esencijalnih masnih kiselina uticaju oova, sa povećanjem broja dvostrukih veza povećava se koncentracija finalnog proizvoda oksidativnog stresa, MDA. Oovo može i direktno da se vezuje za ćelijske membrane čime se povećava osjetljivost membrane na lipidnu peroksidaciju (Quinlan i sar., 1988). Oovo može da izmeni i biološki antioksidativni odbrambeni sistem jer posredno doprinosi produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta (poglavlje 2.1.3.).

U grupi eksperimentalnih ćivotinja u kojoj je uz oovo aplikovan i glutation kao suplement značajno je smanjena koncentracija TBARS (od  $2,48 \pm 0,23$  na  $1,24 \pm 0,18$  u jetri, od  $1,49 \pm 0,38$  na  $0,71 \pm 0,18$  u bubrežima, od  $2,72 \pm 0,35$  na  $2,29 \pm 0,18$  u mozgu i od  $2,34 \pm 0,32$  na

$0,96 \pm 0,20$  u pankreasu) u odnosu na grupu koja je trovana olovom, što se može videti u tabeli 4.10.

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.

U grupi eksperimentalnih životinja u kojoj je uz olovo aplikovana  $\alpha$ -liponska kiselina kao suplement značajno je smanjena koncentracija TBARS (od  $2,48 \pm 0,23$  na  $1,18 \pm 0,22$  u jetri, od  $1,49 \pm 0,38$  na  $0,81 \pm 0,20$  u bubrežima, od  $2,72 \pm 0,35$  na  $1,95 \pm 0,10$  u mozgu i od  $2,34 \pm 0,32$  na  $1,38 \pm 0,21$  u pankreasu) u odnosu na grupu koja je trovana olovom, što se može videti u tabeli 4.10.

Oficijalni terapijski pristup trovanju olovom zasniva se na helacionoj terapiji i povećanju ekskrecije olova pomoću helata odnosno molekula koji su polidentatni ligandi koji sa metalima ostvaruju efikasnu kordinaciju M-L i grade stabilne helatne komplekse preko kojih se metal ekskretuje iz organizma. Suplementacija  $\alpha$ -liponskom kiselinom dan posle intoksikacije olovom (u molskom odnosu M:LA=1:2), u ovoj studiji signifikantno redukuje nivo lipidnih peroksida tj. vrednost MDA, što ukazuje na supresiju nastanka slobodnih radikala i smanjenju nastanka oksidativnog oštećenja tkiva (jetre, pankreasa, mozga i bubreža). LA se može svrstati u antioksidativna jedinjenja jer povećava antioksidativni odgovor u ćelijama i tkivima nakon trovanja toksičnim metalima.

Sumarno na osnovu rezultata iz tabele 4.10. LA kao suplement ispoljava bolje protektivno dejstvo u mozgu što se može zaključiti merenjem koncentracije TBARS u mozgu (od  $2,72 \pm 0,35$  na  $1,95 \pm 0,10$ ), dok su vrednosti nivoa MDA u jetri približno jednake i pri dodavanju LA (od  $2,48 \pm 0,23$  na  $1,18 \pm 0,22$ ) ili GSH (od  $2,48 \pm 0,23$  na  $1,24 \pm 0,18$ ). Merenjem koncentracije TBARS u bubrežu i pankreasu GSH kao suplement (aplikovan u istom molskom odnosu) bi bio bolji protektor u odnosu na LA (od  $1,49 \pm 0,38$  na  $0,71 \pm 0,18$  u bubrežima i od  $2,34 \pm 0,32$  na  $0,96 \pm 0,20$  u pankreasu).

**Tabela 4.11.** Nivo malondialdehida (MDA) u različitim organima u uslovima hronične intoksikacije bakrom i protektivna uloga suplemenata

Eksperimentalne Grupe n=6	MDA [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ]			
	Jetra	Bubreg	Mozak	Pankreas
Kontrola	$0,45 \pm 0,14$	$0,48 \pm 0,06$	$1,01 \pm 0,10$	$0,75 \pm 0,18$
Bakar (Cu)	$1,67 \pm 0,35$	$1,00 \pm 0,39$	$2,03 \pm 0,16$	$2,03 \pm 0,16$
Cu + LA	$1,02 \pm 0,26$	$0,74 \pm 0,28$	$1,47 \pm 0,18$	$1,31 \pm 0,33$
Cu + GSH	$0,98 \pm 0,31$	$0,66 \pm 0,20$	$1,59 \pm 0,12$	$1,01 \pm 0,19$
LA	$0,23 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,11$	$0,68 \pm 0,17$	$0,62 \pm 0,04$
GSH	$0,40 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,16$	$0,77 \pm 0,15$	$0,41 \pm 0,04$

*Rezultati merenja nivoa lipidnih peroksidova (MDA) u uslovima hronične intoksikacije Wistar pacova bakar(II)-sulfatom s.c. injekcijom subletalnom dozom u toku 21 dan prikazani su u tabeli 4.11.*

Efekti toksičnog delovanja bakra u ovom radu su praćeni merenjem nivoa malondialdehida (MDA), sekundarnog produkta lipidne peroksidacije. Bakar kao redoks aktivni metal može katalizirati formiranje slobodnih radikala kao što su hidroksil, peroksil i alkoksil radikal, koji izazivaju oksidativni stres i povećavaju proces lipidne peroksidacije. Joni bakra preko produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta i oksidacije lipida mogu da dovedu do apoptoze i nekroze pojedinih ćelija i tkiva. MDA kao krajnji produkt lipidne peroksidacije povećava se sa povećanjem doze bakra i vremena ekspozicije. Povišene vrednosti koncentracije MDA mogu se koristiti kao biomarkeri lipidne peroksidacije.

Iz ovih rezultata iz tabele 4.11. vidi se da se u uslovima hronične intoksikacije Cu nivo MDA povećava u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja i to u jetri (od  $0,45 \pm 0,14$  na  $1,67 \pm 0,35$ ), u bubregu (od  $0,48 \pm 0,06$  na  $1,00 \pm 0,39$ ), u mozgu (od  $1,01 \pm 0,10$  na  $2,03 \pm 0,16$ ) i u pankreasu (od  $0,75 \pm 0,18$  na  $2,03 \pm 0,16$ ). Posmatrajući vrednosti MDA u raznim organima

(jetra, bubrezi, mozak i pankreas) prikazanim u tabelama 4.11. zapaćen je najveći porast sekundarnog produkta lipidne peroksidacije u jetri kod pacova koji su hronično intoksicirani CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O s.c. injekcijom subletalnom dozom u toku 21 dan (3,5 puta veći je u odnosu na kontrolnu grupu eksperimentalnih tijovinja na normalnom rečimu ishrane koja nije dobijala ni metale ni suplemente), što se objašnjava činjenicom da je jetra ciljani organ za toksično dejstvo bakra. Analizirajući rezultate ovog rada zapaćeno je da su vrednosti MDA u tkivu bubrega kod pacova koji su dobijali bakar dva puta veće od vrednosti istih u kontrolnoj grupi. Zapaćeno je da nivo MDA u homogenatima svih tkiva jetre, bubrega, pankreasa i mozga je značajno smanjen kod pacova koji su uz bakar dobijali i suplement, LA ili GSH, dan nakon izlaganja bakru.

Ispitivanjem zaštitnog efekta suplemenata,  $\alpha$ -liponske kiseline ili glutationa, smatra se da se bakar vezuje preko –N (najčešće) i –O donor atoma za suplemente i formira sa njima komplekse koji verovatno smanjuju toksično dejstvo bakra na tkivo jetre, bubrega, mozga i pankreasa jer smanjuju nivo MDA u pomenutim organima tj. sprečavaju proces lipidne peroksidacije koji je izazvan dejstvom bakra i stvorenim slobodnim kiseoničnim radikalima.

U grupi eksperimentalnih tijovinja u kojoj je uz bakar aplikovan i glutation kao suplement značajno je smanjena koncentracija TBARS (od 1,67±0,35 na 0,98±0,31 u jetri, od 1,00±0,39 na 0,66±0,20 u bubregu, od 2,03±0,16 na 1,59±0,12 u mozgu i od 2,03±0,16 na 1,01±0,19 u pankreasu) u odnosu na grupu koja je trovana bakrom, što se može videti u tabeli 4.11.

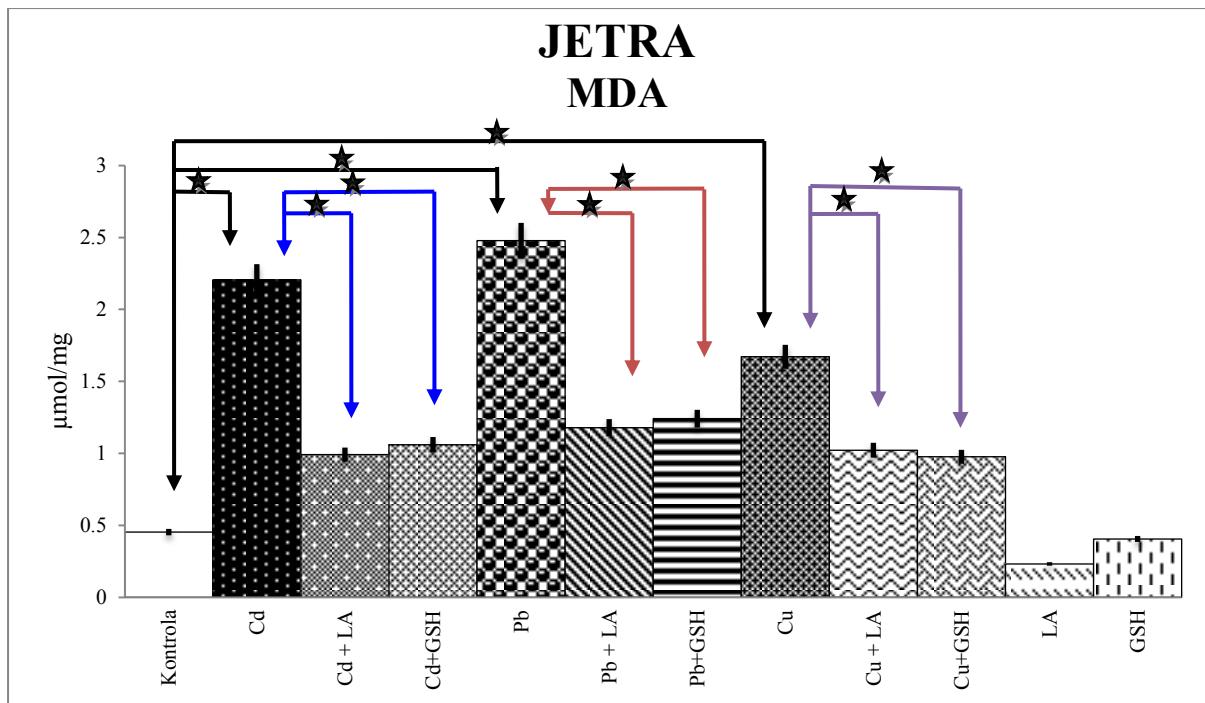
U grupi eksperimentalnih tijovinja u kojoj je uz bakar aplikovana  $\alpha$ -liponska kiselina kao suplement značajno je smanjena koncentracija TBARS (od 1,67±0,35 na 1,02±0,26 u jetri, od 1,00±0,39 na 0,74±0,28 u bubrežima, od 2,03±0,16 na 1,47±0,18 u mozgu i od 2,03±0,16 na 1,31±0,33 u pankreasu) u odnosu na grupu koja je trovana olovom, što se može videti u tabeli 4.11.

Sumarno na osnovu rezultata iz tabele 4.11. LA kao suplement ispoljava bolje protektivno dejstvo u mozgu što se može zaključiti merenjem koncentracije TBARS u mozgu (od 2,03±0,16 na 1,47±0,18), dok su vrednosti nivoa MDA u jetri približno jednake i pri dodavanju LA (od 1,67±0,35 na 1,02±0,26) ili GSH (od 1,67±0,35 na 0,98±0,31). Merenjem koncentracije TBARS u bubregu i pankreasu GSH kao suplement važi za boljeg protektora u odnosu na LA (od 1,00±0,39 na 0,66±0,20 u bubrežima i od 2,03±0,16 na 1,01±0,19 u pankreasu).

*Teški metali (kadmijum, olovo i bakar) daju generalnu toksičnost u pogledu povećanja vrednosti malondialdehida, produkta lipidne peroksidacije u tkivima (jetri, mozgu, pankreasu i bubregu).*

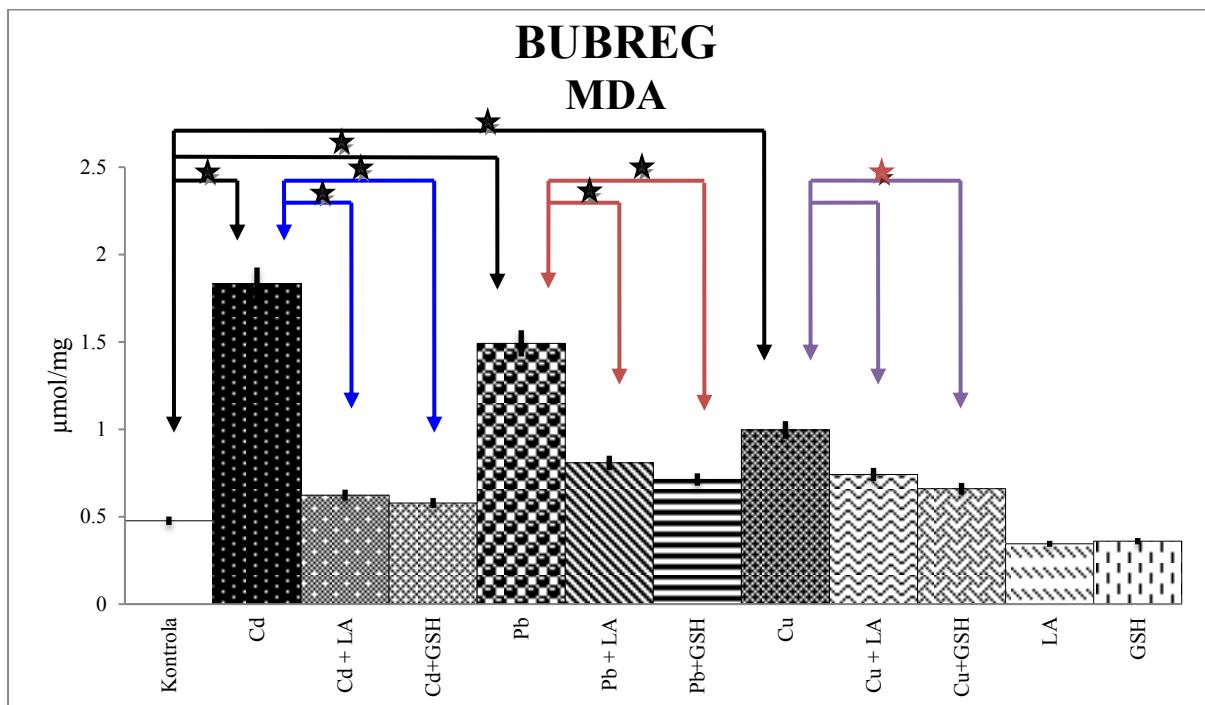
Sa slike 4.19. se vidi da postoji statistička značajnost ( $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,05$  i  $p \leq 0,1$ ) između eksperimentalne grupe koja je intoksicirana teškim metalima (npr. kadmijum, bakrom i olovom) u odnosu na eksperimentalnu grupu koja je bila na normalnom režimu života i ishrane. Najveća koncentracija sekundarnog produkta lipidne peroksidacije, malondialdehida, je izmerena u tkivu jetre nakon intoksikacije olovom i to 6 puta su više vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Potom za eksperimentalnu grupu koja je akutno intoksicirana kadmijumom 5 puta su više vrednosti, dok su kod eksperimentalne grupe životinja posle intoksikacije bakrom vrednosti MDA za oko 5 puta veće u odnosu na kontrolnu grupu. U tkivu bubrega, mozga i pankreasa najveću toksičnost u pogledu vrednosti MDA ispoljava kadmijum, potom olovo pa zatim bakar. Davanje suplemenata LA i GSH, dan nakon intoksikacije teškim metalom, dovodi do smanjenja vrednosti MDA u svim tkivima, što se može videti iz histograma 4.19, 4.20, 4.21 i 4.22.

Povećane vrednosti MDA, kao biohemiskog markera oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana, ukazuje na pojačan proces lipidne peroksidacije koja je prisutna u homogenatima tkiva jetre, bubrega, mozga i pankreasa usled akutne i hronične intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb i Cu) kao i smanjenje koncentracije sekundarnog produkta lipidne peroksidacije (MDA) u slučajevima kada su eksperimentalne životinje dobijale suplement  $\alpha$ -liponsku kiselinu i glutation. Proces lipidne peroksidacije leži u osnovi mnogih patoloških stanja i bolesti.



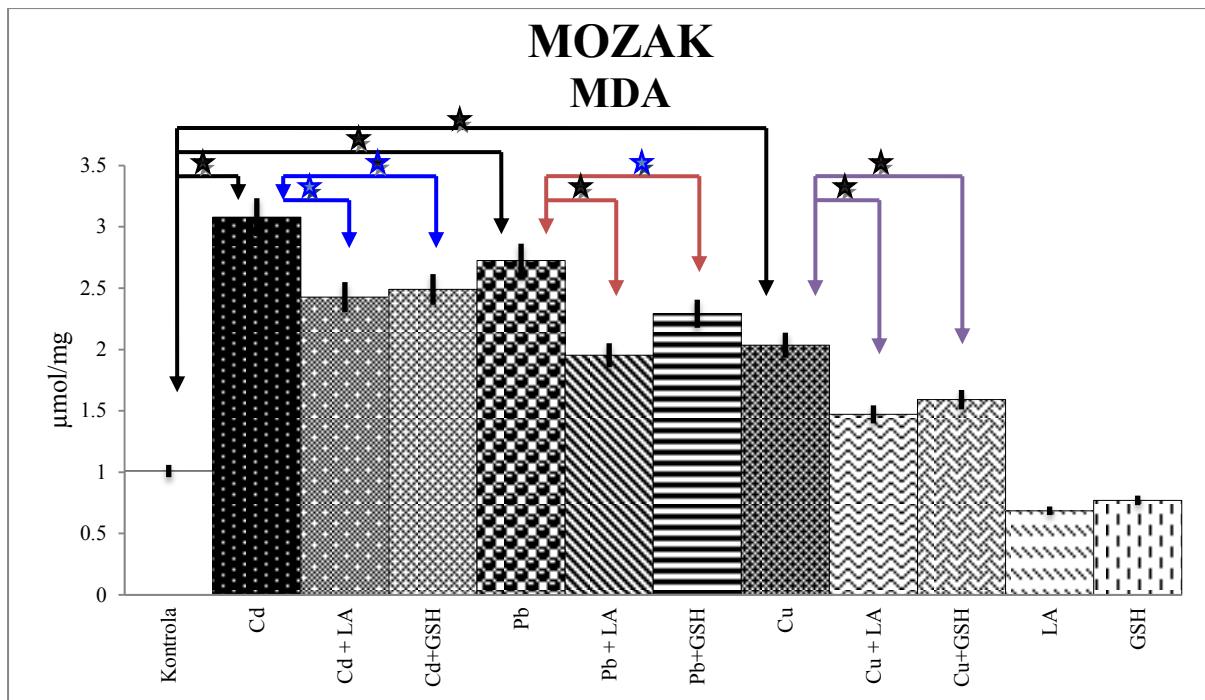
★ =  $p \leq 0,01$

Slika 4.19. Vrednosti koncentracije malondialdehida u jetri



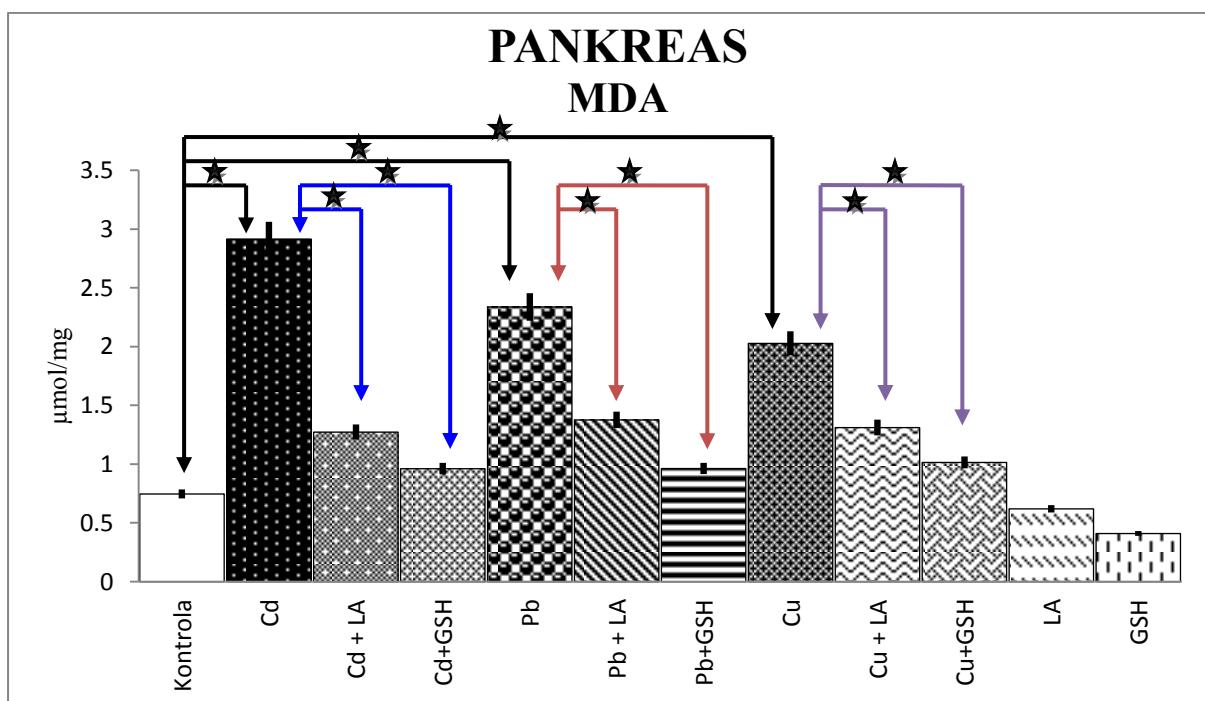
★ =  $p \leq 0,01$   
\* =  $p \leq 0,1$

Slika 4.20. Vrednosti koncentracije malondialdehida u bubregu



★ =  $p \leq 0,01$   
 \* =  $p \leq 0,05$

**Slika 4.21.** Vrednosti koncentracije malondialdehida u mozgu



★ =  $p \leq 0,01$

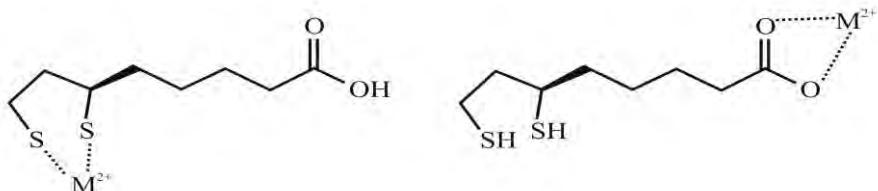
**Slika 4.22.** Vrednosti koncentracije malondialdehida u pankreasu

## 4.5. Sadržaj teških metala u ispitivanim organima

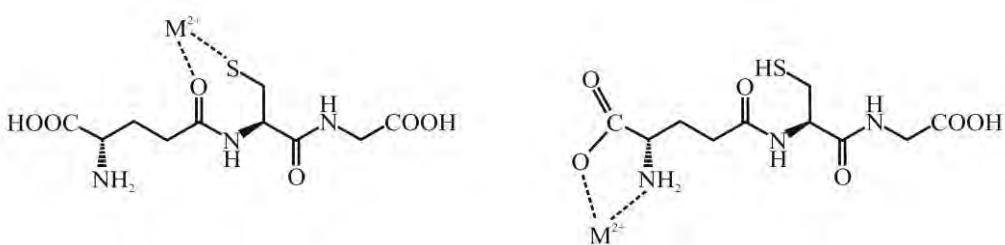
Direktan proksidativni efekat ispoljavaju metali sa promenljivom valencijom (Cu, Fe, Mn i V) tako što stvaraju slobodne radikale posredstvom Fentonove reakcije, pospešuju autooksidaciju delova biomolekula sa orto-hidroksilnim grupama u strukturi (cateholamini i slične strukture) i doprinose indukciji i propagaciji procesa lipidne peroksidacije. Indirektni proksidativni efekat ispoljavaju metali sa stabilnom valencijom (Cd i Pb), ali i metali sa promenljivom valencijom (Cu, Fe, Hg i Cr) na taj način što interaguju sa bioelementima tj. reaguju sa metalima u aktivnom centru enzima, interferiraju za iste jonske kanale i remete intracelularnu homeostazu jona (Đorđević i Pavlović, 2006). Veza sa delovima biomolekula ostvaruje se preko –O, –N ili –S donor atoma ovih bioliganada i tako se mogu sniziti njihove efektivne koncentracije i dostupnost za interakcije u fiziološkim uslovima funkcionisanja organizama.

U tabeli 4.12. prikazane su izmerene vrednosti srednjih sadržaja toksičnih metala olova i kadmijuma u homogenatima tkiva jetre i bubrega u uslovima intoksikacije ovim teškim metalima.

Izmereni sadržaj metala u jetri bio je viši kod ţivotinja koje su dan nakon trovanja dobijale suplement koji vezivanjem sa metalom doprinosi njegovom zadržavanju u tkivu. Ono što je registrovano merenjem aktivnosti enzima je da se protektivna uloga suplemenata uočava jer je aktivnost endonukleaza jetre ništa. U homogenatima tkiva jetre i bubrega registrovano je prisustvo olova i neznatno smanjenje koncentracije olova u tkivima u prisustvu suplemenata. Bez obzira što su prisutni u tkivima ovi toksični metali ispoljavaju ništa toksični efekat, mereno preko aktivnosti DNaza i koncentracije MDA, što je rezultat delimičnog blokiranja toksičnih metala vezivanjem preko aktivnih centara suplemenata.



**Slika 4.23.** Mogući načini interakcije  $M^{2+}$  jona metala i građenje odgovarajućih komplektnih asocijata sa liponskom kiselinom



**Slika 4.24.** Mogući načini interakcije  $M^{2+}$  jona metala i građenje odgovarajućih komplektnih asocijata sa glutationom

Na slici 4.23. i 4.24. prikazani su mogući proizvodi interakcija  $M^{2+}$  jona metala (Cd, Pb i Cu) sa glutationom (odnosno  $\alpha$ -liponskom kiselinom) verovatno tipa kordinativno kovalentnih čestica. Prema strukturi GSH ima više mogućnosti za interakcije sa  $M^{2+}$  jonima preko  $-O$ ,  $-N$  i  $-S$  donor atoma, prema veličini jona metala ( $r Pb^{2+} > r Cd^{2+} > r Cu^{2+}$ ) i prema njegovim osobinama može efikasnije da umanji toksično dejstvo metala. Prema rezultatima ovih ispitivanja GSH efikasnije blokira ili umanjuje toksično dejstvo  $Cd^{2+}$  jona, dok kod intoksikacije olovom efikasnija je  $\alpha$ -liponska kiselina. Metali sa promenljivom valencijom mogu biti redukovani od strane glutationa i mogu reagovati sa nukleofilnim grupama kada se direktno narušava integritet subcelijskih membrana i funkcija receptora i dolazi do genetskih oštećenja i remećenja regulacije enzima u biološkim sistemima.

**Tabela 4.12.** Vrednosti koncentracije metala u homogenatima tkiva (jetri i bubregu) kod eksperimentalnih grupa tivotinja u uslovima hronične intoksikacije kadmijumom i olovom i uz dodatak odgovarajućih suplemenata

Eksperimentalne grupe (n=6)	Koncentracija metala (mg/kg)	
	Jetra	Bubreg
Cd	0,1	0,06
Cd + LA	0,125	0,06
Cd + GSH	0,156	0,07
Pb	0,217	0,14
Pb + LA	0,207	0,13
Pb + GSH	0,19	0,12



## **5. ZAKLJUČAK**



Rezultati ispitivanja uticaja efekata intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb i Cu) i protektivna uloga suplemenata –S donor liganada ( $\alpha$ -liponske kiseline i glutationa) u  $\dot{\tau}$ ivotnoj i radnoj sredini na model sistemu Wistar soja pacova upućuju na sledeće zaključke:

- u uslovima akutne intoksikacije kadmijumom dolazi do značajnih promena vrednosti hematoloških parametara (smanjen je broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i procenat hematokrita, povećane vrednosti MCV, MCH i MCHC, smanjen broj granulocita, limfocita i trombocita) u odnosu na kontrolnu grupu  $\dot{\tau}$ ivotinja;
- u uslovima hronične intoksikacije olovom dolazi do značajnih promena vrednosti hematoloških parametara i to: smanjen je broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, procenat hematokrita, MCV, MCH, limfocita i trombocita (i do tri puta manje), a povećan broj granulocita u odnosu na kontrolnu grupu  $\dot{\tau}$ ivotinja;
- u uslovima hronične intoksikacije bakrom dolazi do značajnih promena vrednosti hematoloških parametara: neznatno smanjenje broja eritrocita, povećana koncentracija hemoglobina (jer bakar učestvuje u sintezi hemoglobina tako što pomaže ugradnju gvožđa u hem), smanjen je procenat hematokrita, MCV i broj trombocita, a povećane vrednosti MCH i MCHC kao i broj limfocita;
- dodatak suplemenata –S donor liganada ( $\alpha$ -liponske kiseline i glutationa), dan nakon unošenja toksičnih metala, dovodi do umanjenja negativnog efekta teških metala na hematološke parametre Wistar pacova.  $\alpha$ -liponska kiselina kao moćan antioksidans ispoljava bolji efekat nakon hronične intoksikacije olovom u pogledu broja eritrocita i parametara koji definišu eritrocit, dok je efekat glutationa podjednako efikasan u slučajevima akutne intoksikacije Cd i kod hronične intoksikacije Pb i Cu.

Efekti izloženosti uticaju toksičnih metala mogu se pratiti preko aktivnosti endonukleaza tj. alkalne (I) i kisele (II) DNaze.

- akutno trovanje kadmijumom povećava aktivnost alkalne DNaze najviše u pankreasu i do tri i po puta u odnosu na eksperimentalnu grupu  $\dot{\tau}$ ivotinja na normalnom režimu  $\dot{\tau}$ ivota i ishrane, takođe u jetri, zatim u mozgu i bubrežima (dva i po puta više u odnosu na kontrolnu grupu  $\dot{\tau}$ ivotinja);
- hronično trovanje olovom dovodi do povećanja aktivnosti alkalne i kisele DNaze u svim ispitivanim organima (jetra, bubreg, mozak i pankreas). Upoređivanjem

rezultata najveći porast aktivnosti alkalne DNaze nakon intoksikacije olovom zapaćen je u pankreasu (tri i po puta više) u odnosu na kontrolnu grupu tivotinja, zatim u jetri (2,5 puta), potom u bubrežima (2,5 puta), a najmanji porast aktivnosti kisele DNaze je primećen u homogenatu tkiva mozga;

- nakon hronične intoksikacije Wistar pacova subletalnim dozama bakra dolazi do povećanja aktivnosti alkalne i kisele DNaze u svim ispitivanim organima. Najveći porast aktivnosti DNaze I primećen je u pankreasu, dok je u jetri, bubrežima i mozgu približno jednako povećanje aktivnosti DNaze I. Najveća aktivnost DNaze II je u jetri, potom u pankreasu, bubrežima, a zatim u mozgu.
- dodatak suplemenata -S donor liganada ( $\alpha$ -liponske kiseline i glutationa), dan nakon intoksikacije teškim metalima, usled interakcije sa metalima i verovatnog građenja kompleksa pokazuje smanjenje aktivnosti DNaza (I i II) u ispitivanim organima.
- Rezultati pokazuju da je GSH vidno bolji suplement nakon intoksikacije kadmijumom u jetri zbog većeg smanjenja aktivnosti alkalne i kisele DNaze, dok  $\alpha$ -LA pokazuje izraženiji efekat u bubrežima i mozgu na osnovu aktivnosti alkalne i kisele DNaze.
- Kao bolji suplement nakon hronične intoksikacije olovom, na osnovu aktivnosti alkalne i kisele DNaze, pokazala se  $\alpha$ -liponska kiselina u jetri, pankreasu i mozgu, dok bolju protektivnu ulogu u bubrežima pokazuje GSH.
- Kao bolji suplement sa zaštitnim dejstvom je GSH u jetri i bubrežima jer dovodi do smanjenja aktivnosti DNaza (alkalne i kisele), davanja GSH dan nakon hronične intoksikacije Wistar pacova subletalnom dozom Cu.
- Bolje protektivno dejstvo na tkivo mozga i pankreasa pokazuje  $\alpha$ -liponska kiselina.

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 Wistar pacova kadmijumom dolazi do značajnog povećanja koncentracije MDA u odnosu na kontrolnu grupu. Najveće koncentracije MDA prisutne su u tkivu mozga, dok je najveći porast koncentracije

MDA u homogenatima jetre (i do 5 puta) u odnosu na eksperimentalnu grupu tivotinja na normalnom rešimu tivota i ishrane;

- u uslovima hronične intoksikacije Wistar pacova olovom dolazi do značajnog povećanja koncentracije MDA u svim ispitivanim organima. Upoređivanjem rezultata zapažen je značajan porast koncentracije MDA u homogenatu tkiva jetre (i do 6 puta su više vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu eksperimentalnih tivotinja);
- u uslovima hronične intoksikacije Wistar pacova bakrom dolazi do povećanja koncentracije MDA po organima. Upoređivanjem dobijenih rezultata koncentracija MDA pokazuje najmanje vrednosti nakon intoksikacije Wistar pacova bakrom u odnosu na koncentraciju MDA nakon intoksikacije kadmijumom i olovom;
- U tkivu bubrega, mozga i pankreasa, prema vrednostima MDA, redosled toksičnosti metala je u nizu: Cd > Pb > Cu;
- dodavanje suplementa ( $\alpha$ -liponske kiseline ili glutationa) dovodi do značajnog smanjenja koncentracije MDA tj. procesa lipidne peroksidacije na membranama ćelija svih ispitivanih organa.

Na osnovu merenja količine teških metala (Cd i Pb) u homogenatima tkiva jetre i bubrega može se govoriti o tome da se toksični efekat teških metala može umanjiti dodatkom suplemenata ( $\alpha$ -liponske kiseline ili glutationa) koji preko donor atoma –O, –N ili –S ostavaraju relativno jaku kordinaciju sa metalom i time blokiraju mogućnost za ispoljavanje negativnih dejstva.

Dobijeni rezultati aktivnosti alkalne i kisele DNaze u *in vitro* ispitivanjima su u skladu 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. LITERATURA**



- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. *Osnovna imunologija, Funkcionalisanje i poremećaji imunskog sistema*, 2006-2007; **2**.
- Ahamed M., Siddiqui M., K. J. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clinica Chimica Acta*, 2007; **383**, 57-64.
- 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.
- Allfrey V. and Mirsky A. *E. J. Gen. Physiol.* 1952; **36**, 227-241.
- 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.
- 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.
- Arivazhagan P., Thilakavathy T., Ramanathan K., Kumaran S., and Panneerselvam C. Effect of dl- $\alpha$ -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.
- Arrick B., Nathan C., Griffith O., Cohn Z. *J. Biol. Chem.* 1982; **257**, 1231-1236.
- Arterberry VE., Prayer WA., Jiang L., Sehnert SS., Foster WM., Abrams RA., Williams JR., Wharam MD., Risby TH. *Free Radic. Biol. Me.* 1994; **17**, 569-576.
- Aruoma OI., Halliwell B., Butler J., Hoey M. *Biochem. Pharmacol.* 1989; **38**, 4354-4357.
- Barceloux D.G., Copper. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1999; **37**, 217–237.
- 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.
- Barry M A. Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis, *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; **300**, 440–450.
- Barry M. A. and Eastmann A. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; **300**, 440-450.

- Bartholeyns J., Peeters-Joris C., Reyhler H., Baudhun P. Hepatic nucleases 1. Method for the specific determination and characterization in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 1975; **57**, 205–211.
- Basnakian AG., Kaushal GP., Ueda N., Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. In: *Toxicology of the Kidney*, edited by Tarloff JB, Lash LH, 2004; **3**,
- Basten A., Beesen P. *B. J. Exp. Med.* 1970; **131**, 1288.
- Bellomio G., Orrenius S. *Hepatology*, 1985; **5**, 876-882.
- Bellamy C.O.C., Malcomson R.D.G., Harrison D.J. and Wyllie A.H. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* 1995; **6**, 3-16.
- Bendich A., Machlin LJ., Scandurra O., Burton GW., Wayner DDM. *Adv. Free Rad. Biol. Med.* 1986; **2**, 419-444.
- Bernardi G. *The Enzymes*, 1971; **4**, 271-287.
- Bernad J., Bessis M. *Hematologie Clinique. Masson*, Pariz, 1958.
- Bersenyi A., Fekete S., Szoes Z. et al. Effect of ingested heavy metals (Cd, Pb and Hg) on haematology and serum biochemistry in rabbits. *Acta Vet. Hung.* 2003; **51**, 297- 304.
- Birnboim HC. *Science*, 1982; **215**, 1247-1249.
- Bohr VA., Evans MK., Fornace AJ. *Lab. Invest.* 1989; **61**, 143-161.
- Bortner CD., Oldenburg NBE., Cidlowski JA.. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 1995; **5**: 21-26.
- Bremner I., Manifestations of copper excess. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; **67**, 1069S–1073S.
- Brinkhous K. M. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1967, **26**, 79-85.
- Brzoska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J., Calcium deficiency as on the risk factors for osteoporosis. *Post. Hig. Med. Dosw.* 1997; **51**, 55-74.
- Burkitt M.J. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols and ceruloplasmin. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; **394**, 117–135.
- Cadmium IPCS, World Health Organization. Environmental *Health Criteria*, Geneva, 1992; 134.
- Campbell VW., Jackson DA. Te effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. *J. Biol. Chem.* 1980; **255(8)**, 3726-3735.
- Catcheside DG., Holmes B. The action of enzymes on chromosomes. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1947; **1**, 225–231.

- Cerutti PA. *Science*, 1985; **227**, 375-381.
- 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.
- Cline M.J., Golde D. W. *Nature*, 1974; **248**, 703.
- Compton MM., Cidlowski JA. Identification of a Glucocorticoid-induced Nuclease in Thymocytes A Potential “*lys*is gene” Product. *J. Biol. Chem.* 1987; **262**(17), 8288-8292.
- Cooper A. J. L. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease (Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., DiMauro, S., Barchi, R.L. and Kunk, L.M., eds). *Butterworth-Heinemann*, Boston. 1997; 1195-1230.
- Counis MF., Torriglia A. DNases and apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 2000; **78**, 405–414.
- Cotgreave IA., Moldeus P., Orrenius S. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1988; **28**, 189-212.
- Cowan J. *Inorganic Biochemistry*, 1997.
- Counis M.F. L-DNase II, a Molecule That Links Proteases and Endonucleases in Apoptosis, Derives from the Ubiquitous Serpin Leukocyte Elastase Inhibitor. *Mol. Cell Biol.* 1998; **18**, 3612-3619.
- Crichton R. R. *Biological Inorganic Chemistry An Introduction*, Elsevier, 2008.
- Cross CE., Haiwel B., Barish ET., Pryor WA., Ames BN., Saul RL. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Inter. Med.* 1987; **107**, 526-45.
- 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.
- Da Ros R., Assaloni R., Ceriello A. Molecular targets of diabetic vascular complications and potential new drugs. *Curr Drug Targets*, 2005; **6**(4), 503-509.
- Dass PD., Bermese W., Holmes EW. *Biochem. Biophys. Acta*, 1992; **1156**, 99-102.
- Deepti Gaurav, Shabad Preet and Dua K.K. Chronic cadmium toxicity in rats: Treatment with combined administration of vitamins, amino acids, antioxidants and essential metals, *Journal of Food and Drug Analysis*, 2010; **18**(6), 464-470.
- Dizdaroglu M. *Biochem. J.* 1986; **238**, 247-254.
- Dodson ML, Michaels ML, Liyod RS. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**, 2703-2712.

- D.R. and Mehra, R.K. Host defenses against copper toxicity. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1990; **31**, 47–83.
- 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.
- Drury JA., Nycyk JA., Cooke RW. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; **22**, 895-900.
- ĐorĐević V. Biochemical oxidation. In: Koraćević D, Bjelaković G, ĐorĐević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G, editors. *Biochemistry*, Beograd, Savremena administracija, 2000; 678–705.
- ĐorĐević V., Pavlović D., Kocić G. *Biochemistry of free radicals*, Niš, Sirius Print, 2000; (1).
- ĐorĐević V., Pavlović D. *Biohemijiski markeri oksidativnog stresa u eksperimentalnoj i kliničkoj medicini*, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, 2006.
- El-Missiry MA. Prophylactic effect of melatonin on lead-induced inhibition of heme biosynthesis and deterioration of antioxidant systems in male rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2000; **14**, 57-62.
- 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.
- Erslev A.J., Gabuzda TG. *Pathophysiology of Blood*, Saunders, Filadelfija, 1975.
- Evans CJ., Merriam JR., Aguilera RJ. Drosophila acid DNase is a homolog of mammalian DNase II. *Gene*, 2002; **295**, 61–70.
- Fagan JM., Waxman L., Goldberg AL. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**, 5705-5713.
- Falke H.E., Zwennis W.C.M. Toxicity of lead acetate to female rabbits after chronic subcutaneous administration, Biochemical and clinical effects. *Arch. Toxicol.* 1990; **64**, 522-529.
- Farber JL., Kyle ME., Coleman JB. *Lab. Invest.* 1990; **62**, 670-679.
- Fernandes A., Mira ML., Azevedo MS., Manso C. Mechanisms of hemolysis induced by copper. *Free Radic. Res. Commun.* 1988; **4**, 291-8.
- 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.
- Fong KL., McCay PB., Poyer JL. *J. Biol. Chem.* 1973; **248**, 7792-7797.
- Freidovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen, NY. *Acad. Sci.* 1999; **893**, 13.
- Friberg L., Nordberg GF., Vouk VB. In: *Handbook on the Toxicology of Metals*, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1986; 521-531.
- Fridovich I. *Science*, 1978; **201**, 875-876.
- Fuentealba I.C., Mullins J.E., Aburto E.M., Lau J.C. and Cherian G.M. Effect of age and sex on liver damage due to excess dietary copper in Fischer 344 rats. *Clin. Toxicol.* 2000; **38**, 709–717.
- 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.
- Gipp WF., Pond WG., Tasker J., Compen D., Vankrook L., Visek WJ. Influence of level of dietary copper on weight gain, hematology and liver copper and iron storage of young pig. *J. Nutr.* 1973; **103**, 713-9.
- 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.
- Goyer R.A., Clasen C.D., *Metal Toxicology*, Academic Press, San Diego, 1995; 31-45.

- 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.
- Groitti AW. *J. Lipid. Res.* 1998; **39**, 1529-1542.
- GubskyYulKursky MD., Zadorina OV., Fedorov AN., Brayuzgina TS., Yurzhenko NN. *Biochemia*, 1990; **55**, 12-22.
- 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.
- Gurer H., Ozgunes H., Oztezcan S. and Ercal N. Antioxidant role of  $\alpha$ -lipoic acid in lead toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; **27**, 75-81.
- Hagen T.M., Ingersoll R.T., Lykkesfeldt J., Liu J., Wehr C.M. and Vinarsky V. *et al.*, (*R*)- $\alpha$ -lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *Faseb Journal*, 1999; **13**, 411-418.
- Hall A.G. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999; **29**, 238-245.
- Halliwell B. *Br. Med. J.* 1983; **285**, 296-296.
- Halliwell B. *Free Rad. Res. Comms.* 1990; **9**, 1-32.
- Halliwell B., Gutteridge JMC., Cross CE. *J. Lab. Clin. Med.* 1992, **119**, 598-620.
- Halliwell B. Reactive oxygen species in living system, Source, biochemistry and role in humane disease. *Am. J. Med.* 1991; **91**, 14-21.
- Halliwell BI., Guteridge 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.
- Han D., Handelman G., Marcocci L., et al. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors*, 1997, **6**, 321-338.
- Hanahan D. and Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; **100(1)**, 57-70.
- Harman D. Aging, a theory based on free radical andradiation chemistry. *J. Gerontology*, 1956; **11**, 298-300.
- Harris J.W., Kellermeyer R. W. *The Red Cell*, Harvard University Press, Kembridȝ (Mass.), 1970.

- Harris E. The transport of copper, Prasad A.S. Editor, *Essential and Toxic Trace Elements in Human Health and Disease: An Update*, Wiley-Liss, New York, 1993; 163–179.
- 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.
- Hart E., Steenbock H., Waddell J. and Elvehjem C. A. Iron in nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. *J. Biol. Chem.* 1928; **77**, 797-812.
- Hartwing A., Schlepegrell R., Beyersmann D. Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 1990; **241**, 195-201.
- Henle ES., Linn S. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**, 19095-19098.
- Henle ES., Luo Y., Linn S. *Biochemistry*, 1996; **35**, 12212-12219.
- Hensley K., Robinson KA., Gabbita SP., Salsman S., Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; **28**(10), 1456–62.
- Hikerji SK., Pimstone NR. *Arch Biochem.* 1990; **181**, 177-184.
- Hoffman JF. Structure, mechanism and function of the Na/K pump. *Current topics in membranes and transport*, 1983; **19**.
- Hogan G.R. Adams D.P. Lead-induced leukocytosis in female mice. *Arch. Toxicol.* 1979; **41**, 295-300.
- Hovig, T. Ser. *Haemat.* 1968; **1**, 13.
- Hughes FM., Cidlowski JA. Apoptotic DNA degradation: evidence for novel enzymes. *Cell Death Differ.* 1994; **1**, 11-17.
- Humad S., Yarlong E., Clapper M., Skosez JL. *Free Radic. Res. Comm.* 1988; **5**, 101-106.
- Horowitz D. A., Stegall R. V. Jr. *J. Clin. Inv.* 1972; **51**, 760.
- Imlay JA., Linn S. *Science*, 1988; **240**, 1302-1309.
- 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.
- Jacobson K.B., Turner J.E. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology*, 1980; **16**(1), 1–37.
- Jain S., Levine S., Duett J., Hollier B. Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism*, 1990; **39**(9), 971-5.
- James L., Holly MD. Glutathione and Oxidative Stress - Part I, *Medical associates, L.L.P.* Southeast Texas.
- Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. *Brit. Med. Bull.* 2003; **68**, 167-182.

- 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., Nikolić R., Krstić N., Kocić G. Monitoring of lipoic acid protective role by liver endonucleases activity in acute intoxicity with cadmium and lead. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011; **44 (1)**, 186-187.
- J. R. Human whole-body copper metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; **67**, 960S–964S.
- 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 Biljana M. Nikolić Rućica S. Copper Release from Dental Prosthetic Crowns, Dental Materials, and Human Teeth into Acetic Acid. *Connective tissue research*, 2010; **51(1)**, 31-35.
- Kaličanin Biljana, Nikolić Rućica. The application of the potentiometric stripping analysis to determine traces of M(II) metals (Cu, Zn, Pb and Cd) in bioinorganic and similar materials. *Wide Spectra of quality control*, 2011, **12**, 211-237.
- 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., OÈrd, T. and Bredesen, D.E. Bcl-2 inhibition of neuronal death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, 1993; **262**, 1274-127
- Karlson P. *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1992.
- Karpatkin S. Strick N. *J. Clin. Inv.* 1972; **51**, 1235.
- Karpatkin S., Williams U., W. J. i sar. *Hematology*, McGraw-Hill, Njujork, 1977; 1176.
- Kataoka H. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *Journal of Chromatography B*. 1998; **717**, 247–262.
- Kellogg EW. III. Fridovich I. *J. Biol. Chem.* 1977; **252**, 6721-6728.

- Klassen CD. Efect of metallothionein on hepatic disposition of metals. *Am. J. Physiol.* 1987; **234**, E47-E53.
- Klaassen C.D., Liu J., Choudhuri S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; **39**, 267–294.
- Kocić G., Pavlović D., Đorđević 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., Pavlović D., Pavlović R., Nikolić G., Cvetković T., Stojanović I., Kocić R. Sodium nitroprusside and preoxynitrite effect on hepatic DNases: An *in vitro* and *in vivo* study. *Comp. Hepatol.* 2004; **3(6)**, 1-9.
- Kocić G., Vlahović P., Pavlović D., Kocić R., Jevtović T., Cvetković T., Stojanović I. The possible importance of the cation-binding site for the oxidative modification of liver 5'-nucleotidase. *Arch. Physiol. Biochem.* 1998; **106**, 91-99.
- Kokilavani V., Devi M. A. Sivarajan K. and Panneerselvam, C. Combined efficacies of dl-lipoic acid and meso 2,3 dimercaptosuccinic acid against arsenic induced toxicity in antioxidant systems of rats. *Toxicology Letters*, 2005; **160**, 1 - 7.
- Kostić MM., Ognjanović B., Dimitrijević S., Čikić RV., Štajn A., Rosić GL., Čivković RV. Cadmium induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: *in vivo* effects. *Eur. J. Haematol.* 1993; **51**, 86-92.
- Korsmeyer SI., Yin XM., Oltvai CE., Veis-Novack DJ., Linette GP. *Biochem. Biophys. Acta*, 1995; **1271**, 63-66.
- Kunitz M. *J. Gen. Physiol.* 1940; **24**, 15.
- Lacks SA. Deoxyribonuclease I in mammalian tissues. Specificity of inhibition by actin. *J. Biol. Chem.* 1981; **256**, 2644–2648.
- Larsson A. Functions of glutathione: Biochemical, physiological, toxicological and clinical aspects. *Raven Press*, New York, 1983.
- Lauwerys R., Cadmium in man, The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. Elsevier, *North Holland Biomed. Press*, 1979; 433-453.
- L. C. and Lemons J.E. Biodegradation of restorative metallic systems. *Adv. Dent. Res.* 1992; **6**, 32–37.
- Lee DH., Lim JS., Song K., Boo Y., Jacobs Jr DR. Graded association of blood lead and urinary cadmium concentrations with oxidative stress related markers in the U.S. population: results from the third national health and nutrition examination survey. *Environ. Health Perspect.* 2006; **114**, 350-4.

- Leggett, R.W. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ. Health Perspect.*, 1993; **101**: 598-616.
- Leo Štefan, Tina Tepšić, Tina Zavidić, Marta Urukalo, Dalibor Tota, Robert Domitrović. Lipid peroxidation-causes and consequences. *Medicina*, 2007; **43**, 84-93.
- Liao T.H., Liao W.C., Chang H.C., and Lu K. S. Deoxyribonuclease II purified from the isolated lysosomes of porcine spleen and from porcine liver homogenates. Comparison with deoxyribonuclease II purified from porcine spleen homogenates. *Biochem. Biophys. Acta*, 1989; **1007**, 15-22.
- Linn S. *Drug Metab. Rev.* 1998; **30**, 313-326.
- Levin SA., Kidd PM. U, *Antioxidant adaptation : Its role in free radical pathology*, San Leandro, California, 1986.
- Linman J.W. *Hematology*, Macmillan, Njujork, 1975.
- 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.
- Löhr G. W., U Deutsch, E. i sar. Metabolism and Membrane Permeabilityof Erythrocytes and Thrombocytes. *Thieme*, Stuttgart, 1968; 196.
- 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.
- Martin V., H. Roka H.L. *Acta Haemat.* 1961; **25**, 209.
- Massaad CA,, Klann E., Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid. Redox Signal*, 2010; (Epub ahead of print).
- 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.
- McCord MJ. 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.
- Melgar E., and Goldthwait D.A. Deoxyribonucleic acid nucleases II. The effects of metal on the mechanism of action of deoxyribonuclease, I. *J. Biol. Chem.* 1968; **243**(17), 4409-16.
- Mello-Fihlo AC., Meneghini R. *Biochem. Biophys. Acta*, 1985; **847**, 82-89.
- Merian E. Metals and their compounds in the environment. *Occurrence, analysis and biological relevance*, New York, Weinheim, 1991; 469-479.
- Mimić-Oka J. *Yugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1994; **30**, 1-23.
- Metacalf. *J. Cell. Physiol.* 1971; **77**, 277.
- Mitić Ţarko, Cakić Milorad, Nikolić Goran, Nikolić Rućica, Nikolić Goran, Pavlović Radmila, Santaniello Enzo. Synthesis, physicochemical and spectroscopic characterization of copper(II)-polysaccharide pullulan complexes by UV-VIS, ATR-FTIR, and EPR. *Carbohydrate Research*, 2011, 346(3), 434-441.
- Mohammed-Brahim B., Buchet J.P., Bernard A., Lauwers 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.
- Moore S., Pancreatic DNase. In: The Enzymes, Boyer, P.D., eds. New York, Academic Press, 1981; 281-96.
- Muirhead H., i sar. *J. Mol. Biol.* 1967; **28**, 117.
- Müller L., Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicology*, 1986; **40**, 285-92.
- 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.
- Myung-Suk K., Akera L. *Am. J. Physiology*, 1987; **525**, H225-H257.
- Nair V., Cooper CS., Vieti DE., Turner GA. *Lipids*, 1986; **21**, 6-10.
- Nikolić Rućica 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.
- Nikolson GL. *Biochem. Biophys. Acta*, 1978; **457**, 57-108.
- Nikonova LV., Zotova RN., Umanskii SR. Isolation of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent nuclease from calf thymus chromatin. *Biokhimiia*, 1989; **54**, 1709–1718.

- Ogoshi K., Yukuo N., Moriyama T., Decrease in bone strength of cadmium-treated young and old rats. *Arch. Toxicol.* 1992; **66**, 315-320.
- Oliver CN. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987; **253**, 62-72.
- Ookhtens M., Kaplowitz N. *Semin. Liver Dis.* 1998; **18**, 313-329.
- Orrenius S., Ormstad K., Thor H., Jewell SA. *Fed. Proc.* 1983; **42**, 3177-3188.
- Ou P., Tritschler H.J. and Wolff S.P., Thiotic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant. *Biochem. Pharmacol.* 1995; **50**, 123-126.
- Pan CQ., Ulmer JS., Herzka A., Lazarus RA., Mutational analysis of human DNase I at the DNA binding interface: implications for DNA recognition, catalysis and metal ion dependence. *Protein Sci.* 1998; **7**, 628-636.
- Pande M., Mehta A., Pant B.P. and Flora S.J.S. Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2001; **9**, 173-184.
- 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, Jerusalem, 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.
- Peitsch MC., Mannhertz HG., Tschopp J. About the involvement of deoxyribonuclease I in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1994; **4**, 37-41.
- Peitsch MC., Muller C., Tschopp J. DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucleic Acid Research*, 1993; **18**. 4206-4209.
- Perutz M. F. i sar, Proc. Roy. Soc. Med. 1969; **173**, 113.
- Pickard L., Thaler MM. *J. Cell Physiol.* 1980; **102**, 129-139.
- Piomelli S. Chemical toxicity of red cells. *Environ. Health Perspect.* 1981; **39**, 65-70.

- 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.
- Polzar B., Peitsch MC., Loos R., Tschopp J., Mannherz HG. Overexpression of deoxyribonuclease I (DNase I) transfected into COS-cells: Its distribution during apoptotic cell death. *Eur. J. Cell Biol.* 1993; **62**, 397-405.
- 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.
- Prepared by Syracuse Research Corporation under Subcontract No. ATSDR-88-0608-02.  
Prepared for ATSDR. *US Public Health Service*, 1990.
- Pryor WA. *Fed Proc.* 1973; **32**, 1862-1869.
- Quinlan GJ., Halliwell B., Moorhouse CP., Gutteridge JMC. Action of lead(II) and aluminium(III) ions on iron-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.
- Ram M.S., Singh L., Suryanarayana M.V., Alam S.T. Effect of Iron, Nickel, Cobalt on bacterial activity and dynamics during anaerobic oxidation of organic matter. *Water Air Soil Pollut.* 2000; **117**, 305-312.
- Richard C., Thayer W. *Biochem. Biophys. Acta*, 1983; **733**, 216-222.
- Richman C. M. i sar. *Blood*, 1978; **51**, 11.
- Reed LJ., DeBusk BG., Gunsalus IC., et al. Crystalline α-lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*, 1951; **114**, 93-94.
- Rowley DA., Halliwell B. *Febs Lett.* 1982; **138**, 33-36.
- Ruparelia S.G., Verma Y., Saiyed S.R. and Rawal U.M. Effect of cadmium on blood of tilapia, *Oreochromis mossambicus* Peters, during prolonged exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1990; **45**, 305-312.
- Ručica 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.
- Sancar A. *Ann Rey Biochem*. 1996; **65**: 43-81.
- Sarkar, S., Yadav P., Trivedi R., Bansal A. K. and Bhatnagar D., Cadmium induced lipid peroxidation and status of antioxidant system in rats' tissues. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 1995; **9**, 144-149.
- Sassa S. Toxic effects of lead, with particular reference to porphyrin and heme metabolism. In *Heine and Hemoproteins*, Edited by DeMatteis F. and N.Aldridge W. 1978; 333-371. Springer-Verlag, New York.
- 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.
- Schepkin V., Kawabata T., Tritschler H.J. and Packer L., 2D NMR of the metabolic antioxidant dihydrolipoic acid and its derivatives. *Free Radical Research*, 1996; **25**, 195-205.
- Schneider W., Gear A. R. L., Biochemistry and Pharmacology of Platelets. *Ciba Found. Symp.* 35(n. s.). Elsevier, Amsterdam, 1975; 234.
- Scheinberg I.H. and Sternlieb I. Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996; **63**, 842S-845S.
- Scott J., Peiffer K., Jang G., Keyes A., Keen W.C. and Sakanashi, T. Copper status of young men consuming a low-copper diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997; **65**, 72-78.
- Schuessler H., Davies JV. *Int. J. Radiat. Biol.* 1983; **43**, 291-311.
- Shan X., Aw TY., Jones DP. *Pharmacol. Ther.* 1990; **47**, 61-71.
- Sedghi S., Keshavarzian A., Klamut M., Elznhamer D., Zarling EJ. *Am. J. Gastroenterol.* 1994; **89**, 2217-2221.
- 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.
- Sigel H., Prijs B., McCormick D.B. and Shih J.C.H., Stability of binary and ternary complexes of  $\alpha$ -lipoate and lipoate derivatives with  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$  in solution. *Arch. Biochem. Biophys.* 1978; **187**, 208-214.

- Singhal R. K., Anderson M. E. and Meister A. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J.* 1987; **1**, 220-223.
- Sivaprasad R., Nagaraj M., Varalakshmi P. Combined efficacies of lipoic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid on lead induced erythrocyte membrane lipid peroxidation and antioxidant status in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 2003; **22**, 183-192.
- Shaikh Z.A., Vu T.T. and Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999; **154**, 256-263.
- Shak S., Capon DJ., Hellmiss R., Marsters SA., Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; **87**, 9188-9192.
- Sharma DC., Riyat M. Biochemistry for Dental Students. *B.I Publications Pvt. Ltd.* New Delhi. 2007; 311-13.
- Sharma DC. Text book of Biochemistry. *Paras Medical Publisher*, Hyderabad, 1999; 319.
- 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.
- Shohet S.B. *N Engl. J. Med.* 1972; **286**, 638.
- Sies H., Stahl W., Sundquist AR. *Ann NY Acad. Sci.* 1992; **669**, 7-20.
- Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem. J.* 1984; **222**, 1-15.
- Sohal, R.S. and Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science*, 1996; **273**, 59-63.
- 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.
- Sreejayan N., Von Ritter C. Lipid peroxidation in bile: the role of hydrophobic bile acids and the effect on biliary epithelial cell function. *Patophysiology*, 1999; **5(4)**, 225-32.
- Stadtman ER. *Free Rad. Biol. Med.* 1990; **9**, 315-325.
- Stadtman ER. *Trends Biochem. Sci.* 1986; **11**, 11-12.
- Stadtman ER. *Biochemistry*, 1990; **29**, 6323-6329.
- Stampfer MJ., Hennekns CH., Manson JE., Colditz GA., Rosner B., Willett WC. *N Eng. J. Med.* 1993; **328**, 1444-49.
- Stanoje Stefanović. *Hematogija, Medicinska knjiga*, Beograd-Zagreb, 1981.

- Steinberg D., Witztum JL. *Jama*, 1990; **264**, 3047-3052.
- Stoeppler, in: EM. Weinheim (Ed.), Metals and their compounds in the environment, *Verlag Chemie*, 1991; 805-849.
- Stoyanovsky D.A., Tyurina Y.Y., Tyurin Y.Y., Anand D., Mandavia D.N., Gius D., Ivanova J., Pitt B., Billiar T.R., Kagan V.E. Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low molecular weight and protein S-nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; **127**(45), 15815-15823.
- Stratling WH., Grade C., Horz W: Ca/Mg-dependent endonuclease from porcine liver. Purification, properties, and sequence specificity. *J. Biol. Chem.* 1984; **259**, 5893-5898.
- Suna Atasayar, Hilmi Orhan, Hilal Özgünes. Malondialdehyde quantification in blood plasma of tobacco smokers and non-smokers. *J. Pharm. Sci.* 2004, **29**, 15-19.
- 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.
- Takensita H., Yasuda T., Nadano D., Tenjo E., Sawazaki K., Iida R., and Kishi K. *Int. J. Biochem.* 1994; **26**, 1025-1031.
- Tasić N., Radak Đ., Cvetković Z., Petković B., Ilijevski N., Đorđević-Denić G. Uloga značaj 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  $\alpha$ -lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease. *J. Clin. Pharmacol.* 2005; **45**(3), 313-328.
- Terayama K. Effects of lead on electrophoretic mobility, membrane sialic acid, deformability and survival of rat erythrocytes. *Ind. Health*, 1993; **31**, 113-126.
- Thomas CE., Reed DJ. *Hepatology*, 1989; **10**, 375-384.
- Thomas MJ., Pryor WA. *Lipids*, 1980; **15**, 544-548.
- Thornberry NA., Lazebnik Z. Caspases: enemies within. *Science*, 1998; **281**, 1312-6.
- 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.
- Tomin J. *Mikroelementi-hemijiske osobine, biohemijiski i toksikološki značaj*, SKC, Niš, 1999.

- Tung H.T., Cook F.W., Wyatt R.D., Hamilton P.B. The anemia caused by aflatoxin. *Poul. Science*, 1975; **54**, 1962-1969.
- 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.
- Toshiniwal PK., Yarling EJ. *Neurochem. Res.* 1992; **17**, 205-207.
- Traysman RJ., Kirsch JR., Koehler RC. *J. Appl. Physiol.* 1991; **71**, 1185-1195.
- 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  $^{65}\text{Cu}$ . *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; **67**, 1219-1225.
- Uauy R., Oliveras M., Gonzales M., Essentiality of copper in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; **67**, 952S-959S.
- Ulmer JS., Herzka A., Toy KJ., Baker DL., Dodge AH., Sinicropi D., Shak S., Lazarus RA. Engineering actin-resistant human DNase I for treatment of cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; **93**, 8225-8229.
- Ursini F., Bindoli A. *Chem. Phys. Lipids*, 1984; **44**, 255-276.
- Valery C.R. u Brobeck, J.R. *Best and Taylor's Physiological Basis of Medical Practice*, Williams and Wilkins, Baltimor, 1973; 4-48.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 2005; **12**, 1161-1208.
- Van Furth R. *Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology*, Blackwell, Oksford, 1975.
- Vargas I., C., Castillo F., Posadas B. Escalante, Acute lead exposure induces renal heme oxygenase-1 and decreases urinary  $\text{Na}^+$  excretion. *Hum. Exp. Toxicol.* 2003, **22**, 237-244.
- Vesna Matović, Zorica Plamenac-Bulat, Danijela Đukić. Uticaj povećanog unošenja kadmijuma na antioksidativni zaštitni sistem. *Jugoslov. Med. Biohem.* 2004; **23**, 117-126.
- Videla L.A., Fernandez V., Tapia G., Varela P. Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells. *Biometals*, 2003; **16**, 103-111.
- Waalkes M.P., Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Biochem.* 2000; **79**, 241-244.
- Waldschmidt M., Karg H. and Kinzler, M. *Natur wissenschaft*, 1964; **51**, 364-365.

- Walker M. N., Dwan B. A., Dovor D. E. and Coyer R. A. Renal tubular tumor and a typical hyperplasia in Mice exposed to lead acetate during gestation, lactation occur with minimal chronic nephropathy. *Cancer Res.* 1995; **55**, 265-271.
- Weity YW., Bimbaum AJ., Sobotka PA., Yarling EJ., Skosez JL. *Lancet*, 1991; **337**, 933-935.
- Weitzman SA., Gordon LI. *Blood*, 1990; **76**, 27-79.
- 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.
- Wolff Simon P. et al. Thioctic (Lipoic) Acid: A Therapeutic Metal Chelating Antioxidant. *Biochem. Pharmacol.* 1995.
- Wolff Simon P., Garner A., Dean RT. *Trends Biol. Sci.* 1986; **11**, 27-31.
- Wyllie AH. Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980; **284**, 555-6.
- Xintaras, C. Impact of lead-contaminated soil on public health. Analysis paper, U.S. Department of health and human services. *Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, Atlanta, Georgia. 1992.
- Yasuda T., Takeshita H., Iida R., Nakajima T., Hosomi O., Nakashima Y., Kishi K. Molecular Cloning of the DNA Encoding Human Deoxyribonuclease II. *J. Biol. Chem.* 1998; **273(5)**, 2610-2616.
- Yiin SJ., Lin TH. Lead-catalyzed peroxidation of essential unsaturated fatty acid. *Biol. Trace Elem.* 1995; **50**, 167-172.
- White J. G., U.Johnson S. A.:The Circulating Platelet, *Academic Press Njujork*, 1970; 45.
- Wu C., Wang L., Liu C., Gao F., Su M., Wu X., Hong F. Mechanism of Cd<sup>2+</sup> on DNA cleavage and Ca<sup>2+</sup> on DNA repair in liver of silver crucian carp. *Fish Physiol. Biochem.* 2008; **34**, 43-51.
- Yoshikawa T., Toyokuni S., Yamamoto Y. and Naito Y. *Free Radicals in Chemistry Biology and Medicine*, OICE International, Sain Lucia, London, 2000.
- Yun-Zhong F., Sheng Y., Guoyao W. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 2002; **18**, 872-9.
- Zhang Z., Blake D.R., Stevens C.R., Kanczler J.M., Winyard P.G., Symons M.C., Benboubetra M., Harrison R. A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in

hypoxic reperfusion injury: the role of NADH as an electron donor. *Free. Radic. Res.* 1998; **28**, 151-164.

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 a-lipoic acid. *Diabetologia*, 1995; **38**, 1425-1433.

Zucker-Franklin D. *Semin. Hemat.* 1968; **5**, 109.



## Bibliografija:

Radovi saopšteni u meĐunarodnim časopisima (M<sub>21</sub> i M<sub>23</sub>):

1. J. Jovanović, R. Nikolić, N. Krstić, G. Kocić, Monitoring of lipoic acid protective role by liver endonucleases activity in acute intoxicity with cadmium and lead, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2011); **44(1)**, 186-187, (½M<sub>21</sub>),
2. Rućica S. Nikolić, Jasmina M. Jovanović, Gordana M. Kocić, Tatjana P. Cvetković, Svetlana R. Stojanović, Tatjana D. Anđelković, Nenad S. Krstić, Monitoring the effects of exposure to lead and cadmium in working and living environment through standard biochemical blood parameters and liver endonucleases activity, *Hemisika industrija*, 2011; **65(4)**, 403–409, (M<sub>23</sub>),
3. Sandra S. Konstantinović, Budimir V. Konstantinović, Jasmina M. Jovanović, Synthesis And Structure Of Vanillin Azomethines, *Chemical industry & Chemical engineering quarterly*, 2009; **15(4)**, 279-281, (M<sub>23</sub>),

Rad saopšten na meĐunarodnom naučnom skupu štampan u celini (M<sub>33</sub>):

1. R. S. Nikolić, J. M. Jovanović, N. S. Krstić, M. N. Stanković, G. M. Kocić, Examination of glutathione protective role in acute intoxicity by lead and cadmium via activity of the liver endonucleases, *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 2011; **57**, 156-157.
2. Jasmina M. Jovanović, Rućica S. Nikolić, Nenad S. Krstić, Tatjana D. Anđelković, Gordana M. Kocić, Tatjana P. Cvetković, Monitoring the toxic effect of lead in living and working environment via hematological parameters, *Proceedings of the 16<sup>th</sup> conference of the series Men and working environment, International conference Safety of technical systems in living and working environment, Niš*, October 27-28, 2011, Serbia, 325-329.
3. Jasmina Jovanović, Rućica Nikolić, Gordana Kocić, Tatjana Cvetković, Nenad Krstić, Influence of lead on the activity of some liver enzymes and standard biochemical parameters of the blood tests, *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Congress Engineering*,

*Ecology and Materials in the Processing Industry, Jahorina, 09.03. – 11.03.2011. Bosnia and Herzegovina, 575-579.*

Rad saopšten na međunarodnom skupu štampan u izvodu (M<sub>34</sub>):

1. Ručica S. Nikolić, Jasmina M. Jovanović, Zorica R. Ajduković, Žarko J. Mitić, The spectroscopic study of the metabolic regulators of calcium on the structure of bone tissue, *XXI Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 23-26 septembar 2010, Ohrid, Macedonia*.
2. M. N. Stanković, R. S. Nikolić, D. M. Djordjević, M. G. Djordjević, N. S. Krstić, J. M. Jovanović, Using Micro-FTIR spectroscopy for investigation of biological mineral tissues and histopathological materials, *EUROanalysis 2011, 16<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry “Challenges in Modern Analytical Chemistry”, 11-15 Septemebr 2011, Belgrade, Serbia*.

Rad saopšten na nacionalnom naučnom skupu štampan u izvodu (M<sub>64</sub>):

1. Ručica S. Nikolić, Nenad S. Krstić, Maja N. Stanković, Jasmina M. Jovanović, Nataša V. Radosavljević-Stevanović, FTIR analysis the effect of heavy metals poisoning on mineral tissues, *Book of abstract, 49<sup>th</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society, May 13-14, 2011, Kragujevac, Serbia*.