

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Milena D. Anđelković

**UTICAJ KADMIJUMA I OLOVA NA
HOMEOSTAZU BIOELEMENATA I
PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA KOD
OBOLELIH OD KARCINOMA DOJKE,
PROSTATE I TESTISA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Milena D. Anđelković

**UTICAJ KADMIJUMA I OLOVA NA
HOMEOSTAZU BIOELEMENATA I
PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA KOD
OBOLELIH OD KARCINOMA DOJKE,
PROSTATE I TESTISA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Milena D. Anđelković

**INFLUENCE OF CADMIUM AND LEAD ON
BIOELEMENTS HOMEOSTASIS AND
OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN
PATIENTS WITH BREAST, PROSTATE AND
TESTIS CANCER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentori:

Prof. dr Zorica Bulat, mentor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Miodrag Aćimović, mentor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Prof. dr Miroslav Granić, mentor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Biljana Antonijević, predsednik Komisije
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Petar Bulat
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Prof. dr Danijela Đukić-Ćosić
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Aleksandra Buha Đorđević
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

U Beogradu _____

UTICAJ KADMIJUMA I OLOVA NA HOMEOSTAZU BIOELEMENATA I PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA KOD OBOLELIH OD KARCINOMA DOJKE, PROSTATE I TESTISA

Sažetak

Kadmijum (Cd) i olovo (Pb) su neesencijalni metali prirodno prisutni u životnoj sredini, ali je razvoj industrije značajno povećao njihovu koncentraciju u vazduhu, vodi i hrani. Iako se poslednjih godina beleži pad njihovih koncentracija u životnoj sredini, istraživanja nedvosmisleno potvrđuju da i izloženost niskim dozama može dovesti do oštećenja različitih organskih sistema, te i endokrinog, što ih čini značajnim faktorom u pojavi/razvoju hormon zavisnih karcinoma, poput karcinoma dojke, prostate i testisa. S tim u vezi, pri proceni toksičnih efekata Cd i Pb potrebno je razmotriti potencijalni uticaj istovremene izloženosti jer je realni scenario da je čovek izložen smeši toksičnih supstanci, a da toksični efekti smeše mogu biti kvalitativno i kvantitativno drugačiji u odnosu na efekte pojedinačnih supstanci. Stoga je ova studija imala cilj da ispita potencijalnu ulogu Cd i Pb kao faktora rizika u etiologiji karcinoma dojke, prostate i testisa ispitivanjem oksidativnog statusa, profila bioelemenata i nivoa polnih hormona kod pacijenata obolelih od ovih karcinoma, te da utvrdi eventualni prediktivni potencijal pojedinačnih parametara za nastanak karcinoma dojke, prostate i testisa.

Retrospektivnoj *case control* studiji prethodila je *in vivo* studija na mužjacima *Wistar* pacova koji su akutno bili izloženi Cd i/ili Pb sa ciljem da se u uslovima istovremene izloženosti ispita distribucija metala, kao i da se utvrde toksični efekti metala i njihova priroda i intenzitet na krv i krvotvorne organe, jetru, bubrege, prostatu i testise evaluacijom parametara oksidativnog statusa i ispitivanjem interakcija sa bioelementima, bakrom (Cu) i cinkom (Zn).

Case control studija je obuhvatila 55 pacijentkinja sa karcinomom dojke, 41 pacijenta sa karcinomom prostate i 52 pacijenta sa karcinomom testisa, dok su u kontrolnu grupu bile uključene zdrave žene (41), odnosno zdravi muškarci (61). Značajno više koncentracije Cd, odnosno niže Pb u tumorskom tkivu dojke u odnosu na okolno zdravo tkivo utvrđene su kod pacijentkinja sa karcinomom dojke, dok su estrogen receptor pozitivne karcinome dojke karakterisale više koncentracije oba toksična metala u tumorskim tkivima u odnosu na negativnu ekspresiju receptora. Pacijente sa karcinomima prostate i testisa karakterisale su značajno više koncentracije Cd u krvi u odnosu na zdrave ispitanike, a pokazana je i značajna akumulacija oba toksična metala u tumorskom tkivu prostate i testisa. Značajan *odds ratio* pokazan je za Cd u tkivu izmenjene strukture dojke (1,02), Cd u krvi pacijenata sa karcinomom prostate (1,18) i karcinomom testisa (1,98).

Eksperimentalna *in vivo* studija utvrdila je hepato- i nefrotoksične efekte Cd i Pb, sa izraženijem efektom nakon akutne ekspozicije smeši. Oba toksična metala pokazala su sposobnost prolaska krv-testis barijere, međutim akutna izloženost nije značajno narušila homeostazu testosterona niti izmenila morfološku strukturu prostate i testisa mužjaka pacova. *Case control* studija prepoznala je više koncentracije Cd, ali ne i Pb značajnim prediktorom za nastanak karcinoma i potvrdila je narušenu homeostazu oksidativnog statusa, redistribuciju Cu i Zn kao i disbalans polnih hormona kao važne mehanizme toksičnosti koji se nalaze u osnovi toksičnih efekata Cd i Pb kod obolelih od karcinoma dojke, prostate i testisa.

Ključne reči: kadmijum, olovo, mehanizmi toksičnosti, karcinom dojke, karcinom prostate, karcinom testisa

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Toksikologija

INFLUENCE OF CADMIUM AND LEAD ON BIOELEMENTS HOMEOSTASIS AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN PATIENTS WITH BREAST, PROSTATE AND TESTIS CANCER

Abstract

Cadmium (Cd) and lead (Pb) are non-essential metals naturally present in the environment, but the industry development significantly increased their levels in air, water and food. Regardless their decreased environmental levels in recent decades, research unequivocally confirms that exposure to low levels of Cd and Pb can damage numerous organs, including endocrine system. Furthermore, both of them have been recognized as significant factor in the occurrence/development of hormone-dependent cancers, such as breast, prostate and testis cancer. In this regard, it is necessary to consider the potential impact of simultaneous Cd and Pb exposure because the more realistic scenario is that humans are exposed to a mixture of toxic substances, and that the toxic effects of the mixture may be qualitatively and quantitatively different from the effects of individual substances. Therefore, the *case control* study aimed to determine the potential implication of Cd and Pb in the etiology of breast, prostate and testis cancer by examining oxidative status, bioelement profiles and sex hormone levels, and to establish the parameters, significant for breast, prostate and testis cancer prediction.

In vivo study with male *Wistar* rats acutely treated by Cd and/or Pb, conducted prior the retrospective *case control* study, aimed to investigate metals distribution as well the toxic metals effects and to determine the nature and intensity of Cd and Pb co-exposure effects on blood, liver, kidney, prostate and testis by evaluating oxidative status parameters and examining interactions with bioelements, copper (Cu) and zinc (Zn).

The *case control* study encompassed 55 breast, 41 prostate and 52 testis cancer patients, while control groups were represented by 41 healthy women and 61 healthy men. Significantly higher Cd levels, but lower Pb in breast tumor tissue compared to surrounding healthy tissue was established in patients, while estrogen receptor positive breast cancer characterized by higher levels of both toxic metals in tumor tissues compared to negative receptor expression. Notably higher blood Cd levels were documented in prostate and testicular cancers patients in relation to healthy subjects, and a significant accumulation of both toxic metals in prostate and testis tumor tissue was shown. Thy study recognized a significant *odds ratio* for Cd in breast cancer tissue (1.02), Cd in blood of prostate (1.18) and testis cancer patients (1.98).

The *in vivo* study showed Cd and Pb hepatotoxic and nephrotoxic effects, with more pronounced effect after mixture exposure. Regardless ability to cross the blood-testis barrier Cd and Pb did not significantly disturb testosterone homeostasis neither morphological structure of prostate and testis. *Case control* study recognized higher Cd levels in breast cancer tissue as well in blood of prostate and testis cancer patients, but no Pb levels as significant factor in cancer prediction and confirmed oxidative stress, Cu and Zn redistribution as well impaired sex hormones homeostasis as pivotal mechanisms of Cd and Pb toxicity in breast, prostate and testis cancer pathology.

Key words: cadmium, lead, mechanisms of toxicity, breast cancer, prostate cancer, testis cancer.

Academic Expertise: Pharmacy

Major in: Toxicology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. KADMIJUM.....	1
1.1.1. Izvori ekspozicije	2
1.1.2. Toksikokinetika.....	3
1.1.3. Mehanizmi toksičnosti.....	3
1.1.4. Ciljni organi toksičnosti.....	4
1.1.5. Biološki monitoring.....	7
1.2. OLOVO	8
1.2.1. Izvori ekspozicije	8
1.2.2. Toksikokinetika.....	9
1.2.3. Mehanizmi toksičnosti.....	9
1.2.4. Ciljni organi toksičnosti.....	10
1.2.5. Biološki monitoring.....	12
1.3. KARCINOM DOJKE.....	14
1.4. KARCINOM PROSTATE.....	16
1.5. KARCINOM TESTISA	18
2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA.....	20
3. MATERIJAL I METODE	21
3.1. ANIMALNA STUDIJA	21
3.1.1. Eksperimentalne životinje.....	21
3.1.2. Eksperimentalni protokol	21
3.2. HUMANA STUDIJA	23
3.2.1. Populacija žena.....	23
3.2.2. Populacija muškaraca.....	23
3.2.3. Eksperimentalni protokol	23
3.3. ODREĐIVANJE HEMATOLOŠKIH PARAMETARA	24
3.4. ODREĐIVANJE BIOHEMIJSKIH PARAMETARA U SERUMU	25
3.5. ODREĐIVANJE HORMONA U SERUMU.....	25
3.5.1. Određivanje folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH)	25
3.5.2. Određivanje estradiola.....	26
3.5.3. Određivanja testosterona	26
3.5.4. Određivanja seks hormon vezujućeg globulina (SHBG)	27
3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE TOKSIČNIH METALA I BIOELEMENATA.....	27
3.6.1. Reagensi i standardi.....	27
3.6.2. Priprema uzoraka.....	27
3.6.3. Određivanje koncentracije Cd i Pb.....	28
3.6.4. Određivanje koncentracije bioelemenata.....	28
3.7. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STATUSA	29
3.7.1. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)	29
3.7.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina	29
3.7.3. Određivanje totalnog antioksidativnog statusa (TAS).....	30
3.7.4. Određivanje totalnog oksidativnog statusa (TOS)	30
3.7.5. Određivanje uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP)	30
3.7.6. Određivanje sadržaja ukupnih sulfhidrilnih grupa (SHG).....	30
3.7.7. Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD).....	31
3.7.8. Određivanje paraoksonazne aktivnosti (POazne, EC 3.1.8.1)	31
3.7.9. Određivanje prooksidativnog-antioksidativnog balansa (PAB).....	31
3.7.10. Određivanje koncentracije superoksidnog anjona (O_2^-).....	32
3.7.11. Određivanje ishemijskom modifikovanog albumina (IMA)	32
3.8. METODOLOGIJA ODREĐIVANJA STATUSA RECEPTORA.....	32
3.8.1. Metodologija određivanja statusa estrogen (ER) i progesteron (PR) receptora.....	32
3.8.2. Metodologija određivanja human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)	33
3.8.3. Metodologija određivanja Ki-67 antigena.....	33
3.9. HISTOPATOLOŠKA ANALIZA ORGANA PACOVA.....	34

3.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	34
4. REZULTATI.....	35
4.1. ANIMALNA STUDIJA	35
4.1.1. <i>Kadmijum i olovo u krvi i organima</i>	35
4.1.2. <i>Hematološki parametri</i>	37
4.1.3. <i>Biohemijski parametri</i>	39
4.1.4. <i>Parametri oksidativnog statusa</i>	41
4.1.5. <i>Bioelementi u krvi i organima</i>	44
4.1.6. <i>Histopatološka analiza organa</i>	47
4.2. HUMANA STUDIJA	50
4.2.1. <i>Populacija žena sa karcinomom dojke</i>	50
4.2.1.1. <i>Kadmijum i olovo u krvi i tkivima</i>	51
4.2.1.2. <i>Hematološki parametri</i>	54
4.2.1.3. <i>Osnovni biohemijski parametri i status polnih hormona</i>	54
4.2.1.4. <i>Parametri oksidativnog statusa</i>	56
4.2.1.5. <i>Bioelementi u krvi i tkivima</i>	57
4.2.1.6. <i>Korelaciona analiza između koncentracija Cd i Pb i analiziranih parametara</i>	58
4.2.1.7. <i>Binarna logistička regresiona analiza</i>	61
4.2.2. <i>Populacija muškaraca sa karcinomom prostate</i>	63
4.2.2.1. <i>Kadmijum i olovo u krvi i tkivima</i>	64
4.2.2.2. <i>Hematološki parametri</i>	66
4.2.2.3. <i>Osnovni biohemijski parametri i status polnih hormona</i>	66
4.2.2.4. <i>Parametri oksidativnog statusa</i>	67
4.2.2.5. <i>Bioelementi u krvi i tkivima</i>	68
4.2.2.6. <i>Korelaciona analiza između koncentracija Cd i Pb i analiziranih parametara</i>	69
4.2.2.7. <i>Binarna logistička regresiona analiza</i>	71
4.2.3. <i>Populacija muškaraca sa karcinomom testisa</i>	73
4.2.3.1. <i>Kadmijum i olovo u krvi i tkivima</i>	73
4.2.3.2. <i>Hematološki parametri</i>	75
4.2.3.3. <i>Osnovni biohemijski parametri i status polnih hormona</i>	76
4.2.3.4. <i>Parametri oksidativnog statusa</i>	77
4.2.3.5. <i>Bioelementi u krvi i tkivima</i>	77
4.2.3.6. <i>Korelaciona analiza između koncentracija Cd i Pb i analiziranih parametara</i>	78
4.2.3.7. <i>Binarna logistička regresiona analiza</i>	80
5. DISKUSIJA	82
5.1. TOKSIČNI EFEKTI KADMIJUMA I OLOVA NAKON AKUTNE ORALNE EKSPOZICIJE <i>WISTAR</i> PACOVA	82
5.1.1. <i>Efekat na hematopoezni sistem</i>	82
5.1.2. <i>Efekat na jetru</i>	84
5.1.3. <i>Efekat na bubreg</i>	85
5.1.4. <i>Efekat na prostatu i testise</i>	86
5.2. ULOGA KADMIJUMA I OLOVA U KARCINOMU DOJKE, PROSTATE I TESTISA	88
5.2.1. <i>Uloga kadmijuma i olova u karcinomu dojke</i>	88
5.2.2. <i>Uloga kadmijuma i olova u karcinomu prostate</i>	93
5.2.3. <i>Uloga kadmijuma i olova u karcinomu testisa</i>	98
6. ZAKLJUČCI.....	101
7. LITERATURA.....	102
8. PRILOZI	122
BIOGRAFIJA AUTORA.....	122
IZJAVE.....	124

1. UVOD

Proizvodnja i upotreba hemikalija je u kontinuiranom porastu širom sveta, posebno u razvijenim zemljama, što je dovelo do značajnog porasta nivoa toksičnih supstanci u životnoj sredini, a samim tim i izloženosti stanovništva. Među njima se po svom značaju izdvajaju toksični metali koji su poznati čovečanstvu iz perioda pre nove ere, a neki od njih su korišćeni i stotinama godina unazad za razne namene (građevinarstvo, brodogradnja, kuhinjska pomagala, medicina). Kadmijum (Cd) i olovo (Pb), su neesencijalni metali, prirodno prisutni u životnoj sredini ali je razvoj industrije značajno povećao njihovu koncentraciju u vazduhu, vodi i hrani. Kao široko rasprostranjeni i nerazgradivi zagađivači životne sredine, izazivaju veliku zabrinutost zbog svojih toksikoloških osobina [1]. Kadmijum i olovo se nalaze na listi deset prioritetnih hemikalija prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO; eng. *World Health Organization*, WHO) [2]. Takođe, Američka agencija za registar toksičnih supstanci i bolesti (eng. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, ATSDR) zbog široke rasprostranjenosti, toksičnosti i potencijalne izloženosti ljudi, svrstala je Pb na drugo, a Cd na sedmo mesto prioritetne liste opasnih supstanci [3].

1.1. Kadmijum

Kadmijum je relativno mlad metal, otkriven 1817. godine [4]. U zemljinoj kori se nalazi u obliku ruda zajedno sa cinkom (Zn), olovom i bakrom (Cu), u obliku oksida, sulfida i karbonata. Kao nečistoća, pratilac je cinka, olova i bakra, ali i gvožđa, kao i čelika. Zbog svojih fizičkih osobina kadmijum je našao široku primenu u industriji. Naime, odlična otpornost na koroziju, niska temperatura topljenja, rastegljivost, dobra provodljivost (toplotna i električna) su osobine koje su dovele do velike upotrebe kadmijuma u proizvodnji Ni-Cd baterija, pigmenata (staklo, keramika, emajl, slikarske boje, vatromet), poluprovodnika i električnih uređaja, za premazivanje, a koristi se i kao stabilizator u proizvodnji proizvoda od plastike (stabilizator protiv zagrevanja i svetlosti). U vazduhu i vodi se mogu naći čestice Cd (elementarni Cd, u obliku oksida, sulfida i hlorida) dospele iz prirodnih izvora (erozija i spiranje stena, vulkanska aktivnost, isparavanje vode, požari), međutim daleko značajniji izvori Cd su antropogene aktivnosti (metalna industrija, rudarstvo i metalurgija, proizvodnja cementa, otpadne vode industrijskih postrojenja, sagorevanje goriva, spaljivanje otpada, upotreba fertilizera). Prema podacima SZO visoke koncentracije Cd (>1 mg/kg) su izmerene u zemljištu u neposrednoj blizini topionica i drugih industrijskih zona koje se dovode u vezu sa Cd [5].

Prvi slučaj toksičnog dejstva Cd zabeležen je 1858. godine pri upotrebi Cd karbonata za poliranje, zatim dvadesetih godina XX veka prikazani su prvi slučajevi profesionalnog trovanja, a ubrzo potom, u eksperimentima sa životinjama pokazano je da Cd može delovati toksično na više organa i organskih sistema [4]. Tako su kod radnika koji su bili profesionalno izloženi Cd pored gastrointestinalnih smetnji (povraćanje, dijareja, abdominalni bolovi) i oštećenja respiratornog trakta (inflamacija, emfizem pluća) zabeležene i osteomalacija i proteinurija. Nedugo nakon Drugog svetskog rata u Japanu (*Fuchi*) se desilo trovanje stanovništva kadmijumom, poznato kao bolest Itai-itai (eng. *Ouch-Ouch disease*, bolest „jao jao“) koja se manifestovala pseudofrakturama dugih kostiju, dekalifikacijom i frakturom ostalih kostiju, karakterističnim znacima osteomalacije, a do trovanja je došlo usled upotrebe kontaminirane vode (reka Jinzi) kadmijumom koja se koristila za navodnjavanje pirinčanih polja [4].

Kod obolelih su utvrđene visoke aktivnosti alkalne fostataze kao i niske koncentracije kalcijuma i fosfora. Takođe, bolest je pratila anemija, gastrointestinalni poremećaji i bubrežna disfunkcija [4].

1.1.1. Izvori ekspozicije

Glavni put izloženosti Cd opšte populacije nepušača primarno je putem hrane, nešto manje putem vode za piće a daleko najmanji procenat kadmijuma se unosi putem vazduha. Faktori koji utiču na nivo Cd u hrani pre svega zavise od nekoliko faktora: vrsta hrane, uslovi uzgajanje proizvoda poput tipa zemljišta i koncentracije Cd u vodi/zemljištu. Visoko zagađena područja u blizini industrijskih postrojenja koja se dovode u vezu sa oslobađanjem Cd u životnu sredinu odlikuju se većim koncentracijama Cd u vodi, vazduhu i zemljištu, tako da se u tim regionima mogu očekivati i veće koncentracije Cd u proizvodima namenjenih ishrani. Takođe, upotreba fertilizera sa visokim sadržajem Cd rezultovaće većim koncentracijama Cd u životnoj sredini. Većina namirnica sadrži tragove Cd, a veće koncentracije mogu se naći u morskim plodovima (školjke), iznutricama (mesne preradevine), gljivama, lisnatom povrću poput spanaća, korenastim plodovima poput krompira, ceralijama, lešnicima, kikirikiju, suncokretu. Prema zvaničnim podacima prosečan unos Cd na dnevnom nivou kreće se u rasponu od 0,1 do 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne mase (t.m.) u većini zemalja [5]. Minimalna vrednost nedeljnog unosa Cd za opštu populaciju u Srbiji iznosi 0,343 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m., a maksimalna 26,993 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m., primenom najnepovoljnijeg scenarija ishrane [6]. Prema podacima Zajedničke ekspertske komisije FAO/WHO za aditive i kontaminante hrane (eng. *Joint Food and Agriculture Organization FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants*, JECFA) prihvatljivi tolerišući mesečni unos (eng. *provisional tolerable monthly intake*, PTMI) Cd, po podacima iz 2010. godine, iznosi 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. Prethodno prihvatljiva vrednost nedeljnog unosa od 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. (eng. *provisional tolerable weekly intake*, PTWI), uzevši u obzir dugo poluvreme eliminacije iz organizma, je povučena [7]. Prema najnovijem izveštaju JECFA iz 2021. godine vrednost PTMI se nije menjala (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m.) i odgovara dnevnom unosu Cd od 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. [8]. Procenjen nedeljni unos Cd putem hrane na teritoriji Srbije u granicama je tolerišućeg nedeljnog unosa preporučenog od strane Evropske agencije za bezbednost hrane [6]. Prema istim podacima, na teritoriji Srbije, najveće koncentracije Cd se nalaze u morskim plodovima (riba, rakovi, školjke kao i njihovi proizvodi), žitaricama, kafi, kakau i čajevima. Međutim, preračunom nedeljnog unosa namirnica iz odgovarajućih kategorija dominantna ekspozicija Cd je ipak preko povrća i proizvoda od povrća (33,5%), potom putem žitarica (32,4%), dok je najmanji procenat, od svega 1,2%, procenjen za jaja i proizvode od jaja [6].

Opšta populacija pušača je dominantno izložena Cd preko duvanskog dima. Naime, list biljke duvana (lat. *Nicotiana tabacum*) je prirodan akumulator Cd, a osobe putem duvanskog dima prosečno inhalatornim putem mogu da unesu oko 1,7 $\mu\text{g}/\text{Cd}$ po cigareti [5]. Važno je istaći činjenicu da prosečna koncentracija Cd u listu duvanu zavisi od porekla duvana, te da se prisutne marke cigareta na tržištu međusobno razlikuju po njegovom sadržaju.

Za profesionalnu ekspoziciju glavni put unosa Cd je putem vazduha, a malim procentom i putem kontaminiranih ruku, hranom, kao i preko kože. Prema Evropskoj bazi podataka CAREX radne grupe (CARcinogen EXposure) u periodu 1990-1993 godine oko 200 000 radnika je bilo izloženo Cd i jedinjenjima Cd na radnim mestima (radnici na metalnoj konstrukciji, u fabrikama metalne i plastične industrije) [5].

1.1.2. Toksikokinetika

Dominantni put unosa kadmijuma za opštu populaciju je gastrointestinalni trakt, odnosno respiratorni trakt za pušače i profesionalno izložene osobe. Apsorpcija kadmijuma koji je unet inhalatornim putem kreće se u rasponu od 25 do 50% i zavisi od veličine čestice kao i hemijskog oblika. Apsorpcija putem gastrointestinalnog trakta je niža i iznosi 1-10% [9]. Starost, pol, hemijski oblik kadmijuma, vrsta hrane kao i opšte metaboličko stanje organizma su presudni za proces apsorpcije kadmijuma. Apsorpcija nakon oralne ekspozicije se odvija u dve faze, prelaskom iz lumena gastrointestinalnog trakta u mukozu se završava prva faza, dok druga faza obuhvata prelazak kadmijuma u cirkulaciju. Apsorpcija se odvija primarno u duodenumu transporterom za dvovalentne jone (eng. *divalent metal transporter-1*, DMT-1), potom putem kanala za kalcijum, te kanalima za *simport* i *antiport* poput Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP-aze i Ca^{2+} / Na^{+} -ATP-aze. Nakon apsorpcije Cd se u organizmu distribuira putem krvi, pre svega pomoću eritrocita i/ili proteina plazme [10]. Najveća udeo apsorbovanog Cd se vezuje za visokomolekularne proteine, dok je manji procenat vezan za proteine male molekulske mase, metalotioneine kao i druge proteine koji poseduju sulfhidrilne grupe [10,11]. Kadmijum se putem krvi distribuira u jetru, bubrege kao i u ostale organske sisteme. Nakon kratkotrajne izloženosti koncentracije Cd u jetri u bubrezima su slične, međutim nakon hronične ekspozicije najvećim procentom se nalazi u bubrezima. Kadmijum ne podleže metaboličkim reakcijama poput oksidacije i redukcije. Poluvreme eliminacije Cd kod ljudi iznosi preko 20 godina [9] i odraz je pre svega deponovanja u jetri i bubrezima, dok se manje koncentracije mogu naći u mišićima, koži i kostima. Tako je poluvreme života Cd u bubrezima između 6 i 38 godina, koji predstavlja i ciljni organ hronične toksičnosti, dok je poluvreme života u jetri između 4 i 19 godina [9]. Dominantni putevi ekskrecije su putem urina i fecesa, a u manjoj meri preko znoja, pljuvačke, kose i noktiju, seminalne tečnosti kod muškaraca, dok kod žena i putem mleka [9].

1.1.3. Mehanizmi toksičnosti

Brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja sprovedena su sa ciljem da se utvrde mehanizmi toksičnosti kadmijuma. Kadmijum pokazuje sposobnost vezivanja za funkcionalne grupe koje sadrže kiseonik, azot i sumpor tako da biomolekul može biti blokiran, aktivni konformacioni oblik može biti izmenjen ili esencijalni jon metala iz biomolekule istisnut čime se narušava biološka funkcija proteina i enzima [12,13]. Iako je Radna grupa koja se bavila ispitivanjem interakcija među metalima (*The Task Group on Metal Interactions*) još 1978. godine ukazala na potencijalne interakcije između toksičnih metala i bioelemenata, na nivou apsorpcije, distribucije i eliminacije [12], kao i u fiziološkim procesima, ovaj mehanizam toksičnosti do danas nije u potpunosti rasvetljen. Interakcije kadmijuma sa bioelementima pokazane su u brojnim radovima naše grupe autora, a ova istraživanja su potvrdila neke od hipoteza: ekspozicija Cd negativno deluje na homeostazu bioelemenata (Mg, Zn, Cu i Fe) u krvi i tkivima dok suplementacija cinkom i magnezijumom značajno smanjuje nivoe Cd u krvi i organima nakon subakutne ekspozicije Cd uz poboljšavanje narušene homeostaze bioelementa [14–16]. Budući da bioelementi imaju brojne esencijalne funkcije u organizmu, strukturna su komponenta mnogih enzima među kojima i komponenta antioksidativne zaštite, ulaze u sastav citohroma, neophodni su za sintezu ATP, regulišu gensku ekspresiju i intracelularnu signalizaciju, narušena homeostaza bioelemenata sa jedne strane i deficit sa druge strane mogu dovesti do brojnih poremećaja [17].

Iako kadmijum nije Fentonov metal, oksidativni stres je nesumnjivo jedan od važnijih mehanizama njegove toksičnosti. Generisanje slobodnih radikala kiseonika i azota kao i potrošnja ćelijske antioksidativne zaštite, simultano i povezano, nalaze se u osnovi slobodno radikalskih oštećenja izazvanih kadmijumom. Takođe, kadmijum može zameniti Cu i Fe u različitim citoplazmatskim proteinima povećavajući njihovu koncentraciju u slobodnoj formi što dalje rezultuje pokretanjem oksidativnog stresa (Fentonova reakcija). Vezivanjem za sulfhidrilne grupe proteina kao i zamenom bioelementa u aktivnom centru brojnih enzima Cd ne narušava samo oksidativnu ravnotežu već generiše i nastanak lipidne peroksidacije, narušava funkciju proteina i dovode do strukturnih promena molekula DNK. Promenom u strukturi DNK narušava se replikacija, transkripcija i translacija koje vode nastanku mutacija, programiranoj ćelijskoj smrti kao i razvoju tumora [18–21]. Međutim, iako se oksidativni stres dovodi u vezu sa karcinomima, često se postavlja pitanje da li je on uzrok ili posledica bolesti [22–25]. Apoptoza je još jedan od poznatih mehanizama koji se nalaze u osnovi toksičnosti metala, te i kadmijuma, koju karakterišu oštećenje potencijala ćelijske membrane mitohondrija, kondenzacija hromatina, fragmentacija DNK i jedra [26–29].

U *in vitro* studijama na ćelijskim linijama sisara Cd indukuje oštećenje DNK i aberaciju hromozoma, pokazuje slab mutagen potencijal ali ne dovode do oštećenja izolovane DNK [5,26,27]. Literaturni podaci ukazuju da Cd ispoljava karcinogeno dejstvo kod eksperimentalnih životinja i ljudi [5]. Budući da ima nizak afinitet vezivanja za DNK i da je slabo mutagen, kadmijum se svrstava u negenotoksične karcinogene [30]. Mehanizmi koji se nalaze u osnovi karcinogeneze Cd identifikovani su u brojnim toksikogenomskim studijama i mogu se klasifikovati u četiri kategorije: narušavanje genske ekspresije i inhibicija popravke DNK oštećenja, generisanje oksidativnog stresa, uticaj na funkciju tumor supresora kao i inhibicija apoptoze [31]. Takođe, Cd može aktivirati protoonkogene kao i gene odgovorne za proliferaciju ćelija poput *c-myc*, *c-fos* ili *c-jun* [32,33], odnosno, aktivacijom onkogeni i inhibicijom tumor supresora (p53 i p27) Cd ubrzava proliferaciju prethodno aktiviranih ćelija, ostvarujući ulogu tumor promotora [30,32,33]. Potom, smatra se da se selektivni antagonizam sa cinkom nalazi u osnovi karcinogeneze nekih tkiva, poput pluća i testisa [30]. Takođe, uticaj koji Cd ima na DNK metilaciju, ćelijsku proliferaciju i endokrini potencijal, mogu dodatno doprineti njegovom karcinogenom potencijalu [27].

1.1.4. Ciljni organi toksičnosti

Kadmijum ispoljava toksične efekte na većinu organskih sistema, ali se kao ciljni organi izdvajaju bubreg, jetra, pluća, kosti, hematopoezni kao i nervni sistem. Takođe, danas mu se pripisuju i toksični efekti na kardiovaskularni, endokrini, reproduktivni i imuni sistem.

Akutna oralna ekspozicija visokim dozama toksičnih metala, pa i kadmijuma, manifestuje se toksičnim efektom na gastrointestinalni trakt (nauzeja, povraćanje, salivacija, abdominalan bol, dijareja), a što nije odlika hronične izloženosti. Progresivne histopatološke promene poput oštećenja epitelnih ćelija, intersticijalna fibroza te narušavanje integriteta bazalne membrane glomerula su posledica nefrotoksičnosti kadmijuma, s obzirom da su bubrezi ciljni organi toksičnog dejstva Cd. Kadmijum narušava glomerularnu filtraciju i tubularnu reapsorpciju, bez obzira na put ulaska u organizam. Visoke oralne doze Cd mogu delovati hepatotoksično, međutim, hronična izloženost niskim dozama ne narušava funkcionalni integritet hepatocita, te se danas smatra da toksično dejstvo Cd na jetru kod ljudi nije od većeg značaja [9]. Akutna ekspozicija visokim koncentracijama Cd putem vazduha, koja se nekada videla kod profesionalno izloženih osoba, dovodila je do plućnog edema i pneumonitisa, kao i

letalnog ishoda, dok se hronična profesionalna izloženost niskim dozama Cd dovodi u vezu sa dispneom, bronhitisom, fibrozom i emfizemom, te hroničnim opstruktivnim bolestima pluća. Osteoporoza, osteomalacija, smanjena gustina kao i povećane frakture kostiju pokazane su kod profesionalne izloženosti kadmijumu, kao i kod stanovnika doline reke Jinzu u Japanu. Nastale promene su posledica oštećene funkcije bubrega, poremećaja metabolizma vitamina D uz smanjen nivo vitamina D i narušene homeostaze paratiroidnog hormona, pojačane eliminacije Ca iz organizma i smanjene mineralizacije/kolagenizacije koštanog matriksa. Oralna ekspozicija Cd može dovesti do anemije usled smanjene apsorpcije gvožđa u gastrointestinalnom traktu, međutim izvesne animalne studije ukazuju i na redukovan broj ćelija eritroidnih progenitora kao posledica smanjene produkcije eritropoetina i/ili direktnog citotoksičnog dejstva Cd na ćelije eritropoeze kosne srži. Danas se sve veća pažnja posvećuje dejstvu toksičnih supstanci pa i Cd na nervni sistem. Eksperimentalne studije potvrđuju neurotoksičnost Cd usled akutne oralne (smanjena motorika) i produžene izloženosti (slabost, atrofija mišića, agresivno ponašanje, anksioznost). Epidemiološke studije prenatalnu izloženost Cd dovode u vezu sa smanjenjem verbalnog IQ i smanjenom pažnjom dok se demencija, oštećenje čulo mirisa, pamćenje kao i poremaćaji u perifernom nervnom sistemu i polineuropatija dovode u vezu sa profesionalnom ekspozicijom. Ispitivanja su pokazala da kadmijum povećava vrednost krvnog pritiska, prevalancu hipertenzije kao i drugih kardiovaskularnih bolesti, dok je broj studija koje ukazuju na kardiotoksičnost Cd ograničen [9,19,34–38].

Krajem XX veka veliku pažnju naučnika privukle su hemijske supstance koje mogu da blokiraju vezivanje prirodnih hormona, odnosno koje mogu umesto prirodnih hormona da se vezuju za njihove receptore. Hemijske supstance koje pokazuju ovakvu aktivnost nazvane su endokrini ometači (eng. *endocrine-disrupting chemicals*, EDCs) [39]. Brojne hemijske supstance, kao i neki toksični metali poput Cd i Pb, prepoznate su kao endokrini ometači [40,41]. Tako je u velikoj NHANES studiji (eng. *National Health and Nutrition Examination Survey*) pokazana značajna pozitivna korelacija između koncentracije Cd u urinu i prevalence narušene homeostaze glukoze i dijabetesa. Potom, u studijama sa eksperimentalnim životinjama cirkadijalni ritam adrenokortikotropnog hormona i hormona rasta narušen je nakon produžene oralne ekspozicije Cd [9]. Metaloestrogeni su supstance za koje je pokazano da mogu da se vezuju za estrogene receptore (EP), aktiviraju ih i ostvaruju fiziološku funkciju estrogena (tzv. mimikrija). Brojnim *in vitro* studijama pokazano je da toksični metali, poput Cd, imaju jak afinitet prema ER i da poseduju sposobnost istiskivanja cinka iz cink domena ER. Takođe, na ćelijskoj liniji LNCaP (androgen zavisne humane ćelije karcinoma prostate) kadmijum oponaša efekat androgena na rast ćelija i ekspresiju gena [40–43].

Mnogobrojna istraživanja koja su realizovana na animalnim modelima nedvosmisleno potvrđuju da toksični metali, Cd i Pb, mogu dovesti do oštećenja različitih organskih sistema i do nastanka karcinoma [5,44]. Na osnovu podataka dobijenih iz studija sprovedenih kod ljudi da izaziva karcinom pluća, Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma (eng. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) je 1993. godine svrstala Cd u grupu 1 humanih karcinogena [45]. Prema poslednjem izveštaju iz 2021. godine IARC povezuje Cd i sa pojavom karcinoma bubrega i prostate, ali sa ograničenim dokazima u humanim studijama [46], dok prema literaturnim podacima, izloženost kadmijumu iz radne i životne sredine dovodi se u vezu i sa pojavom karcinoma pankreasa, bubrega, bešike i dojke [5]. Rezultati eksperimentalnih *in vitro* i *in vivo* studija jasno ukazuju i da endokrini efekat toksičnih metala predstavlja veliki predmet interesovanja, a da narušavanje funkcije hipofiza-hipotalamus ose uz potencijalni disbalans nivoa polnih hormona nesumnjivo ima učešće u nastanku karcinoma dojke, prostate i testisa [9,47,48]. Međutim, dostupne humane studije imaju ograničenu sposobnost da detektuju efekte i tako oslonjeni na animalne modele ojačavaju dokaze o povezanosti između izloženosti toksičnim metalima i pojave ovih karcinoma [49].

Garcia-Morale i sar. (1994) su među prvim istraživačima pokazali povezanost između Cd i karcinoma dojke u studiji sa humanom ćelijskom linijom karcinoma dojke (MCF-7) kada je nakon ekspozicije od 1 μM Cd ostvareno smanjenje broja ER (58%) i trostruko povećanje broja progesteron receptora (PR). Estrogeni efekat Cd pokazan je i u *in vivo* studijama na animalnim modelima i studijama kod ljudi [40,42]. Tako su značajne koncentracije Cd prikazane u četiri različita regiona tumorskog tkiva dojke pacijentkinja nakon mastektomije [51], kao i značajno više koncentracije Cd u tumorskom u odnosu na odgovarajuće zdravo tkivo iste dojke [52], dok je studija sprovedena od strane *Antila* i sar. [53] ukazala na razliku u nivoima bioelemenata (Cu, Zn, Se) između tumorskog i zdravog tkiva dojke. Međutim, kohortna studija [54] koja je objedinila istraživanje tri prospektivne studije nije pokazala značajnu povezanost između izmerenih nivoa Cd u krvi i rizika od pojave karcinoma. U studiji sprovedenoj u Švedskoj [55] koja je obuhvatila postmenopauzne žene bez hormonske terapije pokazana je značajna pozitivna korelacija između koncentracije Cd u krvi i nivoa testosterona, a inverzna korelacija sa nivoom estradiola, ukazujući na potencijalan uticaj Cd na disbalans hormona koji doprinosi nastanku karcinoma dojke [55].

Povezanost između izloženosti kadmijumu i povećanog rizika od pojave karcinoma prostate prvi put je zapažena 60-ih godina XX veka kod radnika u proizvodnji Ni-Cd baterija [41,56], a deceniju kasnije retrospektivna kohortna studija [57] je pokazala povećanje incidence smrtnih ishoda od karcinoma prostate kod radnika koji su bili izloženi kadmijumu [57]. Meta analiza sprovedena od strane *Zhang* i sar. [58] pokazala je da su nivoi Cd koji su izmereni u krvi i tkivu prostate obolelih od karcinoma prostate značajno viši od nivoa Cd izmerenih kod kontrolne grupe, dok je *case-control* studija [59] sprovedena u Kini u kojoj je učestvovalo oko 300 dobrovoljaca pokazala jasnu povezanost između izloženosti Cd sa prevalencom abnormalnih vrednosti prostata-specifičnog antigena (PSA) te i sa narušenom homeostazom polnih hormona. Prema poslednjim izveštajima IARC Cd je prepoznat kao agens koji se dovodi u vezu sa karcinomom prostate, međutim, broj dokaza iz humanih studija je još uvek ograničen [46,60]. Rezultati *in vivo* studija ukazuju na apoptozu ventralnog lobusa prostate pacova nakon akutne *s.c.* primene Cd praćenu povećanom ekspresijom tumor supresora (p53) i *c-jun* protoonkogena [33] kao i na značajno uvećanje prostate koje u slučaju primene antagonista androgenih i estrogenih receptora (α i β) neposredno pre tretmana Cd izostaje [61–63].

Parizek i sar. su davne 1957. godine pokazali da subakutna ekspozicija soli kadmijuma dovodi do oštećenja tkiva testisa pacova, a da istovremena primena cinka deluje protektivno [64]. Ubrzo potom, grupa autora *Waalkes* i sar. u svojim istraživačkim radovima ukazali su na sposobnost Cd da nakon akutne *s.c.* ekspozicije dovodi do nastanka karcinoma testisa pacova [32,65,66], kao i da primena cinka redukuje incidencu nastanka tumora gotovo sedam puta. Takođe, akutna *i.p.* izloženost Cd vodi nastanku apoptoze ćelija testisa i značajno redukuje broj spermatozoa [67]. Sa druge strane, humane studije još uvek ne prepoznaju Cd kao značajnog agensa koji se dovodi u vezu sa karcinomima testisa, te prema aktuelnim IARC podacima kadmijum se ne nalazi na listi uzročnika karcinoma testisa [46]. Međutim, dostupne humane studije ukazuju na korelacije između nivoa Cd u krvi i smanjene veličine testisa, narušene homeostaze polnih hormona te smanjene reproduktivne sposobnosti muškaraca [68,69] ukazujući na toksične efekte Cd koji potvrđuju njegovu reproduktivnu toksičnost.

1.1.5. Biološki monitoring

Koncentracije Cd u krvi, urinu, jetri, bubrezima, kosi kao i drugim tkivima mogu se koristiti kao biološki indikatori izloženosti. Za procenu stepena izloženosti opšte populacije i profesionalne izloženosti kao materijal izbora koriste se krv i urin. Koncentracija Cd u krvi reprezentuje aktuelnu ekspoziciju i po podacima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (eng. *Center for Disease Control and Prevention*, CDC) iz 2011. godine opšte neizložene populacije je manja od 2 µg Cd/L. Sa druge strane, Cd u urinu reflektuje telesno opterećenje, a po podacima CDC iz 2011. godine vrednost 95-og percentila u populaciji žena iznosi 1,09 µg Cd/g kreatinina, odnosno muškaraca 0,74 µg Cd/g kreatinina [9]. U skladu sa podacima CDC su i koncentracije Cd u krvi stanovnika Srbije. Naime, prosečna koncentracija Cd u krvi opšte neizložene populacije nepušača kod odraslih stanovnika Srbije iznosi $0,67 \pm 0,04$ µg Cd/L, međutim kao posledica povećanog unosa Cd putem duvanskog dima, prosečne koncentracije Cd u krvi pušača značajno su više od nepušača (2,41 µg/L vs. 0,67 µg/L) [70]. Sa druge strane, u studiji sa radnicima koji su profesionalno izloženi Cd (osobe zaposlene u industriji Ni-Cd baterija), prosečne ekspozicije od 10 do 32 godina, utvrđene su značajno više koncentracije Cd u krvi i urinu u odnosu na kontrolnu grupu sastavljenu od radnika koji nisu profesionalno izloženi. Izmerena koncentracija Cd u krvi iznosila je oko 10 µg/L, a u urinu 8,76 µg/g kreatinina [71].

Jetra i bubrezi, kritični organi toksičnosti i deponovanja Cd, predstavljaju najbolje pokazatelje stepena izloženosti, međutim instrumentalne tehnike za određivanja Cd u njima (*in vivo* neutron aktivaciona analiza i X-ray fluorescentna analiza), kao i biopsija tkiva, ne predstavljaju rutinske metode, te se procena izloženosti i njihovog oštećenja vrši indirektno putem biomarkera efekta. Važno je istaći i podatak da koncentracija Cd u oba organa sa godinama starosti raste i po literaturnim podacima u bubrezima dostiže pik između 50-te i 60-te godina starosti dok u jetri koncentracija Cd kontinuirano raste. Prema podacima ATSDR prosečne koncentracije Cd u kori bubrega iznose oko 25-40 µg/g vlažne mase, a u jetri oko 1-3 µg/g [9].

Rani pokazatelj nefrotoksičnosti Cd je disfunkcija tubula bubrega koja se manifestuje povećanom ekskrecijom proteina male molekulske mase u urinu, poput beta 2 mikroglobulina (β2MG), retinol vezujućeg proteina (eng. *retinol binding protein*, RBP), alfa 1 mikroglobulina (α1MG) i N-acetil-β-D-glukozaminidaze (NAG). Umereno povećanje β2MG ili RBP u urinu, u opsegu od 300-1000 µg/g kreatinina, ukazuje na kompromitovanu bubrežnu funkciju i obično je reverzibilna promena nakon redukovanja ekspozicije Cd. Sa druge strane, kada su koncentracije β2MG ili RBP u urinu iznad 1000 µg/g kreatinina, proteinurija usled disfunkcije tubula je ireverzibilna, dok vrednosti iznad 10000 µg/g kreatinina ukazuju na nefropatiju koja je često udružena sa smanjenom glomerularnom filtracijom [7].

1.2. Olovo

Olovo je jedan od najstarijih elemenata poznat civilizaciji. Istorijski podaci o rudnicima olova datiraju iz perioda pre nove ere. Drevni Egipćani, Hebreji kao i Feničani su iskopavali rudu olova 2000 godina pre nove ere, a prvi pisani podaci o toksičnosti olova zapisani su na starim Egipatskim papirnim svicima. Rimljani su koristili ovaj metal za proizvodnju cevi za vodovodni i kanalizacioni sistem, za izradu posuđa, proizvodnju stakla i keramike [72]. Sa razvojem industrije upotreba olova je bila sve veća, a koristilo se u industriji oružja, grnčarstvu, brodogradnji, za proizvodnju cevi, stakla, pigmenata, boja kao i u štamparijama. Takođe, olovo se koristilo i u medicini kao lek za popravljjanje raspoloženja. Iako je „olovna kuga“ vladala svetom dugi niz godina, tek su Paracelsus i Ramazini otvorili oči stručnoj javnosti i konačno jasno povezali toksičnost sa simptomima trovanja kod rudara i osoba koje su se bavili grnčarstvom, a bili su izloženi olovu [72,73].

1.2.1. Izvori ekspozicije

Olovo se u prirodi nalazi u obliku minerala sa kiseonikom i sumporom (PbS , $PbSO_4$, $PbCO_3$, Pb_3O_4). Rude olova su veoma rasprostranjene u svetu, međutim pored prirodnih izvorišta, antropogena aktivnost je dodatno doprinela emitovanju olova u prirodi rezultujući višestrukom povećanju Pb u životnoj sredini (preko hiljadu puta) u poslednja tri veka [48]. Najveće oslobađanje olova je u rudnicima olova, prilikom iskopavanja i obrade ruda, potom metalurgija, proizvodnja baterija, upotreba goriva, spaljivanje otpada. Olovo je otporno na koroziju, lepo se oblikuje i savija te je našlo široku primenu u proizvodnji cevi, baterija, sačme, akumulatora, ali i pigmenata, keramike te kao antideonator u proizvodnji goriva (tetraetil olovo). Tri glavna antropogena izvora olova su olovni benzin, boje koje sadrže Pb i baterije. Međutim, izloženost olovu je prepoznata kao veliki zdravstveni problem, zbog čega su mnoge države zabranile njegovu upotrebu u ovim ali i u drugim proizvodima, tako da je naročito nakon zabrane upotreba olova kao aditiva u benzinu drastično smanjena njegova koncentracija u životnoj sredini. Upotreba boja koje su sadržale Pb zabranjena je 1978. godine, pesticidi na bazi Pb su zabranjeni 1988. godine, primena Pb kao antidetonatora u gorivu 1996. godine, a početkom 2017. godine donet je Zakon o zabrani korišćenja olovne municije, ali je ubrzo povučen [74]. Prema podacima ATSDR u 2014. godini preko 70 kompanija u SAD upotrebljavala je olovo za proizvodnju municije, građevinskog materijala, prekrivača za strujne i komunikacione kablove, stakla, pigmenata, delova elektronske i pomoćne opreme, delova za automobile kao i baterija za računare i telekomunikacione mreže [75]. Visoko zagađena područja u blizini industrijskih postrojenja koja se dovode u vezu sa olovom, odlikuju se većim koncentracijama Pb u vodi, vazduhu i zemljištu, gde se i očekuju veće koncentracije Pb u proizvodima koji su namenjeni za ishranu. Prosečne koncentracije Pb u mleku i proizvodima od mleka, voću i povrću su veoma niske, obično i ispod detekcionih limita instrumentalnih tehnika. Nešto veće koncentracije mogu se naći u zelenim lisnatim povrtarskim kulturama, poput spanaća i zelene salate, kao i u paradajzu. Potom, kao i kod kadmijuma, ali u dosta manjem procentu, olovo se može naći u duvanu i duvanskom dimu. Procenjena vrednost nedeljnog unosa Pb opšte populacije u Srbiji kreće se u intervalu od 4,725 do 34,363 μg Pb/kg t.m. pri čemu povećan rizik postoji samo za maksimalan unos. Najveće koncentracije Pb izmerene su u grupi čajeva i začinicima (140 ng/g) kao i dodacima jelu (80 ng/g), a najveći doprinos ukupnom unosu Pb imale su žitarice i brašno (30,6%) kao i krompir (7,1%) [76]. U svetu, prosečan unos Pb putem hrane iznosi 0,576 μg /dan [75], a prema podacima JECFA prethodno prihvaćena vrednost PTWI od 25 μg Pb/kg

t.m. smatra se nebezbednom, imajući u vidu značajnu osetljivost dece na toksično dejstvo olova, i povučena je [77].

1.2.2. Toksikokinetika

Glavni putevi izloženosti opšte populacije olovu su oralni (putem hrane i vode), inhalacioni (putem vazduha) i dermalni (preko kože). Apsorpcija nakon oralne ekspozicije se odvija primarno u duodenumu aktivnim transportom, difuzijom kroz intestinalne epitelne ćelije (transcelularno), a kao dvovalentni katjon i Pb može koristiti kanale za kalcijum kao i transporter za dvovalentne jone (DMT-1), kanale za *simport* i *antiport* (Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP-aza, Ca^{2+} / Na^{+} -ATP-aza) koji pokazuju kinetiku zasićenja. Apsorpcija Pb u gastrointestinalnom traktu se menja sa godinama starosti, te je kod dece značajno veća u odnosu na odrasle osobe. Tako se vrednosti apsorpcije za decu kreću u intervalu od 40 do 50% naspram odraslih kod kojih je apsorpcija daleko manja i iznosi od 3 do 10%. Na apsorpciju značajno utiče prisustvo i vrsta hrane u gastrointestinalnom traktu pri čemu kalcijum i fosfati iz hrane smanjuju apsorpciju. Sa druge strane, značajnu ulogu u apsorpciji Pb ima i nutritivni status organizma. Naime, povećana apsorpcija Pb u gastrointestinalnom traktu pokazana je kod anemije uzrokovane nedostatkom gvožđa i kod hipokalcijemije [75]. Nakon apsorpcije Pb se u organizmu distribuira putem krvi, dominantno se nalazi u eritrocitima (preko 90%), ali i vezan za proteine plazme [78]. Glavni mehanizmi koji su odgovorni za ulazak Pb u eritrocite su anjonska izmena zavisna od bikarbonata, Ca^{2+} kanali i Ca^{2+} / Mg^{2+} -ATP-aza. Nakon ulaska u eritrocite, Pb se vezuje za dehidratazu δ -aminolevulinske kiseline (δ -ALAD), jedan od ključnih enzima u sintezi hemoglobina, dok je daleko manjim procentom vezan i za druge enzime/proteine male molekulske mase u eritrocitima. U plazmi, Pb se može transportovati vezan za albumin, potom putem proteina male molekulske mase, metalotioneina, te kao slobodan jon (Pb^{2+}) [75]. Hematopoezni sistem je jedan od najosetljivijih sistema a krv pored toga što učestvuje u transportu olova kroz organizam je istovremeno i ciljni organ toksičnosti [9,75]. Olovo se putem krvi distribuira u jetru, bubrege ali i u ostale organske sisteme. Dugo poluvreme eliminacije Pb (>10 godina) rezultat je njegovog deponovanja u kostima (>90% apsorbovanog Pb se deponuje u kostima). Manje koncentracije Pb se mogu naći i u mekim tkivima. Distribucija Pb u mekim tkivima, uzimajući aproksimativnu vrednost za jetru 1, izražena kao odnos organ/jetra iznosi: 1 za jetru, 0,8 za bubrege, 0,4 za pankreas, 0,4 za jajnike, 0,3 za slezinu, 0,2 za prostatu, 0,2 za nadbubrežne žlezde, 0,1 za mozak, 0,1 za masno tkivo, 0,08 za testise, 0,07 za srce, 0,05 za mišiće [75]. Neorgansko olovo ne podleže metaboličkim reakcijama poput oksidacije i redukcije dok se organsko olovo metaboliše putem citohroma P-450 reakcijama oksidativne dealkilacije. Bez obzira na put ekspozicije olovo se primarno ekskretuje putem urina i fecesa, a manjim procentom putem znoja, pljuvačke, preko kose i noktiju, seminalne tečnosti kod muškaraca, i putem mleka kod osoba ženskog pola [75].

1.2.3. Mehanizmi toksičnosti

Olovo je jedan od najviše proučavanih toksičnih metala. Studije realizovane na ovu temu utvrdile su brojne ćelijske, intracelularne i molekularne mehanizme koji se nalaze u osnovi toksičnosti olova. Vezivanjem za sulfhidrilne grupe proteina olovo narušava aktivnost brojnih signalnih puteva, utiče na rast i diferencijaciju ćelija, gensku ekspresiju, narušava normalno funkcionisanje metaboličkih puteva kao i energetske metabolizam. Potom, vezivanjem za sulfhidrilne grupe olovo inhibira i aktivnost enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT, GPx, G6PD) i redukuje nivo glutaciona [18,20].

Iako olovo nije Fentonov metal, generisanje slobodnih radikala i narušavanje homeostaze oksidativnog statusa jedan je od važnih mehanizma njegove toksičnosti. Dva nezavisna međusobno povezana mehanizma koja se nalaze u osnovi slobodnoradikalskog oštećenja su generisanje reaktivnih vrsta kiseonika i/ili azota i trošenje antioksidativne zaštite ćelija. Tako, inhibicijom δ -ALAD dolazi do akumulacije δ -aminolevulinske kiseline koja dovodi do generisanja reaktivnih vrsta kiseonika usled autooksidacije [20]. Takođe, olovo se odlikuje sposobnošću razmene elektrona i formiranja kovalentnih veza sa funkcionalnim grupama koje sadrže ne samo sumpor, već i kiseonik i azot, narušavajući biološku funkciju brojnih biomolekula [12,13].

Olovo ima sposobnost zamene dvovalentnih katjona, poput Ca, Mg, Fe, Zn i Se, narušavajući funkcionisanje fundamentalnih procesa u organizmu kao što su homeostaza kalcijuma, prelazak jona kroz ćelijske membrane, intra i interćelijska signalizacija, rast i diferencijacija, ekspresija gena, apoptoza [18]. Generisanje slobodnih radikala i nastanak oksidativnog stresa je jedan od mehanizama koji povezuje olovo sa inflamacijom, jednim od ključnih obeležja ekspozicije olovu. Naime, nastanak oksidativnog stresa aktivira proinflamatorne citokine (NF κ B) i AP-1 i povećava sintezu citokina, prostaglandina, tromboksana [75]. Vezivanjem za sulfhidrilne grupe i zamenom bioelemeata u aktivnim centrima brojnih enzima olovo ne narušava samo oksidativnu ravnotežu već generiše i nastanak lipidne peroksidacije, narušava funkciju proteina i dovode do strukturnih promena molekula DNK.

Genotoksičan potencijal olova u *in vitro* studijama na ćelijskim linijama sisara je slab i/ili je ograničen na visoke koncentracije. Olovo ne ispoljava mutageno dejstvo u studijama na prokariotima dok je porast broja DNK oštećenja pokazan u studijama na izolovanim DNK sistemima [44]. Takođe, u izvesnim humanim studijama pokazan je epigenetski potencijal olova izražen preko narušene metilacije DNK kao i promenama u mitogenezi. Tako su studije pokazale pozitivnu korelaciju između koncentracije Pb u krvi (>10 μ g/dL) sa mutacijom gena, oštećenjem i metilacijom DNK, skraćanjem telomera i aberacijom hromozoma [75]. Apoptoza je još jedan od poznatih mehanizama koji se nalaze u osnovi toksičnosti olova. Inicijalni događaj u apoptozi je interakcija i zamena jona kalcijuma u ćelijskoj membrani mitohondrija koja narušava potencijal ćelijske membrane mitohondrija [75].

1.2.4. Ciljni organi toksičnosti

Toksičan efekat olovo ostvaruje na krv i krvotvorne organe, jetru, bubrege, centralni i periferni nervni sistem, kardiovaskularni, endokrini, imuni i reproduktivni sistem. Toksičan efekat olova na hematopoezni sistem manifestuje se mikrocitnom hipohromnom anemijom nastalom kao posledica inhibicije sinteze hema (olovo je najpoznatiji inhibitor tri ključna enzima u sintezi hemoglobina) i narušene funkcije eritrocita usled smanjene aktivnosti pirimidin-5'- nukleotidaze i aktivnosti Ca²⁺/Mg²⁺-ATP-aze. Potom, smanjenom sintezom eritropoetina na nivou bubrega olovo dodatno doprinosi nastanku anemije. Hepatotoksičan efekat olova prepoznat je kod radnika profesionalno izloženih olovu, okarakterisan hepatomegalijom, povećanom aktivnošću jetrinih enzima (transaminaze) kao i narušenim metabolizmom holesterola sa povećanim vrednostima ukupnog holesterola u krvi. Enzimurija, gubitak proteina male molekulske mase, neselektivan gubitak proteina, narušen transport organskih anjona te smanjena brzina glomerularne filtracije, odlika su narušenog funkcionalnog integriteta bubrega nastao kao posledica proksimalne tubularne nefropatije, skleroze glomerula kao i intersticijalne fibroze usled nefrotoksičnog efekta olova. Upoređujući sa organskim sistemima na koje olovo deluje, nervni sistem je najosetljiviji ciljni organ toksičnog dejstva. Brojne epidemiološke studije potvrdile su negativan

uticaj Pb na kognitivne, neuromotorne i neurosenzitorne funkcije, odnosno neurobiheviorealan efekat Pb i ukazale su na izrazitu vulnerabilnost dece uzrasta do 5 godina, usled nerazvijene krvno-mozdane barijere. Dodatno, zabrinjavajuća činjenica je i da placenta ne zadržava olovo kao i da deca mogu biti izložena olovu i putem majčinog mleka. Epidemiološke studije ukazale su na pozitivnu korelaciju između koncentracije Pb u krvi i povećanog krvnog pritiska, ateroskleroze kao i drugih kardiovaskularnih bolesti [18,19,34,48,75,79,80].

Krajem XX veka olovo je prepoznato i kao endokrini ometač, odnosno metaloestrogen, a u *in vitro* studijama pokazan je izvestan afinitet Pb prema ER, sposobnost inhibiranja vezivanja estradiola za receptore i istiskivanja cinka iz cink domena ER. Potom, olovo može da poveća ekspresiju estrogen zavisnih gena i proliferaciju estrogen zavisnih ćelija do većeg nivoa od ekspresije koju reguliše sam estradiol [42]. Direktna inhibicija sekrecije humanih gonadotropina, smanjena ekspresija regulatornog proteina steroidogeneze, smanjeno oslobađanja hormona hipofize usled interferencije sa sistemom katjon zavisnih sekundarnih glasnika su dodatni potencijalni mehanizam kojim olovo može narušiti homeostazu hormona [75]. Izvesne studije ukazale su na povezanost visokih koncentracija Pb u krvi (>10 µg/dL) sa disbalansom hormona štitaste žlezde (TSH, T3 i T4), kortizola, vitamina D, hormona rasta, ali i polnih hormona muškaraca i žena. Međutim, dobijeni rezultati toksičnog efekta Pb na nivoe polnih hormona (FSH, LH, testosteron), kao i na reproduktivnu sposobnost muškaraca i žena, su još uvek nekonzistentni [75].

Prema podacima IARC, usled dovoljno dokaza na životinjama ali ograničeno na ljudima, olovo je svrstano u grupu 2A karcinogena (agens je verovatno karcinogen), a izloženost olovu se dovodi u vezu sa pojavom karcinoma želuca, pluća, gastrointestinalnog trakta, bubrega, pankreasa, bešike i prostate [44,48]. Iako je signifikantan citotoksičan potencijal Pb pokazan u *in vitro* studijama sa MCF-7 kulturom ćelija [81], kao i sposobnost aktivacije ER MCF-7 ćelija [82], dostupne studije još uvek decidno ne prepoznaju Pb kao značajnog agensa koji se dovodi u vezu sa karcinomom dojke, te se olovo ne nalazi na aktuelnoj IARC listi uzročnika karcinoma dojke [46]. U studijama sa ženama obolelim od karcinoma dojke pokazane su značajno više koncentracije Pb u tumorskim tkivima dojke [51,52] u odnosu na zdrava tkiva, međutim, kohortna studija [54] koja je objedinila istraživanje tri prospektivne studije nije pokazala pozitivnu korelaciju između koncentracije Pb u krvi i rizika od pojave karcinoma dojke.

Značajna uloga Pb u etiologiji karcinoma prostate pokazana je 2002. godine u studiji *Siddiqui* i sar. [83]. Naima, ova grupa autora je nakon evaluacije dobijenih rezultata za nivo Pb u krvi muškaraca sa dijagnozom benigne hiperplazije prostate i karcinomom prostate ukazala na značajno više koncentracije Pb kod ovih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu koju su činili zdravi muškarci. Takođe, pacijente su pratile niže koncentracije Zn i Cu, a značajna pozitivna korelacija pokazana je između nivoa Pb i malondialdehida, odnosno negativna između Pb i nivoa glutationa. Dobijeni rezultati ove grupe autora ukazali su na potencijalnu ulogu olova u nastanku benigne hiperplazije prostate kao i karcinoma prostate preko generacije slobodnih radikala kiseonika i smanjenog nivoa cinka [83]. Potom, rezultati kohortne studije u kojoj je učestvovalo 122 radnika fabrike baterija, ukazali su da pored povišenih nivoa Pb u krvi postoji i izmenjen profil polnih hormona [84]. Narušena reproduktivna sposobnost muškaraca nastala kao posledica profesionalne izloženosti Pb, kao i signifikantna korelacija između Pb u krvi sa smanjenom veličinom testisa, objašnjava se njegovim toksičnim dejstvom na nivo polnih hormona, na broj, pokretljivost i morfologiju spermatozoida kao i direktnim toksičnim dejstvom na seminiferozne tubule testisa [68,69,84–86].

1.2.5. Biološki monitoring

Koncentracije Pb u krvi, urinu, jetri, bubrezima, kostima, kosi kao i drugim tkivima mogu se koristiti kao biološki indikatori izloženosti. Za procenu stepena izloženosti opšte populacije i profesionalne izloženosti kao materijal izbora koriste se krv i urin. Dostupnost ova dva biološka materijala kao i tehnika obrade i analiziranja uzoraka ih nesumnjivo čine najviše korišćenim uzorcima za procenu nivoa olova u organizmu. Međutim, krv reprezentuje manje od 2% telesnog opterećenja olovom, odraz je skorašnje ekspozicije, u prethodnih nekoliko meseci, a Pb se i brzo distribuira putem krvi po organima. Takođe, koncentracija Pb u krvi može značajno da varira u zavisnosti od starosti kao i fiziološkog stanja organizma, poput graviditeta, laktacije, menoapuze. Prema podacima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (eng. *Center for Disease Control and Prevention*, CDC) prosečna koncentracija olova u krvi treba da bude <10 µg/dL za odrasle i <5 µg/dL za decu [75], međutim, prema novijem izveštaju, a na osnovu NHANES studije (2015-2016 i 2017-2018), CDC je dao preporuku na osnovu koje prosečna koncentracija Pb u krvi kod dece treba da bude manja od 3,5 µg/dL [87]. Prosečna koncentracija Pb u krvi odraslih stanovnika Srbije koji nisu profesionalno izloženi kreće se u intervalu 0,85-7,21 µg/dL za nepušače, odnosno 1,41-10,42 µg/dL za pušače [70]. Sa druge strane, Pb u urinu reflektuje telesno opterećenje kao i odgovor na aktuelnu ekspoziciju. Iako je tehnika skupljanja 24 h urina neinvazivna, koncentracija Pb u urinu je podložna varijacijama, kao i u krvi, a za interpretaciju rezultata neophodno je izračunavanje brzine glomerularne filtracije. Sa druge strane, urin je dobar biološki materijal za evaluaciju ekskretovanog olova nakon primene helatne terapije (mobilizacija olova), te za procenu telesnog opterećenja. Na osnovu nacionalnog izveštaja SAD iz 2015-2016. godine o izloženosti hemikalijama iz životne sredine (eng. *Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemical*) prosečne koncentracije Pb u urinu kretale su se u intervalu 0,233-0,288 µg/dL u populaciji žena, odnosno 0,285-0,343 µg/dL za muškarce [75].

Razvojem neinvazivne XRF tehnike za merenje koncentracije Pb u kostima postignuta je bolja procena telesnog opterećenja, uzevši u obzir podatak da su kosti glavno mesto deponovanja olova u organizmu sa udelom od preko 90%. Naime, koncentracija Pb u kostima predstavlja biomarker produžene izloženosti Pb, te za razliku od krvi i urina, ima širu primenu u epidemiološkim studijama u kojima je cilj procena hronične izloženosti olovu. Važno je istaći i činjenicu da raspodela Pb u kostima nije uniformna, odnosno, akumulacija Pb se dominantno dešava u regionima aktivne kalcifikacije u vremenu ekspozicije. Tako je kod dece najveća kalcifikacija prisutna u trabekularnim kostima, gde se mogu očekivati i najveće koncentracije Pb ukoliko je ekspozicija bila u periodu detinjstva. Pored ova tri biološka materijala, za procenu ekspozicije se mogu koristiti i druge telesne tečnosti (saliva, znoj, mleko, semena tečnost), uzorci mekih tkiva kao i nokti, kosa i zubi [75,79].

Sa druge strane, za procenu ekspozicije olovu mogu se koristiti biomarkeri efekta, odnosno merljive biohemijske ili fiziološke promene nastale kao posledica dejstva ispitivanog analita. U tu namenu, koriste se parametri narušene biosinteze hema s obzirom da olovo inhibira aktivnost dehidrataze delta-aminolevulinske kiseline koja katalizuje stvaranje porfobilinogena, ferohelataze koja ugrađuje gvožđe u hem i koproporfirinogen dekarboksilaze koja koproporfirinogen prevodi u protoporfirin IX. Posledično, u krvi i urinu se mogu detektovati veće aktivnosti δ-ALAD kao i veće koncentracije koproporfirina, dok se u eritrocitima akumuliraju protoporfirin IX i cink protoporfirin (ZPP). Takođe, usled inhibicije pirimidin-5'-nukleotidaze dolazi do nagomilavanja rRNK i karakterističnog izgleda eritrocita (bazofilno punktirani eritrociti). Koncentracije hemoglobina, eritropoetina i vitamina D u krvi, iako su biomarkeri efekta, nisu specifični samo za olovo [79,88]. Nakon multivarijantne logističke

regresije u jednoj od humanih studija, značajan prediktivan potencijal kao i pozitivna korelacija pokazana je između koncentracije olova u krvi i hematokritne vrednosti (za decu iznad 15 godina), te koncentracije olova u krvi i serumske koncentracije ukupnih IgA (za decu starosti od 6 meseci do 6 godina) [48].

Urin kao biološki materijal koristi se za kontrolu mobilizacije olova iz organizma. Terapija hroničnog trovanja olovom ima za cilj da smanji telesne rezerve olova kontrolisanom mobilizacijom iz kostiju. Nekoliko helatnih agenasa koristi se za ovu namenu poput $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$, penicilamin i DMSA, a tretman se sprovodi uz strogi nadzor lekara i toksikologa [88]. Helatni agensi heliraju Pb iz kostiju i mekih tkiva, brzo se izlučuju iz organizma putem urina, međutim neželjene efekte ispoljavaju usled neselektivnosti heliranja drugih dvovalentnih jona te se primena helatnih agenasa ne preporučuje kada je koncentracija Pb u krvi $< 25 \mu\text{g/dL}$ [48].

1.3. Karcinom dojke

Karcinom dojke je jedan od najčešćih tumora širom sveta i vodeći uzročnik smrti od karcinoma u populaciji žena. Iako se u poslednjih nekoliko godina u razvijenim zemljama registruje blagi pad mortaliteta od karcinoma dojke, ova bolest je i dalje vodeća među malignim bolestima kod žena. Prema podacima SZO i IARC karcinomi dojke se sa visokom incidencom od 24,5% nalaze na prvom mestu zastupljenost karcinoma kod osoba ženskog pola iza kojih slede kolorektalni karcinomi (9,4%) i karcinomi pluća (8,4%). Takođe, prema istim podacima, karcinomi dojke su sa izrazito visokom incidencom od čak 15,5% nalaze na prvom mestu letalnih ishoda među karcinomima kod osoba ženskog pola [89].

Prema podacima Instituta za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ iz 2015. godine (*Cancer incidence and mortality in Central Serbia, 2015*) kod osoba ženskog pola na prvom mestu po učestalosti nalaze se karcinomi dojke (24,1%). Prema istim podacima, zastupljenost karcinoma dojke kod osoba ženskog pola progresivno raste od uzrasta 20 godina sa pikom od 55 do 69 godina. U Srbiji, kao i u svetu, karcinomi dojke su vodeći uzročnik smrti obolelih žena sa dijagnozom karcinoma (18,9%) [90].

Karcinom dojke je multifaktorska bolest. Etiologija i patofiziologija maligne proliferacije tkiva dojke, iako je predmet brojnih istraživanja, još uvek je nedovoljno razjašnjena. Pokazano je da postoji više faktora koji su udruženi sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke, od kojih su neki nepromenljivi i na njih se ne može uticati, dok su drugi promenljivi i vezani su za stil života individue. Glavni faktori rizika koji se dovode u vezu sa pojavom karcinoma dojke su pol i godine starosti. Učestalost karcinoma dojke raste sa godinama i udvostručuje se na svakih deset godina do perioda menopauze [91]. Većina karcinoma dojke javlja se kod žena bez pozitivne porodične anamneze, dok se manji procenat (5-10%) od svih karcinoma dojke smatra hereditarnim. Najbliži srodnici nosioca mutacije imaju 50% šanse da budu nosioci iste mutacije, ali sami nosioci mutacije ne moraju razviti karcinom. Mutacije mnogih gena se dovode u vezu sa pojavom karcinoma dojke [92–94], međutim visokorizični i visokopenetrabilni BRCA1 i BRCA2 geni (eng. *breast cancer gene*) [93,95] su najznačajniji. Do današnjih dana otkriveno je oko 2000 mutacija u svakom od njih, pri čemu nemaju sve mutacije podjednaki doprinos u odnosu na rizik za nastanak karcinoma dojke. Tako je oko 65% naslednog karcinoma dojke kod žena povezano sa prisustvom mutacije u BRCA1/BRCA2 genima [92,94,95].

U ostale faktore koji se dovode u vezu sa povećanom incidencom pojave karcinoma dojke, a koji pripadaju grupi nepromenljivih činilaca, spadaju rasa (žene bele rase imaju nešto veći rizik od nastanka karcinoma dojke), gusto tkivo dojke (denzno) koje se odlikuje većim udelom žlezdanog i fibroznog tkiva a manjim procentom masnog tkiva, te benigne promene dojke. Potom, rana menarha (pre 12. godine), kasna menopauza (nakon navršene 55. godine), kasna prva trudnoća (nakon 30. godine), ili neradañanje povećavaju rizik od obolevanja. Naime, žene koje nisu rađale su u dvostruko većem riziku od osoba koje su rađale. Radijaciona terapija u toku nekog medicinskog tretmana, posebno u predelu grudnog koša i u periodu puberteta, nosi sa sobom povećan rizik od pojave ove vrste karcinoma [91,93,96–98].

Iako epidemiološke studije povezuju gojaznost sa pojavom karcinoma, molekularni mehanizmi koje se nalaze u osnovi karcinogeneze dojke su još uvek predmet intenzivnog istraživanja, upravo zbog kompleksnosti stanja kao što je gojaznost sa jedne strane, a sa druge, raznorodnosti onkogenih promena kod različitih tipova karcinoma. Gojaznost karakteriše metabolički aktivno, uvećano i reprogramirano

masno tkivo koje izaziva lokalnu inflamaciju i povećanu sintezu inflamatornih citokina [99] koji u saradnji sa sistemskim fiziološkim promenama doprinosi disbalansu hormona. Sa druge strane, hipertrofija i hiperplazija adipocita umanjuje njihovu vaskularizaciju, što vodi hipoksiji i promociji oksidativnog stresa, insulinskoj rezistenciji, ishemiji, te nekrozi uz oslobađanje proteina inflamacije i angiogenezi povećavajući rizik od nastanka karcinoma dojke ali i prostate [91,93,99–101].

Uloga polnih hormona u etiologiji karcinoma dojke prepoznata je pre gotovo tri veka kada je Bernadino Ramazzini, otac medicine rada, u svojoj knjizi *De morbis artificum diatriba (Diseases of workers)* povezo nuliparitet sa visokom učestalošću karcinoma dojke u populaciji monahinja. Iako autor nije decidno doveo u vezu nerađanje sa povećanom incidencijom karcinoma dojke, publikovano zapažanje je podiglo naučnu svest o povezanosti reprodukcije sa smanjenim rizikom od karcinoma dojke što je i potvrđeno početkom XX veka, Janet Lane-Claypon *case-control* studijom [96]. Dodatan značaj u karcinogenezi dojke estrogen je dobio i nakon uočenog smanjenog rizika obolevanja kod žena nakon bilateralne ooforektomije i nakon uklanjanja ovarijuma u ranoj životnoj dobi [98] te da je gotovo 75% karcinoma dojke estrogen receptor pozitivno i da reaguje na estrogene, a da je većina ER negativnih karcinoma rezistentna na endokrinu terapiju [98]. Sa tim u vezi, imunohistohemijska klasifikacija karcinoma dojke koja je zasnovana je na analizi ekspresije receptora za polne hormone, pored histološke klasifikacije [102], od posebne je važnosti ne samo pri odabiru odgovarajuće terapije već i pri određivanju biološkog potencijala karcinoma. *The Endogenous Hormones and Breast cancer Collaborative Group* [103] sumirala je rezultate sedam prospektivnih studija ističući pozitivnu korelaciju rizika od nastanka karcinoma dojke sa povećanim nivoima ukupnog estradiola, slobodnog estradiola, estrona, androstenodiona, dehidroepiandrosteron sulfata (DHEA-S), testosterona i slobodnog testosterona [103]. Takođe, postavljena je i hipoteza da se genetski polimorfizam enzima uključenih u metabolizmu estrogena kao i polimorfizam gena odgovornih za sintezu ER dovode u vezu sa rizikom od obolevanja [98].

Iako specifični mehanizmi koji su odgovorni za preusmeravanje metabolizma holesterola u fiziološkim uslovima ka metabolizmu u malignim ćelijama još uvek nisu rasvetljeni, klinička i eksperimentalna istraživanja ukazuju na „glad“ tumorskih ćelija za holesterolom [104,105]. Izmena lipidnog profila primećena je kod žena sa benignim i malignim promenama dojke, međutim, dostupne epidemiološke studije, zbog dobijenih divergentnih rezultata, još uvek decidno ne utvrđuju obrasce povezanosti [106]. Sa druge strane, izvesne studije ukazuju da kadmijum i olovo toksične efekte ostvaruju i na metabolizam lipida, pri čemu je pozitivna korelacija između dislipidemije i koncentracije Pb u krvi pokazana kod izloženih radnika [107], međutim, za niske koncentracije Cd i Pb u krvi korelacija je bila veoma ograničena [108].

Uzimajući u obzir metaloestrogeni potencijal Cd i Pb pokazan u *in vitro* studijama [50,82], estrogene potencijal pokazan u *in vivo* studijama na animalnim modelima kao i studijama kod ljudi [40,42], sve je više dokaza o povezanosti Cd i Pb sa nastankom/progresijom karcinoma dojke. Dok *Mohammadi* i sar. [51] ispitujući četiri regiona tkiva dojke dobijena nakon mastektomije pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke nisu našli značajnu razliku u koncentracijama Cd i Pb ovih regiona, kao ni *Gaudet* i sar. [109] nakon evaluacije tri prospektivne studije Cd i Pb nisu prepoznali kao značajne varijable udružene sa povećanim rizikom od nastanka karcinoma dojke, druge studije jesu. Tako su *Hilal* i sar. [52] kao i *Siddiqui* i sar. [110] jasno ukazali na značajno veću koncentraciju Cd i Pb u tumorskom tkivu u odnosu na okolno zdravo tkivo iste dojke.

1.4. Karcinom prostate

Sa incidencom obolevanja od 14,1% karcinomi prostate nalaze se među pet najučestalijih karcinoma kod osoba muškog pola u svetu, tačnije na drugom mestu, odmah iza karcinoma pluća, odnosno na petom mestu letalnih ishoda od karcinoma u populaciji muškaraca [89]. Prema podacima Instituta za zaštitu zdravlja Srbije "Dr Milan Jovanović Batut" iz 2015. godine (*Cancer incidence and mortality in Central Serbia*, 2015) kod osoba muškog pola karcinomi prostate nalaze se na trećem mestu po učestalosti obolevanja (10,2%) i smrtnosti (9,1%), iza karcinoma pluća (19,6%) i karcinoma debelog creva (13,4%) [90].

Poznati faktori rizika koje se dovode u vezu sa karcinomom prostate su pre svega godine starosti, etnička pripadnost i genetska predispozicija [101]. Iako je učestalost karcinoma prostate visoka, i da incidenca obolevanja drastično raste sa godinama starosti [100], činjenica je da veliki broj muškaraca ima latentni karcinom koji retko napreduje u invazivnu kliničku sliku [101]. Diskrepanca obolevanja kod različitih nacija pre svega se pripisuje razlikama u socijalno-ekonomskim, ekološkim i genetskim faktorima. Tako je veća incidenca obolevanja primećena kod Afro-Amerikanaca u odnosu na Amerikance bele rase [111], potom kod stanovnika severne i centralne Evrope u odnosu na južnu i istočnu Evropu [101]. Takođe, kao genetski heterogen karcinom ima izraženiju porodičnu predispoziciju u odnosu na karcinome dojke i debelog creva za koje je uloga genetskog faktora dobro poznata [111]. Geni čije se mutacije dovode u vezu su povećanim rizikom obolevanja su HOXB13 i BRCA2, ali i CHEK2, PALB2, NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrome 1*), MLH 1-2,6 i PMS2 [112,113]. Tako je u nekoliko studija pokazano da Afro-Amerikanci imaju često 8q24 varijantu hromozoma koja se dovodi u vezu sa većom incidencom obolevanja, kao i visoki stepen varijacije gena tumor supresora poput EphB2 kao i BCL2, regulatornog gena apoptoze [100].

Sa druge strane, podaci ukazuju da ishrana, konzumiranje alkohola, pušenje, fizička neaktivnost, izloženost UV zracima kao i profesionalna izloženost toksičnim supstancama imaju značajnu ulogu u nastanku karcinoma prostate. Takođe, hronična inflamacija, prostatitis, seksualno prenosive bolesti poput herpes simplex virusa, humanog papiloma virusa (eng. *human papilloma virus*, HPV) te različite bakterijske infekcije, se dovode u vezu sa povećanom incidencom obolevanja od karcinoma prostate [100,101].

Prostata je hormon zavistan organ koji za normalan strukturni i funkcionalni integritet zahteva hormon testosteron koji se sintetiše u *Leydig*-ovim ćelijama testisa dok manje količine nastaju na periferiji. Još davne 1941. godine naučnici su postavili tzv. androgenu hipotezu ukazujući na izvesnu ulogu polnih hormona u nastanku karcinoma prostate [17], koju su dodatno potvrdile mutacije gena za hidroksteroid 17- β dehidrogenazu, 5 α -reduktazu, CYP17, CYP3A4, CYP19A kao i gena odgovornih za ER, učesnika u metabolizmu androgena [100]. Tako su *in vitro* i *in vivo* modeli ukazali na značajnu ulogu estrogena u patogenezi karcinoma prostate, pri čemu estradiol povećava proliferaciju humanih ćelija karcinoma prostate (LNCaP ćelije) dok istovremena primena antiestrogena poništava ulogu estradiola ukazujući na mogući sinergizam estradiola i testosterona na tkivo prostate [114]. Sa druge strane, rezultati studija ukazuju da i oksidativan stres ima značajnu ulogu u etiologiji ove bolesti [111].

Uloga toksičnih metala kao faktor rizika u nastanku karcinoma prostate još uvek je predmet brojnih istraživačkih radova. Apoptoza ventralnog lobusa prostate primećena je kod *Wistar* pacova nakon akutne *s.c.* injekcije Cd (0,5, 10 i 20 μ mol/kg t.m.) koja je bila praćena povećanom ekspresijom tumor supresora (p53) i protoonkogena (*c-jun*) [33], dok je u eksperimentalnom modelu sa *Charles foster* pacovima akutna *i.p.* ekspozicija Cd (20 μ g/kg t.m.) dovela do značajnog uvećanja prostate nakon 10-

og dana tretmana, smanjene ekspresije enzima 5 α reduktaze, povećane ekspresije AR i ER- α , a smanjene ER- β [61]. Takođe, i nakon kastracije pacova primena Cd dovela je do uvećanja prostate čime je sposobnost vezivanja Cd za steroidne receptore, tzv. mimikrija, potvrđena u ovom eksperimentalnom modelu [61]. *Case-control* studija koja je obuhvatila oko 100 ispitanika sa dijagnozom karcinoma prostate ukazala je povećanu incidencu obolevanja osoba koje su bile profesionalne izložene azbestu, čeliku, niklu, kadmijumu i olovu (OR=2,13) [115]. Značajno više koncentracija Cd u krvi i tkivu prostate kod obolelih od karcinoma prostate, ukazujući na potencijalnu implikaciju Cd u karcinomu prostate, pokazana je u humanim studijama [58,116,117]. Međutim, meta analiza *Ju-Kun* i sar. [118] ukazala je na povezanost visoke izloženosti Cd i incidence obolevanja u populaciji koja je bila profesionalno izložena Cd, međutim u opštoj populaciji ona nije bila prepoznata.

Sa druge strane, olovo je prepoznato kao potencijalni faktor rizika u nastanku karcinoma prostate [119]. U eksperimentalnom modelu jednomesečna *i.p.* ekspozicija mužjaka pacova dozi od 0,05 mg Pb-acetata u blizini prostate rezultovala je značajnim smanjenjem zapremine prostate. Međutim, iako izloženost Pb nije rezultovala nastankom tumora, prisustvo skvamoznog epitela ukazalo je na progresivne prekancerogene izmene prostate [120]. Među prvim autorima *Siddiqui* i sar. [83] su pokazali značajno više koncentracije Pb u krvi ispitanika obolelih od karcinoma prostate u odnosu na kontrolnu grupu zdravih muškaraca, što je i potvrdila komparativna studija sa pacijentima obolelih od karcinoma prostate koja je sprovedena u Pakistanu [117]. Značajno više koncentracije Pb pokazane su i u tumorskom tkivu obolelih od karcinoma prostate u odnosu na kontrolno tkivo ispitanika sa dijagnozom benigne hiperplazije prostate [116].

1.5. Karcinom testisa

Karcinomi testisa ne nalaze se na listi deset najučestalijih karcinoma kod muškaraca, međutim, u starosnoj kategoriji od 20 do 24 godina nalaze se na prvom mestu sa visokom incidencom obolevanja od 14,6% [89]. Prosečna godina starosti dijagnostikovanja karcinoma testisa, prema podacima Američkog udruženja za karcinome testisa (eng. *Testicular cancer American cancer society*) [121] je 33. Prema dostupnim podacima Instituta za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ iz 2015. godine [90], sa incidencom od 1,6%, karcinomi testisa se ne svrstavaju među najučestalijim karcinomima u populaciji muškaraca na teritoriji Centralne Srbije. Karcinomi testisa većinom nastaju iz germinativnih ćelija (90-95%) i preko 70% pacijenata se dijagnostikuje u prvoj fazi bolesti [122].

Glavni faktori rizika koji se dovode u vezu sa nastankom i progresijom bolesti su genetika, hormonski status individue, izloženost određenim fizičkim, hemijskim i mikrobiološkim agensima [123]. Takođe, kriptorhizam, infekcija virusom humane imunodeficijencije (eng. *human immunodeficiency virus*, HIV), godine starosti, rasa, gojaznost te fizička trauma testisa su pridruženi faktori rizika koji se dovode u vezu sa nastankom karcinoma testisa [121]. Bez obzira na činjenicu da 90% osoba sa dijagnozom karcinoma testisa nema pozitivnu porodičnu anamnezu, verovatnoća obolevanja ukoliko je bolest prisutna kod najbližih srodnika (otac, brat) je 4 do 10 puta veća [123]. Geni odgovorni za regulaciju transkripcije ćelijskog razvoja (posnatalni razvoj testisa) GATA4 i GATA1, *germ-cell* geni odgovorni za specifikaciju određivanja pola (PRDM14 i DMRT1) kao i SALL4 geni odgovorni za održavanje pluripotentnosti embrionalnih matičnih ćelija, su prepoznati kao značajni geni čije mutacije se dovode u vezu sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma testisa [123].

Budući da je incidenca karcinoma testisa najveća kod mlađih muškaraca nesumnjivo je da polni hormoni imaju važnu ulogu u etiologiji bolesti s obzirom da nivo polnih hormona ima pik vrednosti upravo u periodu puberteta. Potom, endokrini ometači kroz procese inhibicije transporta holesterola u mitohondrije, ekspresije gena kao i aktivnosti enzima steroidogeneze, ključne faktore procesa steroidogeneze, su prepoznati značajnim faktorima koji doprinose bolesti [124]. Pokazano je da bisfenol A, dietilstilbestrol, ftalati kao i supstance sa estrogenom aktivnošću smanjuju ekspresiju steroidnih gena rezultujući nižom koncentracijom testosterona. Takođe, primećena je i povećana incidenca seminoma kod radnika u proizvodnji plastike koji su izloženi polivinil hloridu (PVC), kao i kod muških potomaka žena koje su bile izložene polihlorovanim bifenilima (PCBs) [124].

Uzevši u obzir podatak da Cd pripada negenotoksičnim karcinogenima, kao i da ispoljava efekte na tkivo testisa koji se ne dovode u direktnu vezu sa karcinogenezom, studije ukazuju da indirektnim putem Cd može doprineti nastanku karcinoma testisa [30]. Apoptoza spermioženog epitela testisa, ali ne *Sertoli* i *Leydig*-ovih ćelija *Wistar* pacova, dozno i vremenski zavisna, redukovana ekspresija p53 gena kao i povećana ekspresija MT-I gena, pokazane su u *in vivo* modelu [33] nakon akutne *s.c.* primene Cd (0,5, 10 i 20 $\mu\text{mol/kg}$ t.m.). Potom, u studiji sa mužjacima pacova nakon akutne *i.p.* ekspozicije Cd u dozi od 1,2 mg/kg t.m. zabeleženo je značajno oštećenje morfološke strukture testisa praćeno hipoplazijom ćelija, fibrozom, atrofijom, nekrozom i kalcifikacijom [125], dok je oralna izloženost pacova različitim dozama Cd (5, 50 i 100 ppm) u trajanju od 100 dana rezultovala značajno manjom masom epididimisa, testisa i prostate koji su bili udruženi sa manjim brojem spermatozoida kao i većim udelom abnormalnih formi spermatozoida [126]. Takođe, izloženost Cd dovodi se u vezu sa narušavanjem homeostaze polnih hormona, oštećenjem seminiferoznih tubula i *Leydig*-ovih ćelija, degeneracijom spermatogenog ciklusa te smanjenjem ukupnog broja spermatozoida i njihove pokretljivosti [127].

Iako se izloženost olovu ne dovodi u direktnu vezu sa nastankom/razvojem karcinoma testisa, odnosno IARC nije prepoznao olovo kao uzročnika karcinom testisa, izvesne eksperimentalne studije ukazuju na moguću indirektnu povezanost. Tako se izloženost olovu kod eksperimentalnih životinja dovodi u vezu sa apoptozom spermatogenih ćelija, narušavanjem homeostaze polnih hormona, smanjenim ukupnim brojem spermatozoida, njihove pokretljivosti i vijabilnosti kao i povećanim brojem abnormalnih formi spermatozoida [127]. Potom, u studiji sa zečevima nakon petodeljne oralne ekspozicije Pb-nitratu (od 0,1 do 200 mg Pb/L) koncentracije hormona LH i testosterona u krvi bile su značajno niže od kontrolne grupe dok je histopalotoška analiza testisa pokazala značajno oštećenje seminiferoznih tubula udruženo sa narušenom morfološkom strukturom testisa [128]. Slično, u eksperimentalnom modelu sa mužjacima pacova značajno manja zapremina testisa, ali i prostate, kao i niže koncentracije serumskih polnih hormona (FSH, LH, testosteron) ostvareni su nakon 14 dana oralne ekspozicije 8 mg Pb/kg t.m. [129]. Kod ljudi, izloženost olovu se dovodi u vezu sa povećanjem broja abnormalnih formi spermatozoida i smanjenjem germ populacije ćelija u testisima usled apoptoze [127]. U studiji sa radnicima izloženim Pb pokazana je narušena homeostaza polnih hormona [84] dok je u studiji u koju su bili uključeni muškarci lečeni na klinici od infertiliteta pokazana značajno viša koncentracija Cd i Pb u krvi kao i negativna korelacija između ova dva toksična metala sa brojem i pokretljivošću spermatozoida, odnosno pozitivna sa većim udelom abnormalnih formi spermatozoida [130]. Narušena reproduktivna sposobnost muškaraca koja je dovedena u vezu sa olovom pokazana je i u drugim studijama [68,69,85,131].

2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Mnogobrojna istraživanja nedvosmisleno potvrđuju da Cd i Pb mogu dovesti do oštećenja različitih organskih sistema i do nastanka karcinoma. Etiologija i patofiziologija malignih proliferacija dojke, prostate i testisa, iako su predmet brojnih istraživanja, još uvek su nedovoljno rasvetljene. Pored faktora rizika koji se dovode u vezu za nastankom ovih karcinoma (genetske predispozicije, godine starosti, ishrana, pušenje, hormonski status), može se pretpostaviti da i izloženost toksičnim metalima (Cd i Pb) u radnoj i životnoj sredini dodatno doprinosi pojavi i razvoju karcinoma. S tim u vezi, pri proceni toksičnih efekata Cd i Pb potrebno je razmotriti potencijalni uticaj istovremene izloženosti jer je realni scenario da je čovek izložen smeši toksičnih supstanci, a da toksični efekti smeše mogu biti kvalitativno i kvantitativno drugačiji u odnosu na efekte pojedinačnih supstanci.

Prethodna *in vitro* i *in vivo* istraživanja prepoznala su Cd i Pb kao značajne faktore koji se dovode u vezu sa malignom transformacijom ćelija dojke, prostate i testisa, međutim nema dovoljno podataka iz humanih studija za njihovu IARC klasifikaciju kao uzročnika ovih karcinoma. Literaturni podaci ukazuju da se toksični efekti Cd i Pb mogu delom objasniti istim mehanizmima toksičnosti, poput nastanka oksidativnog stresa kao i narušavanjem homeostaze bioelemenata. Krajem XX veka Cd i Pb su klasifikovani u kategoriju endokrinih ometača, zbog sposobnosti vezivanja za hormonske receptore i/ili ostvarivanje fiziološke funkcije hormona, te je njihova uloga u hormon zavisnim karcinomima dobila dodatno na značaju. Međutim, iako se oksidativni stres, narušena homeostaza bioelemenata i disbalans hormona dovode u vezu sa karcinomima, često se postavlja pitanje da li su oni uzročnici ili su nastali kao posledica bolesti, odnosno da li Cd i Pb svojim mehanizmima toksičnosti dovode do pojave/razvoja karcinoma. Stoga je cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio da se ispituju efekti istovremene izloženosti Cd i Pb i njihova potencijalna uloga u razvoju karcinoma izvođenjem eksperimenta na životinjama i *case control* studije kod ljudi obolelih od karcinoma.

Cilj prvog dela istraživanja ove doktorske disertacije bio je da se ispita distribucija toksičnih metala i efekti akutne oralne izloženosti Cd i Pb u *in vivo* modelu, te da se utvrde priroda i intenzitet efekata u uslovima istovremene izloženosti. U svrhu realizacije ovog cilja bilo je neophodno ispitati:

- koncentracije Cd i Pb u krvi i organima,
- koncentracije bioelemenata, parametre oksidativnog statusa, hematološke i biohemijske parametre,
- uticaj Cd i Pb na očuvanost strukture tkiva.

Drugi deo istraživanja obuhvatao je retrospektivnu *case control* studiju sa ciljem da se utvrdi potencijalna uloga Cd i Pb kod pacijenata sa karcinomom dojke, prostate i testisa. U svrhu realizacije ovog cilja bilo je neophodno ispitati:

- koncentracije Cd, Pb i bioelemenata Cu i Zn u krvi pacijenata i zdravih ispitanika,
- nivo parametara oksidativnog statusa i polnih hormona u krvi pacijenata i zdravih ispitanika,
- koncentracije Cd, Pb i bioelemenata Cu i Zn u tumorskim i okolnim zdravim tkivima pacijenata,
- korelacije između nivoa Cd i Pb u krvi i tkivima sa nivoima bioelemenata, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, lipidnim profilom i nivoima polnih hormona unutar ispitivanih grupa uzevši u obzir godine starosti i pušački status.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Animalna studija

3.1.1. Eksperimentalne životinje

Mušjaci *Wistar* pacova prosečne težine oko 250 g nabavljeni sa farme za uzgoj eksperimentalnih životinja Vojnomedicinske akademije, Beograd, korišćeni su u eksperimentalnom radu. Životinje su čuvane u plastičnim kavezima pod standardnim kontrolisanim uslovima: temperatura 25 ± 3 °C, relativna vlažnost vazduha od 35% do 60%, konstantan dan-noć ciklus (svetlost/mrak; 12h/12h). Za vreme eksperimentalnog perioda životinjama je bila dostupna hrana i voda *ad libitum*. Sve eksperimentalne procedure bile su odobrene od strane Ministarstava poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede - Uprava za Veterinu (Br: 323-07-11822/2018-05), a sa životinjama se postupalo u skladu sa Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

3.1.2. Eksperimentalni protokol

Nakon perioda prilagođavanja životinje su podeljene u pet grupa: kontrolna grupa i četiri eksperimentalne grupe (šest do osam pacova u grupi). Eksperimentalne grupe su akutno, jednokratno, tretirane oralno putem gastrične sonde vodenim rastvorima kadmijum-hlorida ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, čistoće 99,99%, *Merck, Darmstadt, Nemačka*) i olovo-acetata ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, čistoće 99,99%, *Centrohem, Stara Pazova, Srbija*) u zapremini od 1 mL/kg t.m.

- 1. grupa - kontrolna grupa eksperimentalnih životinja nije tretirana
- 2. grupa - Cd_{15} grupa primila je *per os* 15 mg Cd/kg t.m. u obliku vodenog rastvora CdCl_2
- 3. grupa - Cd_{30} grupa primila je *per os* 30 mg Cd/kg t.m. u obliku vodenog rastvora CdCl_2
- 4. grupa - Pb_{150} grupa primila je *per os* 150 mg Pb/kg t.m. u obliku vodenog rastvora $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
- 5. grupa - $\text{Cd}_{15} + \text{Pb}_{150}$ grupa primila je *per os* smešu sastavljenu od 15 mg Cd/kg t.m. i 150 mg Pb/kg t.m. u obliku vodenog rastvora CdCl_2 i $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

Doze toksičnih supstanci za Cd su izabrane u skladu sa najnižom dozom koja može da dovode do štetnih efekata (eng. *Lowest observed adverse effect levels*, LOAEL) po reproduktivne organe pacova nakon oralne ekspozicije (nekroza testisa, redukovana spermatogeneza) a koja iznosi 100 mg Cd/kg t.m., odnosno doze koje su 1/3 i 1/6 LOAEL doze [9].

Pri odabiru doze za Pb rukovodili smo se toksičnim efektom na reproduktivne organe eksperimentalnih životinja (redukcija broja spermatozoa, smanjena pokretljivost, narušena morfologija i povećan broj abnormalnih formi spermatozoida) koja je kod Pb potvrđena samo pri visokim dozama, dok za publikovane koncentracije Pb u krvi pacova u rasponu od 4,5 do 67 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ovi toksični efekti nisu dokumentovani [48]. Uzevši u obzir podatak da se apsorpcija Pb kod pacova kreće u intervalu od 2 do 42%, kao i podatke o volumenu distribucije, toksikokinetici i klirensu Pb iz krvi, nakon primene odabrane doze od 150 mg/kg t.m. možemo očekivati koncentracije Pb u krvi *Wistar* pacova u intervalu

prethodno navedene doze bez štetnog efekta po reproduktivne organe (eng. *No observed adverse effect levels*, NOAEL).

Primena smeše Cd i Pb imala je za cilj da ispita toksičan efekat na reproduktivne organe s obzirom da su obe primenjene doze odabrane u rangu njihovih NOALE doza, odnosno da se utvrdi da li će tretman smeše dovesti do efekta koji će po prirodi i intenzitetu biti različiti od efekata izloženosti pojedinačnim supstancama.

Životinje su žrtvovane 24 časa nakon tretmana uz upotrebu anestetika (ketamin). Uzorci krvi sakupljeni su kardijačnom punkcijom kroz dijafragmu i krv je podeljena u tri epruvete. Upotreba antikoagulansa (heparin) u jednoj od epruveta sprečila je koagulaciju krvi i ovaj uzorak služio je za određivanje osnovnih hematoloških parametara. Kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom analizirana je u toku 4 h od žrtvovanja eksperimentalnih životinja nakon čega su ovi uzorci krvi propisno odloženi na -20 °C i služili su za određivanje koncentracije toksičnih metala i bioeleminata. Druga epruveta sadržala je takođe antikoagulans heparin i služila je za dobijanje plazme. Treća epruveta, koja je bila bez antikoagulansa, ostavljena je da slobodno koaguliše na sobnoj temperaturi. Nakon postupka centrifugiranja (15 minuta, 3000 obrtaja/min.) dobijeni uzorci plazme i seruma alikvotirani su u propisno obeležene ependorf epruvete. Uzorci plazme i seruma do daljeg postupka rada čuvani su na -80 °C. U uzorcima plazme i seruma analizirani su parametri oksidativnog statusa, biohemijski parametri i hormoni. Organi eksperimentalnih životinja (jetra, bubrezi, prostata, testisi, slezina) su nakon žrtvovanja izmereni i podeljeni na tri dela. Jedan deo odmah je zamrznut u tečnom azotu i do daljeg postupka rada čuvan je na -80 °C. U ovim uzorcima analizirani su parametri oksidativnog statusa. U drugom delu, koji je propisno čuvan na -20 °C, nakon postupka vlažne mineralizacije određivani su nivoi toksičnih metala i bioeleminata. Treći deo služio je za histopatološku analizu te su ovi uzorci čuvani u formalinu.

3.2. Humana studija

3.2.1. Populacija žena

Istraživanje je obuhvatilo 55 pacijentkinja sa karcinomom dojke (*Neoplasma malignum mammae*), lečenih na Klinici za onkologiju Kliničko-bolničkog centra Bežanijska kosa. Kontrolna grupa je bila sastavljena od 41 ispitanice koje su imale benigne promene dojke (*Neoplasma benignum mammae*, *Dysplasio mammae benigna*, *Fibroadenosis mammae*, *Fibrosclerosis mammae*, *Ecstasis ductus mammae*) lečenih na istoj klinici. Sve učesnice istraživanja su imale prebivalište na teritoriji Republike Srbije i nisu bile profesionalno izložene toksičnim metalima. Ispitanice su bile odabrane u periodu od januara 2019. godine do oktobra 2019. godine, nakon dobrovoljnog pristanka i isključivanja pacijentkinja sa ograničavajućim faktorima za potrebe studije (godine starosti ispod 18, prisustvo druge vrste karcinoma, primena hemioterapije, upotreba hormonske terapije kao i lečenje od steriliteta). Sve učesnice istraživanja su detaljno upoznate sa ciljevima studije i nakon dobrovoljnog pristanka, uključene su u studiju.

3.2.2. Populacija muškaraca

U studiji je učestvovao 41 pacijent sa karcinomom prostate (*Neoplasma malignum prostatae*). Ispitanici su lečeni na klinici za Urologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od januara 2018. godine do juna 2020. godine.

Studija je obuhvatila i 52 pacijenta sa karcinomom testisa (*Neoplasma malignum testis*). Ispitanici su lečeni na klinici za Urologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od januara 2018. godine do juna 2020. godine.

Svi pacijenti su imali prebivalište na teritoriji Republike Srbije (Centralna Srbija) i nisu bili profesionalno izloženi toksičnim metalima. Pacijenti su bili odabrani nakon dobrovoljnog pristanka i isključivanja pacijenata sa ograničavajućim faktorima za potrebe studije (godine starosti ispod 18, prisustvo druge vrste karcinoma, primena hemioterapije, upotreba hormonske terapije kao i lečenje od steriliteta). Svi pacijenti su detaljno upoznati sa ciljevima studije i nakon dobrovoljnog pristanka, uključeni su u studiju.

Kontrolnu grupu za muškarce je reprezentovao 61 zdrav ispitanik Kosovsko-mitrovačkog okruga koji je rutinske kontrolne preglede obavljao u Kliničko bolničkom centru Kosovska Mitrovica. Ova grupa ispitanika nije imala klinički evidentna oboljenja. Ispitanici su detaljno upoznati sa ciljevima studije i nakon dobrovoljnog pristanka i dobijene pisane saglasnosti, uključeni su u istraživanje. Kontrolnoj grupi muškaraca uzorkovana je samo venska krv.

3.2.3. Eksperimentalni protokol

Ovo istraživanje je planirano i sprovedeno prema etičkim principima u skladu sa Helsinškom Deklaracijom, a na osnovu odobrenja Naučnog i Etičkog odbora Kliničko-bolničkog centra „Bežanijska kosa“ (broj dozvole 9740/3), Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije (broj dozvole 526/9)

kao i od strane Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (broj dozvole 288/2).

Svi učesnici istraživanja su, nakon detaljnog informisanja o studiji i dobijene saglasnosti, anketirani u cilju prikupljanja osnovnih demografskih i antropometrijskih podataka, koji su uključivali telesnu visinu, telesnu masu te status menopauze za ispitanice ženskog pola. Indeks telesne mase je izračunat prema obrascu: $ITM = \text{telesna masa (kg)} / \text{kvadrat telesne visine (m}^2\text{)}$. Preporuka SZO i Nacionalnog Instituta zdravlja (*National Institutes of Health*, NIH) je da se procena stepena uhranjenosti izračunava primenom indeksa telesne mase (ITM). Pothranjenost se definiše vrednostima $ITM < 18,5 \text{ kg/m}^2$, a normalna uhranjenost vrednostima $ITM 18,5\text{-}24,9 \text{ kg/m}^2$. Prekomerna uhranjenost se definiše ukoliko je vrednost $ITM 25,0\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$, dok je gojaznost definisana po stadijumima: stadijum I se karakteriše vrednostima $ITM 30,0\text{-}34,9 \text{ kg/m}^2$, stadijum II vrednostima $ITM 35,0\text{-}39,9 \text{ kg/m}^2$ i stadijum III vrednostima $ITM \geq 40 \text{ kg/m}^2$. Prikupljene su i druge značajne informacije o prethodnim bolestima, porodičnoj anamnezi i životnim navikama, kao što su podaci o načinu ishrane, pušački status, konzumiranje alkohola, podaci o pridruženoj terapiji. Na osnovu statusa pušenja ispitanici su podeljeni u dve grupe, na pušače i nepušače.

Uzorci venske krvi svih ispitanika dobijeni su venepunkcijom prednje kubitalne vene nakon perioda noćnog gladovanja (za ispitanike sa klinika neposredno pre hirurške intervencije). Krv je podeljena u dve epruveta. Određivanje kompletne krvne slike sa leukocitarnom formulom izvršeno je u uzorku krvi koja je sadržala EDTA antikoagulans nakon čega su ovi uzorci propisno odloženi na -20°C i služili su za određivanje koncentracije toksičnih metala i bioelemenata. Za dobijanje seruma korišćene su epruvete bez aktivatora koagulacije. Nakon slobodne koagulacije krvi, serumu su izdvojeni centrifugiranjem (15 minuta, 3000 obrtaja/min.), alikvotirani i čuvani na temperaturi od -80°C do izvođenja analiza. U uzorcima seruma analizirani su parametri oksidativnog statusa, biohemijski parametri i hormoni.

U toku hirurške intervencije pacijentima je uzorkovano tumorsko tkivo. Dodatno, kod pacijentkinja sa karcinomom dojke, kao i kod pacijenata sa karcinomom testisa, u toku hirurške intervencije uzorkovano je i okolno zdravo tkivo koje nije bilo zahvaćeno tumorom, iz regiona koji su bili najmanje 5 cm udaljeni od tumorskog tkiva i koji makroskopski nisu imali izmenjenu strukturu. Stoga, kod pacijenata sa karcinomom prostate uzorci okolnog zdravog tkiva nisu mogli biti uzorkovani. Svi uzorci tkiva su patohistološki obrađeni i klasifikovani od strane histopatologa kao maligni/benigni, odnosno zdravi. Uzorci tkiva su pravilno obeleženi i čuvani na -20°C do postupka rada sa njima koji je podrazumevao odgovarajuću pripremu, a potom analizu toksičnih metala i bioelemenata.

3.3. Određivanje hematoloških parametara

Hematološki parametri određivani su u uzorcima pune krvi uz dodatak odgovarajućeg antikoagulansa. Ukupan broj leukocita (WBC) sa diferencijalnom formulom, ukupan broj eritrocita (RBC), koncentracija hemoglobina (HGB), hematokritna vrednost (HCT), srednja vrednost volumena eritrocita (MCV), srednja vrednost sadržaja hemoglobina u eritrocitu (MCH), srednja vrednost koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC) i ukupan broj trombocita (PLT) određivani su na CELL-DYN Ruby analyzer (*Abott, Abott Park, IL, SAD*), Beckman coulter DxH 500 (*Beckman Coulter, Brea, CA, SAD*) i Sysmex XN-1000TM (*Sysmex, Lincolnshire, IL 60069, SAD*) automatskim analizatorima. *Multi-angle* polarizovana *scatter* separacija, *dual-angle* optička analiza, impedanca i fluorecentna

protočna citometrija sa hidrodinamičkim fokusom su metodologije koje se nalaze u osnovi rada ovih hematoloških analizatora.

3.4. Određivanje biohemijskih parametara u serumu

U uzorcima seruma određivani su sledeći parametri: glukoza, ukupan holesterol (HOL), trigliceridi (TG), HDL holesterol (HDL), LDL holesterol (LDL), urea (BUN), kreatinin (CRE), mokraćna kiselina (UA), ukupni proteini (TP), albumin (ALB), direktni bilirubin (DB), ukupni bilirubin (TB), aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (ALP), amilaza (AMY), laktat dehidrogenaza (LDH), gvožđe (Fe), kalcijum (Ca), fosfor (P), magnezijum (Mg), hloridi (Cl) i C-reaktivni protein (CRP). Za analiziranje ovih parametara korišćeni su komercijalni reagensi na platformi automatskog analizatora *Beckman Coulter AU 480* (*Beckman Coulter, Brea, CA, SAD*). Za kalibraciju metoda korišćeni su komercijalni kalibratori sledivi do NIST (*National Institute of Standards and Technology*) standardnog referentnog materijala i *Beckman Coulter Master* kalibratora.

3.5. Određivanje hormona u serumu

In vitro metodologije hemiluminiscentnog imunoeseja (CLIA) i elektrohemiluminiscentnog imunoeseja (ECLIA) na platformama imunochemijskih analizatora (*DiaSorin Liason, DiaSorin Inc, SAD* i *Cobas e411, Roche Ltd., Švajcarska*) sa komercijalnim reagensima korišćene su za analiziranje polnih hormona u serumu. Derivat izoluminola sa BSA (bisfenol A), specifična monoklonska antitela vezana za magnetne partikule, odnosno streptavidin-obložene mikropartikule sa specifičnim monoklonskim antitetelom uperena protiv određenog analita su osnovne komponente hemiluminiscentnih reagenasa koji su se koristili u postupku analiziranja hormona.

3.5.1. Određivanje folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH)

Određivanje folikulostimulirajućeg i luteinizirajućeg hormona je zasnovano na principu sendvič hemiluminiscencije. Specifična mišja monoklonska antitela su obložena na magnetnim partikulama (čvrsta faza) dok je drugo monoklonsko antitelo vezano za derivat izoluminola (konjugat izoluminol-antitelo). Za vreme faze inkubacije FSH/LH prisutan u ispitivanom uzorku se vezuje za čvrstu fazu monoklonskog antitela, a naknadno dodat konjugat-antitelo reaguje sa FSH/LH koji je već vezan za čvrstu fazu. Nakon faze inkubacije nevezani analit se uklanja ispiranjem, dodaje se starter reagens koji pokreće hemiluminiscentnu reakciju. Fotomultiplikator prevodi svetlosni signal konjugata izoluminol-antitelo u relativne svetlosne jedinice (eng. *relative light units*, RLU) koje reprezentuju koncentraciju FSH/LH u ispitivanom uzorku.

Koncentracija FSH se izražava u mIU/mL. Metoda je kalibrisana standardnim referentnim materijalom NIBSC 94/632. Preciznost određivanja (ponovljivost i reproduktivnost) izražena preko koeficijenta varijacije se kreće u rasponu od 3,0-3,8% za *intra-assay* i 3,2-4,5% za *inter-assay*. Analitička

senzitivnost iznosi 0,25 mIU/mL, funkcionalna senzitivnost 0,75 mIU/mL. Metoda ima linearnost određivanja do 400 mIU/mL.

Koncentracija LH se izražava u IU/L. Metoda je kalibrisana WHO 2nd standardnim referentnim materijalom 80/552. Preciznost određivanja (ponovljivost i reproduktivnost) izražena preko koeficijenta varijacije se kreće u rasponu od 1,5-4,3% za *intra-assay* i 2,2-6,0 % za *inter-assay*. Analitička senzitivnost iznosi 0,2 IU/L a funkcionalna senzitivnost 0,4 IU/L. Metoda ima linearnost određivanja do 250 IU/L.

3.5.2. Određivanje estradiola

Određivanje estradiola je direktan kompetitivan hemiluminiscentni imunoesej (CLIA). Magnetne partikule (čvrsta faza) su obložena specifičnim magarećim anti ovčijim monoklonskim antitelima dok je drugo ovčije monoklonsko anti-estradiol antitelo konjugovano za derivat izoluminola (konjugat izoluminol-antitelo). Za vreme faze inkubacije estradiol disocira od svog vezujućeg proteina i vezuje estradiol iz uzorka. U drugoj fazi se dodaje obeležen estradiol koji se takmiči za vezujuća mesta antitela. Nakon inkubacije, nevezani analit se uklanja ispiranjem, dodaje se starter reagens koji pokreće hemiluminiscentnu reakciju. Fotomultiplikator prevodi svetlosni signal konjugata izoluminol-antitelo u RLU koje su inverzno proporcionalne koncentraciji estradiola u ispitivanom uzorku. Koncentracija estradiola izražava se u pg/mL (1 pg/mL = 3,67 pmol/L). Metoda je kalibrisana standardnim referentnim materijalom NIBSC 94/632. Limit detekcije iznosi 16,2 pg/mL. Preciznost određivanja (ponovljivost i reproduktivnost) izražena preko koeficijenta varijacije se kreće u rasponu od 2,1-3,9% za *intra-assay* i 4,2-10,7% za *inter-assay*. Metoda ima linearnost određivanja do 1000 pg/mL.

3.5.3. Određivanja testosterona

Određivanje testosterona je direktan kompetitivan hemiluminiscentni imunoesej (CLIA). Magnetne partikule (čvrsta faza) su obložena specifičnim mišjim monoklonskim antitelima dok je interni testosteron konjugovan za derivat izoluminola (konjugat izoluminol-testosteron). Za vreme faze inkubacije testosteron disocira od svog vezujućeg proteina i takmiči se sa obeleženim testosteronom za vezujuća mesta antitela. Nakon inkubacije, nevezani analit se uklanja ispiranjem, dodaje se starter reagens koji pokreće hemiluminiscentnu reakciju. Fotomultiplikator prevodi svetlosni signal konjugata u RLU koje su inverzno proporcionalne koncentraciji testosterona u ispitivanom uzorku. Koncentracija testosterona izražava se u ng/mL (1 ng/mL = 3,47 nmol/L). Metoda je kalibrisana standardnim referentnim materijalom NIBSC 94/632. Limit detekcije iznosi 0,098 ng/mL, limit kvantifikacije 0,16 ng/mL. Preciznost određivanja (ponovljivost i reproduktivnost) izražena preko koeficijenta varijacije se kreće u rasponu od 2,8-7,3% za *intra-assay* i 7,1-14,0% za *inter-assay*. Metoda ima linearnost određivanja do 15 ng/mL.

Izmerena koncentracija estradiola/testosterona je matematičkom kalkulacijom služila za izračunavanje dva indeksa: FEI index (*free estradiol index*) i FTI (*free testosterone index*).

$$\text{FEI (\%)} = (\text{Estradiol} / \text{SHBG}) * 100$$

$$\text{FTI (\%)} = (\text{Testosteron} / \text{SHBG}) * 100$$

3.5.4. Određivanja seks hormon vezujućeg globulina (SHBG)

Princip određivanja SHBG je sendvič imunoesej sa dve vrste monoklonskih antitela. U prvom stupnju reakcije ispitivani uzorak se razblažuje (1:10) sa specifičnim diluentom. Uzorak se inkubira sa paramagnetnim partikulama obložene mišjim monoklonskim antitelima koje prepoznaju SHBG u fosfatnom puferu. Nakon inkubacije, nevezani analit se uklanja ispiranjem. U drugom stupnju dodaje se konjugat (mišja monoklonska antitela uperena protiv SHBG konjugovana sa derivatom izoluminolom) koji prepoznaje SHBG. Nakon inkubacije, nevezani analit se uklanja ispiranjem, dodaje se starter reagens koji pokreće hemiluminiscentnu reakciju. Fotomultiplikator prevodi svetlosni signal konjugata u RLU koje su direktno proporcionalne koncentraciji SHBG u ispitivanom uzorku. Koncentracija SHBG izražava se u nmol/L. Metoda je kalibrisana WHO standardnim referentnim materijalom NIBSC 08/266. Limit detekcije iznosi 0,20 nmol/L, limit kvantifikacije 0,80 nmol/L. Preciznost određivanja (ponovljivost i reproduktivnost) izražena preko koeficijenta varijacije se kreće u rasponu od 1,4-3,4% za *intra-assay* i 5,3-7,3% za *inter-assay*. Metoda ima linearnost određivanja do 200 nmol/L.

3.6. Određivanje koncentracije toksičnih metala i bioelemenata

3.6.1. Reagensi i standardi

Osnovni standardni rastvori Cd i Pb za atomsku apsorpcionu spektrofotometriju (1002 ± 2 mg/L CdNO₃ u HNO₃ i 998 ± 2 mg/L PbNO₃ u HNO₃ Merck, KGaA, Darmstadt, Nemačka), standardni rastvori bioelemenata (1001 ± 5 µg/mL Cu i 1001 ± 5 µg/mL Zn, Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD), nitratna kiselina (65% HNO₃ p.a. Merck, KGaA, Darmstadt, Nemačka) i vodonik peroksid (30% H₂O₂ p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, SAD), su nabavljeni iz komercijalnih izvora. Validacija tačnosti rada aparata izvršena je upotrebom sertifikovanih referentnih materijala (SRM) krvi (*SeronormTM Trace Elements Whole Blood, Sero AS, Billingstad, Norveška*) i jetre (*1577c Bovine Liver, National Institute of Standards and Technology NIST, USA*). U toku eksperimentalnog rada korišćen je matriks modifikator 0,5% NH₄H₂PO₄ (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, SAD*), 10% Triton[®] X-100 (*Supelco, Bellefonte, USA*) kao i dejonizovana voda visokog stepena čistoće.

3.6.2. Priprema uzoraka

Priprema uzoraka krvi i tkiva za merenje nivoa toksičnih metala i bioelemenata vršena je na sledeći način: 1 mL krvi, odnosno oko 0,5 g ispitivanog tkiva odmereno je u teflonske kivete a potom su dodavana oksidaciona sredstva za digestiju, 7 mL koncentrovane HNO₃ i 1 mL koncentrovanog H₂O₂. Nakon 30 minutne slobodne digestije, teflonske kivete su zatvorene i sproveden je postupak vlažne mineralizacije u mikrotalasnoj pećnici (*Milestone START D, SK-10T, Milestone Srl, Sorisole, Italija*). Postupak mineralizacije realizovan je u tri koraka: zagrevanje u trajanju od 15 minuta (snaga 1000 W, temperatura 180 °C), digestija u trajanju od 15 minuta (snaga 1000 W, temperatura 180 °C) i postupak hlađenja koji je po potrebi trajao od 15 do 30 minuta kako bi temperatura unutar kiveta bila 70 °C. Takođe, kompletan postupak mineralizacije sproveden je i sa SRM kao i sa slepim probama. Nakon postupka mineralizacije, uzorci su kvantitativno preneti u normalne sudove od 10 mL za humane uzorke, odnosno 25 mL za animalne. Kako bi se kontaminacija (tzv. *cary over*) smanjila na minimum,

između svake serije razaranja vršeno je pranje kiveta po uputstvima koja su data od strane proizvođača i proveravan je test apsorpcije mikrotalasa.

3.6.3. Određivanje koncentracije Cd i Pb

U pripremljenim uzorcima na prethodno opisan način primenom elektrotermalne atomske apsorpcione spektrofotometrije sa grafitnom kivetom (eng. *electrothermal atomic absorption spectrophotometry*, ETAAS) određivane su koncentracije Cd i Pb (AAS GTA 120 graphite tube atomizer, 200 series AA, Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD). Osnovne analitičke karakteristike ETAAS pri određivanju toksičnih metala prikazane su u Tabeli 1.

Tabela 1. Osnovne analitičke karakteristike ETAAS za određivanje Cd i Pb

	Cd	Pb
Jačina struje lampe	4 mA	5 mA
Talasna dužina (nm)	228,8	283,3
Širina razreza (nm)	0.5	0.5
Kiveta	Grafit	Grafit
Korekcija pozadine	Da	Da
Matriks modifikator	10% Triton X i 0,5% NH ₄ H ₂ PO ₄	10% Triton X i 0,5% NH ₄ H ₂ PO ₄
Temperatura atomizacije	1800 °C	2100 °C
Noseći gas	Argon	Argon

3.6.4. Određivanje koncentracije bioelemenata

U prethodno pripremljenim uzorcima tehnikom plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije (eng. *flame atomic absorption spectrophotometry*, FAAS) određivane su koncentracije Cu i Zn (AAS GTA, 200 series AA, Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD).

Koncentracije korišćenih standardnih rastvora, izmerenih apsorbanaci kao i regresione jednačine kalibracionih krivih koje su korišćene pri analiziranju toksičnih metala i bioelemenata prikazane su u Tabeli 2.

Tabela 2. Koncentracije standardnih rastvora, vrednosti apsorbanaci i regresione jednačine prilikom analiziranja Cd, Pb, Cu i Zn tehnikom ETAAS i FAAS

	Cd (228,8 nm)		Pb (283,3 nm)		Cu (324,8 nm)		Zn (213,9 nm)	
	µg/L	A	µg/L	A	mg/L	A	mg/L	A
Cal zero	0	0,0449	0	0,0051	0	0,0002	0	0,0006
Standard 1	0,300	0,0785	3	0,0356	0,1000	0,0076	0,1000	0,0263
Standard 2	0,600	0,1333	6	0,0716	0,5000	0,0371	0,5000	0,1361
Standard 3	0,900	0,1855	12	0,1484	10,000	0,0752	10,000	0,2658
Standard 4	1,500	0,2876	18	0,2160	50,000	0,3576	50,000	0,8679
Standard 5	3,000	0,5320	30	0,3578	100,00	0,6756	/	/
LOD	0,005		0,050		0,10		0,20	
LOQ	0,018		0,165		0,33		0,62	
	Y= 6,053x-0,223 R ² =0,999		Y= 84,34x+0,231 R ² =0,999		Y= 162,1x-2,03 R ² =0,998		Y= 59,99x-3,43 R ² =0,977	

3.7. Određivanje parametara oksidativnog statusa

Parametri oksidativnog statusa određivani su u uzorcima plazme, seruma i u homogenatima tkiva eksperimentalnih životinja. Za ispitivanje parametra oksidativnog statusa u homogenatima tkiva, ispitivani organi su nakon odmrzavanja izmereni a potom homogenizovani na ledu (*T10 basic ULTRA-TURRAX*, IKA, Germany) u 0,1 M fosfatnom puferu pH=7,4 u odnosu 1:9 [132].

Inicijalni prvi deo homogenata (tzv. *crude* homogenat) korišćen je za analiziranje malondialdehida i proteina dok je preostala količina homogenata centrifugirana (*Eppendorf centrifuge 5415 R*, Nemačka) u dva koraka: 10 minuta (800 rcf, *relative centrifugal force*), a nakon odvajanja supernatanta, još 20 minuta (9500 rcf). Dobijen postmitohondrijalni supernatant (PMS) je korišćen za analiziranje sledećih parametra: totalni antioksidativni status (TAS), totalni oksidativni status (TOS), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), određivanje sadržaja ukupnih sulfhidrilnih grupa (SHG), superoksid dizmutaza (SOD, određivanje paraoksonazne aktivnosti (POazne), prooksidativno-antioksidativni balans (PAB), superoksidni anjon (O_2^-), ishemijom modifikovan albumin (IMA). Za analiziranje ovih parametara korišćeni su biohemijski automatski analizator ILAB 300 Plus (*Instrumentation Laboratory, Lexington, Massachusetts*), ELISA čitač (*Microplate reader, LKB Instrument 5060-006, Viena, Austia*) i UV-VIS spektrofotometar (*Cary 60 UV-VIS spectrophotometer, Agilent Technologies, USA*) prema procedurama dobre laboratorijske prakse i u skladu sa protokolom laboratorije. Za analize su korišćene hemikalije i reagensi *Sigma-Aldrich, St.Louis, MA, SAD*, *Merck Darmstandt, Nemačka*, *Acros Organics, SAD*, *Acros Organics, Geel, Belgija*, *Sigma Aldrich Chemie, Steniheim, Nemačka* i *Centrohem Stara Pazova, Srbija*.

3.7.1. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)

Koncentracija MDA se određuje kao tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance (TBARS) spektrofotometrijskim testom koji se zasniva na apsorpcionom maksimumu kompleksa malondialdehida i ostalih TBARS sa tiobarbiturnom kiselinom na 535 nm [133]. Koncentracija malondialdehida je analizirana u uzorcima plazme i u homogenatima tkiva eksperimentalnih životinja.

3.7.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Nivoi ukupnih proteina u uzorcima homogenata tkiva i plazme određeni su *Biuret* i *Bradford* metodama [17,134,135].

Biuret metod: proteini iz uzorka reaguju sa bakar (II) jonom u alkalnoj sredini gradeći obojen kompleks. Intenzitet nastale boje direktno je proporcionalna koncentraciji prisutnih proteina. Za tu namenu upotrebljen je komercijalni reagens (*BioSystems S.A., Španija*) koji sadrži 6 mmol/L bakar (II)-acetata, 12 mmol/L kalijum-jodida, 1,15 mmol/L natrijum-hidroksida i odgovarajući deterdžent.

Bradford metod: *Coomassie Brilliant Blue G-250* visokim intenzitetom vezuje proteine iz uzorka. Vezivanjem boje za proteine pomera se maksimum apsorbanse sa 465 na 595 nm. Porast apsorbanse na 595 nm je direktno proporcionalan koncentraciji proteina u ispitivanom uzorku. Metoda je veoma

reproduktivna i relativno brza jer se vezivanje boje dešava u roku od dva minuta nakon dodatka reagensa. Boja je stabilna 60 minuta. Kao standard korišćen je goveđi albumin.

3.7.3. Određivanje totalnog antioksidativnog statusa (TAS)

Princip metode je sledeći: bezbojan redukovani oblik ABTS se oksidiše do tamno zelene boje ABTS⁺ uz pomoć vodonik peroksida u kiselom medijumu (acetatni pufer 30 mM, pH=3,6). U rastvoru acetatnog pufera koncentrovani oblik ABTS⁺ molekula ostaju duže vremena stabilan. Antioksidansi prisutni u uzorku ubrzavaju obezbojavanja ABTS katjona proporcionalno njihovoj koncentraciji i antioksidativnom kapacitetu. Step en obezbojavanja je obrnuto proporcionalan totalnom antioksidativnom statusu uzorka. Promena boje se registruje promenom apsorbance na 660 nm. Metoda je kalibrisana prema Troloxu (analog hidrosolubilnom obliku vitamina E). Rezultat se izražava kao ekvivalent μmol Troloxa po litru (μmol Trolox equivaleent/L) [136].

3.7.4. Određivanje totalnog oksidativnog statusa (TOS)

Princip metode je sledeći: oksidansi prisutni u uzorku oksidišu gvožđe II jon iz *o*-dianizidina do gvožđa III jona koji reaguje sa ksilenol oranžom gradeći obojen kompleks ružičaste boje u kiseloj sredini. Reakciju oksidacije pomaže prisutni glicerol. Intezitet nastale boje je direktno proporcionalan koncentraciji oksidanasa prisutnih u uzorku sa apsorpcionim pikom na 560 nm. Kao standard korišćen je vodonik peroksid. Rezultat se izražava kao ekvivalent mikromol vodonik peroksida po litru (μmol H₂O₂ equivaleent/L) [137].

3.7.5. Određivanje uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP)

Spektrofotometrijska metoda razvijena od strane *Witko-Sarsat* i saradnika [138] uspela je da kvantifikuje uznapredovale produkte oksidacije proteina, kao jedna od kritičnih meta oksidacije nakon narušenog oksidativnog balansa organizma. Princip metode je dvostepeno merenje apsorbance uzorka u opsegu talasnih dužina 200-400 nm sa karakterističnim pikom na 340 nm. Prvo merenje se izvodi u razblaženom uzorku sa fosfatnim puferom (pH=7,4) a drugo, u razblaženom uzorku uz dodatak sirćetne kiseline i rastvora KJ (1,16 M). Dobijena razlika izmerenih vrednosti apsorbanci na 340 nm kvantifikuje AOPP vrednost za dati uzorak. Koncentracija AOPP se izražava preko ekvivalenata hloramina T koji se koristi za izradu standardne krive (10-100 $\mu\text{mol/L}$), pri čemu apsorbance linearno raste sa porastom koncentracija. Jedinice izražavanja AOPP su $\mu\text{mol/L}$ ekvivalenata hloramina T.

3.7.6. Određivanje sadržaja ukupnih sulfhidrilnih grupa (SHG)

Alifatična tiolna jedinjenja u baznoj sredini reaguju sa DTNB (2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoeva kiselina) pri čemu se po jednom molu tiola stvara jedan mol *p*-nitrofenola. Intenzitet nastale boje ima

apsorpcioni pik na 412 nm. Koncentracija ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa izračunava se preko molarnog ekstinkcionog koeficijenta *p*-nitrofenola na 412 nm ili pomoću kalibracione krive redukovanog glutationa kao standarda (0,1-1 mmol/L). Dobijena jednačina prave $y = 0,637x + 0,005$ ima koeficijent korelacije $R^2 = 0,978$. Jedinice izražavanja ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa su mmol/L.

3.7.7. Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD)

Metoda se zasniva na sposobnosti enzima superoksid dizmutaze (SOD, EC 1.15.1.1.) da inhibira spontanu autoksidaciju adrenalina pri pH=10,2 [139]. Adrenalin veoma lako podleže autoksidaciji zbog prisustva tragova metala kao onečišćenja u reagensima. Vršiti se dvostepeno merenje ispitivanog uzorka sa i bez prisustva SOD. Nastao crveno obojeni proizvod (adrenohrom, nastao oksidacijom adrenalina) ima apsorpcioni pik na 480 nm. Relativna jedinica aktivnosti SOD je definisana kao ona aktivnost koja dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina pod tačno definisanim uslovima. Prihvaćena promena apsorbancije u minuti je 0,025 i pri ovoj vrednosti SOD postiže najveći procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Aktivnost SOD uzorka se izračunava kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina.

3.7.8. Određivanje paraoksonazne aktivnosti (POazne, EC 3.1.8.1)

Princip spektrofotometrijske metode određivanja PON1 zasnovan je na sposobnosti enzima da hidrolizuje specifičan supstrat. Najčešće upotrebljavan supstrat je paraokson (dietil-*p*-nitrofenil fosfat, E 600) koji pri definisanim uslovima reakcije hidrolizuje do toksičnog metabolita oksona po kojem je enzim i dobio naziv [140]. Određivanje PON1 aktivnosti vršeno je u uzorcima plazme i seruma. Brzina konverzije paraoksona do *p*-nitrofenola merena je kinetičkim testom na talasnoj dužini od 405 nm u baznoj sredini, kada je prisutan anjonski oblik *p*-nitrofenola. Promena apsorbance se meri u toku 3 minuta i na osnovu dobijenih vrednosti izračunava se promena apsorbance po minuti. Neophodni uslovi za izvođenje reakcije su radna temperatura od 25 °C i pH vrednost 8,5. Paraoksonazna aktivnost PON1 se izražava kao $\mu\text{mol stvorenog } p\text{-nitrofenola/min/L}$ ili kao IU/L.

3.7.9. Određivanje prooksidativnog-antioksidativnog balansa (PAB)

Alamdari i sar. su 2007. godine [141] modifikovali originalnu metodu i objedinili su određivanje obe strane dinamičke ravnoteže oksidativnog statusa (opterećenost prooksidansima sa jedne strane i kapacitet antioksidanasa sa druge strane). Metoda je poznata pod nazivom prooksidativno-antioksidativni balans, a princip metode je sledeći: vodonik peroksid reaguje istovremeno sa hromogenim supstratom (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) i antioksidansom (mokraćna kiselina). Reakcija vodonik peroksida i hromogena je enzimski katalizovana peroksidazom, pri čemu oksidovanjem tetrametilbenzidina nastaje intenzivno plavo obojeno jedinjenje. Sa druge strane, reakcija mokraćne kiseline i tetrametilbenzidina je nekatalizovana hemijska reakcija u kojoj se tetrametilbenzidin katjon redukuje do bezbojnog proizvoda. Kapacitet prisutnih antioksidanasa se kalibriše prema mokraćnoj

kiselini (izražava se u $\mu\text{mol}\times\text{L}^{-1}$ mokraćne kiseline), a kapacitet prooksidanasa prema vodonik peroksidu (izražava se u $\mu\text{mol}\times\text{L}^{-1}$ vodonik-peroksida).

3.7.10. Određivanje koncentracije superoksidnog anjona ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Auclair i Voisin su davne 1985. godine [142] postavili metodu za određivanje brzine stvaranja superoksid anjon radikala. Metoda je zasnovana na sposobnosti superoksid anjon radikala da redukuje jedinjenja poput hinina, tetranitrometana, citohroma c, kao i brojna aromatična jedinjenja sa nitro grupama. Jedno takvo jedinjenje je i 2,2'-di-*p*-nitrofenil-5,5'-difetil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difetilen)-ditetrazolium hlorid, NBT. Redukcijom NBT do formazona menja se boja rastvora iz žute u plavu što je upravo mera stvaranja superoksid radikala. Redukcija se odvija u dve faze, prva faza do monoformazana i druga do diformazana. Brzina stvaranja superoksid anjona se izražava preko brzine stvaranja redukovanog NBT kinetičkim postupkom. Izračunavanje se vrši pomoću molarnog ekstincionog koeficijenta monoformazana a rezultat se izražava u $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$.

3.7.11. Određivanje ishemijom modifikovanog albumina (IMA)

Princip metode određivanja IMA zasnovan je na sposobnosti albumina da na svom aminoterminalnom kraju vezuje egzogeno dodat kobalt. Naime, albumin koji nakon ishemije ima izmenjen aminoterminalni domen poseduje redukovan kapacitet vezivanja kobalta. Reakcija se izvodi uz pomoć kolorimetrijskog indikatora (ditioeritrol) i zaustavlja se dodatkom fiziološkog rastvora. Apsorbanca se meri na 470 nm i sve vrednosti apsorbance veće od 0,400 smatraju se pozitivnim rezultatom. Suprotno, sve vrednosti manje od 0,400 smatraju se negativnim rezultatom za ishemiju.

3.8. Metodologija određivanja statusa receptora

3.8.1. Metodologija određivanja statusa estrogen (ER) i progesteron (PR) receptora

Metod određivanja ER/PR zasnovan je na imunohistohemijskom principu. Monoklonska zečija anti-human estrogen receptor α antitela reaguju sa ER antigenom. Rezultat se izražava kao negativan (0) i pozitivan (1-8). Za određivanje je korišćen komercijalni *Flex monoclonal rabbit anti human estrogen receptor α Clone EP1 set (Dako North America, Carpinteria, California, SAD)*.

Monoklonska mišja anti-human progesteron receptor antitela reaguju sa PR antigenom. Rezultat se izražava kao negativan i pozitivan. Za određivanje je korišćen komercijalni *Flex monoclonal rabbit anti human progesteron receptor Clone PgR 636 set (Dako North America, Carpinteria, California, SAD)*.

3.8.2. Metodologija određivanja human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)

Metod određivanja HER-2 zasnovan je na imunohistohemijskom principu. Poliklonska zečija anti-human c-erbB-2 onkoprotein antitela reaguju sa intracelularnim domenom c-erbB-2 proteina ćelija. Proizvod dobijene reakcije se ocenjuje skorom (0, 1+, 2+ ili 3+). Rezultat je negativan za dobijeni skor 0 i 1+. Rezultati iskazani kao 2+ zahtevaju superanalizu jednom od metoda *in situ* hibridizacije (CISH ili fluorescentna *in situ* hibridizacija, FISH) dok je jasno pozitivan rezultat za vrednost skora 3+. Za određivanje je korišćen komercijalni *Policlonal rabbit anti human c-erb-2 oncoprotein set (Dako North America, Carpinteria, California, SAD)*.

3.8.3. Metodologija određivanja Ki-67 antigena

Marker Ki-67 predstavlja marker proliferativnosti tumorskih ćelija čija primena poslednjih godina dobija sve više na značaju upravo zbog njegovog značajnog prognostičkog potencijala za procenu preživljavanja. Metod određivanja Ki-67 antigena zasnovan je na imunohistohemijskom principu. Monoklonska mišja anti-human Ki-67 antigen antitela reaguju sa Ki-67 antigenom ćelija. Rezultat se izražava u procentima. Za određivanje je korišćen komercijalni *Flex monoclonal mouse anti human Ki-67 antigen Clone MIB-1 set (Dako North America, Carpinteria, California, SAD)*.

Na osnovu vrednosti markera proliferativnosti, karcinomi dojke se klasifikuju u jednu od sledeće tri kategorije

- karcinomi dojke sa niskim Ki-67 proliferativnim indeksom (<15%)
- karcinomi dojke sa intermedijarnim Ki-67 proliferativnim indeksom (16-30%)
- karcinomi dojke sa visokim Ki-67 proliferativnim indeksom (>30%)

3.9. Histopatološka analiza organa pacova

Uzorci tkiva eksperimentalnih životinja nakon izrade parafinskih slajdova debljine 5 μm bojeni su hematoxilen-eozin bojenjem i pregledani mikroskopiranjem.

3.10. Statistička obrada podataka

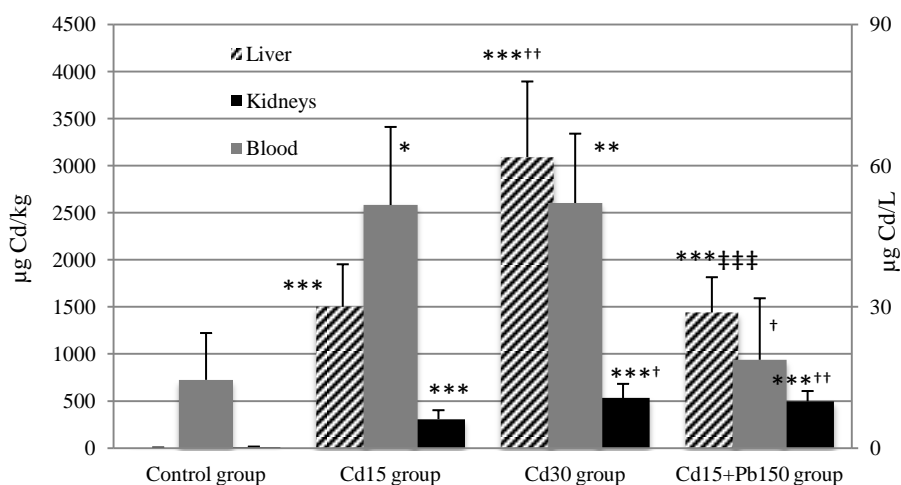
Za statističku obradu podataka korišćeni su SPSS[®] 18.0 for Windows (*SPSS Inc.*, Chicago, IL) software, GraphPad Prism 6 software (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, California, USA) i Microsoft Office Excel 2007. Raspodela podataka je ispitivana *Shapiro-Wilk* i *Kolmogorov-Smirnov* testovima, a za testiranje homogenosti varijanse je korišćen *Levene-ov* test. Podaci koji su pratili normalnu raspodelu prikazani su kao aritmetičke srednje vrednosti sa standardnim devijacijama. Podaci koji su nakon logaritamske transformacije pratili normalnu raspodelu prikazani su kao geometrijske srednje vrednosti sa 95% intervalom pouzdanosti (95% CI). Ukoliko su parametri zadovoljili uslove normalnosti raspodele podataka, *Student-ov t-test* je korišćen za testiranje postojanja razlika između grupa, kao i jednofaktorska ANOVA praćena LSD post hoc testom. Za procenu međusobne povezanosti ispitivanih parametara korišćena je *Pearson-ova* korelaciona analiza. Ukoliko podaci nisu sledili normalnu raspodelu, za statističku obradu korišćeni su neparametarski *Kruskal-Wallis H* i *Mann-Whitney U* testovi. Ovi podaci prikazani su kao medijane sa interkvartilnim rasponima (IQR). Za procenu međusobne povezanosti ispitivanih parametara korišćena je *Spearman-ova* korelaciona analiza. Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne ili relativne frekvence. Kategoričke varijable analizirane su Chi-kvadrat (χ^2) testom. Binarna logistička regresija korišćena je za ispitivanje prediktivnog potencijala analiziranih parametara u odnosu na bolest. Podaci iz binarne logističke regresije su prikazani kao *odds ratio* (OR) i 95% interval pouzdanosti (CI). Statistički značajnim razlikama smatrane su one za koje je postignuto $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Animalna studija

4.1.1. Kadmijum i olovo u krvi i organima

Kod eksperimentalnih grupa pacova koje su oralnom gavažom primile pojedinačne doze Cd (15 i 30 mg/kg t.m.) izmerene su značajno više koncentracije Cd u krvi od kontrolne grupe. Međutim, nakon primene smeše Cd i Pb izmerena koncentracija Cd u krvi nije se statistički razlikovala od koncentracije metala kontrolne grupe pacova. Koncentracije Cd u jetri kod obe eksperimentalne grupe koje su primile pojedinačne doze Cd bile su značajno više u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$). Takođe, kod grupe koja je tretirana većom dozom Cd izmerene su dvostruko više koncentracije Cd u jetri ($P < 0,01$) u odnosu na nižu dozu Cd. Sa druge strane, ekspozicija smeši Cd i Pb rezultovala je značajno višom koncentracijom Cd u jetri u odnosu na kontrolnu grupu, ali ne i u odnosu na Cd₁₅ grupu. Koncentracije Cd u bubrezima nakon akutne ekspozicije kod obe eksperimentalne grupe pacova koje su primile pojedinačne doze Cd (Cd₁₅ grupa i Cd₃₀ grupa) bile su značajno više u odnosu na netretirane životinje ($P < 0,001$). Takođe, viša koncentracija Cd u bubrezima izmerena je kod Cd₃₀ grupe u odnosu na Cd₁₅ grupu. Nakon primene smeše, koncentracija Cd u bubrezima je značajno bila viša u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0,001$) i Cd₁₅ grupu ($P < 0,01$). Koncentracije Cd u krvi, jetri i bubrezima pacova nakon akutne oralne ekspozicije toksičnim metalima prikazane su na Slici 1.

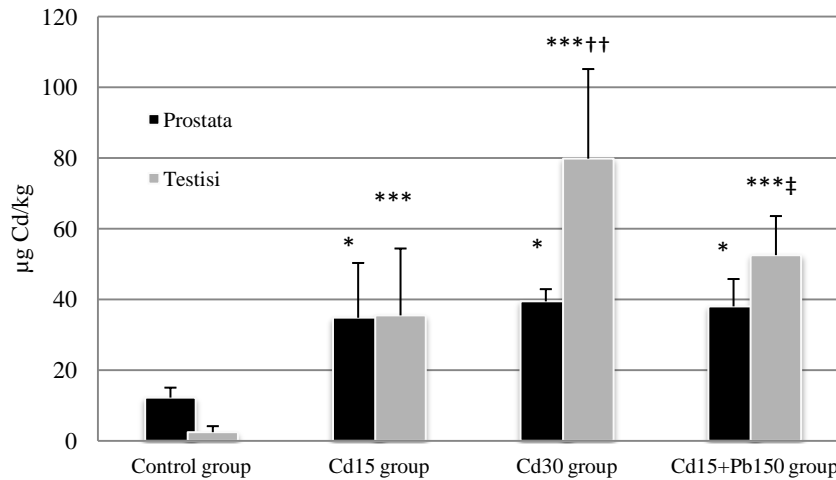


Slika 1. Koncentracija Cd u krvi, jetri i bubrezima pacova nakon akutne ekspozicije Cd i Pb

Koncentracija Cd u krvi izražena je u µg Cd/L a u jetri i bubrezima u µg Cd/kg. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Statistički značajne razlike ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, † u odnosu na Cd₁₅ grupu i ‡ u odnosu na Cd₃₀ grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA praćena odgovarajućim post hoc testom. *†‡ $P < 0,05$; **††‡‡ $P < 0,01$; ****†††† $P < 0,001$.

Na Slici 2 prikazane su koncentracije Cd u prostati i testisima pacova nakon akutne oralne ekspozicije toksičnim metalima. Aplikacija obe pojedinačne doze Cd kao i smeše Cd i Pb rezultovala je značajno višim koncentracijama toksičnog metala u prostati pacova u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) Koncentracije Cd u testisima kod sve tri tretirane grupe bile su značajno više u odnosu na kontrolnu

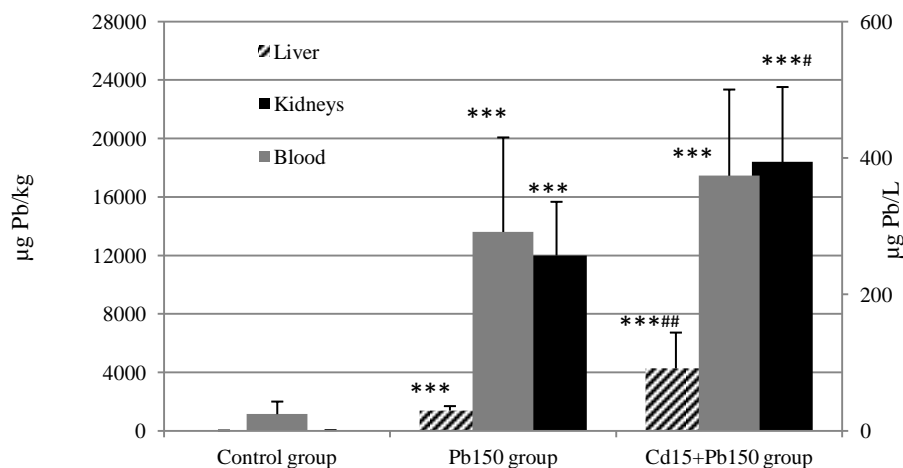
grupu ($P < 0,001$). Za razliku od prostate gde razlika nije pokazana unutar grupa, kod tkiva testisa je ekspozicija 30 mg Cd/kg t.m. rezultovala 2,3 puta većom koncentracijom Cd u odnosu na grupu koja je primila 15 mg Cd/kg t.m. ($P < 0,01$) i 1,3 puta većom koncentracijom u odnosu na grupu koja je tretirana smešom.



Slika 2. Koncentracija Cd u prostati i testisima pacova nakon akutne ekspozicije Cd i Pb

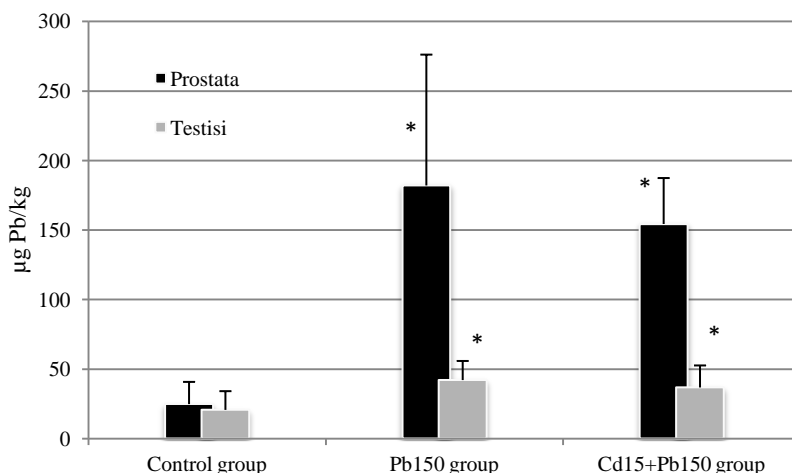
Koncentracija Cd izražena je u $\mu\text{g Cd/kg}$. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Statistički značajne razlike ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, † u odnosu na Cd_{15} grupu i ‡ u odnosu na Cd_{30} grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA praćena odgovarajućim post hoc testom. *†‡ $P < 0,05$; **†‡‡ $P < 0,01$; ****†‡‡‡ $P < 0,001$.

Eksperimentalne grupe pacova koje su akutno oralnom gavažom tretirane sa Pb imale su značajno više koncentracije ovog metala u krvi, jetri i bubrezima u odnosu na netretirane životinje ($P < 0,001$). Dodatno, eksperimentalna grupa koja je primila smešu Cd i Pb imala je značajno višu koncentraciju Pb u jetri ($P < 0,01$) i u bubrezima ($P < 0,05$) u odnosu na grupu koja je tretirana pojedinačnom dozom Pb (Slika 3). Koncentracija Pb koja je izmerena u prostati i testisima nakon ekspozicije pojedinačnom dozom kao i smešom metala bila je viša u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 4).



Slika 3. Koncentracija Pb u krvi, jetri i bubrezima pacova nakon akutne ekspozicije Pb i Cd

Koncentracija Pb u krvi izražena je u $\mu\text{g Pb/L}$ a u jetri i bubrezima u $\mu\text{g Pb/kg}$. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Statistički značajne razlike ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, odnosno # u odnosu na Pb_{150} grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA praćena odgovarajućim post hoc testom. *# $P < 0,05$; **## $P < 0,01$; ****### $P < 0,001$.



Slika 4. Koncentracija Pb u prostati i testisima pacova nakon akutne ekspozicije Pb i Cd

Koncentracija Pb izražena je u $\mu\text{g Pb/kg}$. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Statistički značajne razlike ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, odnosno # u odnosu na Pb_{150} grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA praćena odgovarajućim post hoc testom. *# $P < 0,05$; **## $P < 0,01$; ****### $P < 0,001$.

4.1.2. Hematološki parametri

Kod eksperimentalne grupe pacova koja je bila tretirana dozom Cd od 30 mg/kg t.m. pokazano je značajno sniženje broja leukocita u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0,001$) kao i u odnosu na Cd_{15} grupu ($P < 0,01$). Uočenu leukopeniju kod Cd_{30} grupe pratila je limfopenija u apsolutnom broju koja je bila značajna u odnosu na kontrolnu grupu kao i u odnosu na Cd_{15} grupu ($P < 0,01$). Limfopenija je

pokazana i pri aplikovanju niže pojedinačne doze Cd u odnosu na kontrolu ($P<0,01$). Kod eksperimentalnih grupa koje su primile Pb neutrofilija u apsolutnom broju bez promene u ukupnom broju leukocita ostvarena je nakon primene smeše, dok nakon tretmana pojedinačne doze Pb statistički značajne promene u beloj lozi nisu uočene. Takođe, ekspozicija toksičnih metala nije dovela do drugih značajnih promena u leukocitarnoj formuli tretiranih životinja.

Kod svih eksperimentalnih grupa akutna ekspozicija pojedinačnim dozama Cd i Pb, kao i smešom Cd i Pb, značajno je smanjila vrednosti ukupnog broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokritne vrednosti u odnosu na netretirane pacove. Međutim, unutar eksperimentalnih grupa statistički značajnih razlika nije bilo. Najizraženiji efekat sniženja pokazan je nakon doze od 30 mg Cd/kg t.m. kao i nakon primene smeše 15 mg Cd/kg t.m. i 150 mg Pb/kg t.m. Naime, ukupan broj eritrocita je u odnosu na kontrolnu grupu snižen za 27%, hemoglobin za 21% i hematokrit za 22% kod Cd₃₀ grupe, odnosno 25% za RBC, 21% za HGB i 24% za HCT kod Cd₁₅+Pb₁₅₀ grupe. Među parametrima koji reprezentuju eritrocitne indekse značajne promene zapažene su jedino u vrednostima MCH (Cd₁₅ grupa i Cd₃₀ grupa). Prosečan volumen eritrocita kao i indeks anizocitoze nisu značajno bili izmenjeni primenjenim doznim režimom toksičnih metala.

Trombocitoza je uočena nakon primene pojedinačne doze Cd od 15 mg/kg t.m. ($P<0,01$), odnosno trombocitopenija nakon ekspozicije 30 mg Cd/kg t.m. ($P<0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu. Pojedinačna doza Pb dovela je do trombocitopenije u odnosu na kontrolu ($P<0,01$). Takođe, trombocitopenija je primećena i nakon aplikovanja smeše ali samo u odnosu na Cd₁₅ grupu ($P<0,001$). Efekti pojedinačnih doza Cd i Pb kao i njihove smeše nakon akutne oralne ekspozicije pacova na hematološke parametre prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Efekat Cd i/ili Pb na hematološke parametre pacova nakon akutne ekspozicije

	Kontrolna grupa	Cd ₁₅ grupa	Cd ₃₀ grupa	Pb ₁₅₀ grupa	Cd ₁₅ +Pb ₁₅₀ grupa
WBC (10⁹/L) ¹	3,85±0,68	3,56±0,53	2,36±0,32***††	4,08±0,75	3,97±0,66
Limfociti (10⁹/L) ²	2,58 1,84-2,94	1,84** 1,36-2,11	1,15**†† 1,01-1,16	2,54 2,18-2,77	2,22 1,44-2,69
Neutrofili (10⁹/L) ²	1,02 0,80-1,41	1,21 0,73-1,99	0,88 0,75-1,18	1,27 0,81-1,43	1,23* 0,95-2,14
RBC (10¹²/L) ¹	6,91±0,25	5,61±0,98***	5,05±0,61***	5,74±0,67**	5,19±0,74***
HGB (g/L) ²	148,0 143,0-161,0	139,0* 105,0-154,0	117,5*** 104,0-128,0	126,5* 118,0-153,0	117,0*** 94,0-127,0
HCT (L/L) ²	0,401 0,380-0,410	0,343* 0,250-0,410	0,314*** 0,260-0,340	0,336* 0,300-0,420	0,303*** 0,210-0,340
MCV (fL) ²	58,0 56,0-61,0	58,0 57,0-62,0	60,5 56,0-69,9	60,0 56,0-63,0	58,0 56,0-59,0
MCH (pg) ²	21,0 20,0-23,0	23,5** 22,0-25,0	23,0* 22,0-26,0	22,5 22,0-24,0	22,0 21,0-26,0
MCHC (g/L) ²	370,0 361,0-390,0	398,0 379,0-420,0	386,5 349,0-409,0	383,0 361,0-397,0	379,0 372,0-447,0
PLT (10⁹/L) ¹	571,25±43,03	701,00±40,30**	341,50±92,36***†††	449,50±100,60**	525,00±53,86†††

¹ Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija; ² Vrednosti su prikazane kao medijana i raspon. WBC = leukociti; RBC = eritrociti; HGB = hemoglobin; HCT = hematokrit; MCV = prosečna zapremina eritrocita; MCH = prosečna količina hemoglobina u eritrocitu; MCHC = prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima; PLT = trombociti. Statistički značajne razlike ($P<0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, † u odnosu na Cd₁₅ grupu, ‡ u odnosu na Cd₃₀ grupu i # u odnosu na Pb₁₅₀ grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćene su jednofaktorska ANOVA i Kruskal-Wallis neparametarski test praćeni odgovarajućim post hoc testovima. *†‡# $P<0,05$; **†‡‡## $P<0,01$; ***†††‡‡‡### $P<0,001$.

4.1.3. Biohemijski parametri

Akutna ekspozicija toksičnim metalima oralnim putem, pojedinačna i kao smeša toksičnih supstanci, dovela je do izmene profila pojedinih biohemijskih parametara kod eksperimentalnih životinja (Tabela 4). Naime, kod svih eksperimentalnih grupa je došlo do značajnog sniženja koncentracije uree, dok je koncentracija kreatinina bila viša u odnosu na netretirane životinje, nakon ekspozicije većoj dozi Cd (30 mg/kg t.m., $P<0,01$) i pojedinačnoj dozi Pb (150 mg/kg t.m.). Značajno niža koncentracija ukupnih proteina ($P<0,01$) i albumina ($P<0,05$) uočena je nakon aplikacije smeše Cd i Pb u odnosu na kontrolnu grupu. Viši nivo bilirubina (direktnog) u serumu eksperimentalnih životinja dokumentovan je nakon ekspozicije pojedinačnoj dozi Pb u odnosu na kontrolnu grupu ($P<0,01$) kao i u odnosu na ostale tretirane grupe ($P<0,01$). Sa druge strane, značajno više koncentracije ukupnog bilirubina u odnosu na netretirane pacove pokazane su kod Cd₁₅ grupe i Cd₃₀ grupe ($P<0,01$ i $P<0,05$). Primenjen dozni režim nije doveo do značajne izmene nivoa mokraćne kiseline kod životinja nakon akutne ekspozicije.

Primena različitih doza Cd, pojedinačna doza Pb kao i smeša ova dva toksična metala uticala je na značajno sniženje gvožđa u serumu kod svih tretiranih grupa u odnosu na kontrolnu ($P<0,001$). Trend nižih nivoa serumskog kalcijuma zapažen je kod tretiranih životinja, međutim, statistička značajnost ostvarena je samo kod grupa koje su primale Pb, sa izraženijim efektom redukcije nakon primene smeše ($P<0,01$). Sličan scenario je pokazan i za nivo serumskog magnezijuma. Naime, niži nivo Mg primećen je ne samo kod grupa koje su primile Pb već i kod grupe koja je bila izložena većoj dozi Cd (30 mg kg/t.m.). Koncentracija serumskog neorganskog fosfora bila je značajno niža jedino kod Cd₃₀ grupe u odnosu na kontrolu. Pojedinačna doza Pb kao i primena veće doze Cd dovele su do izmene koncentracije hlorida u serumu pacova u odnosu na netretirane pacove. Takođe, nakon primene smeše toksičnih metala koncentracija hlorida značajno se razlikovala u odnosu na pojedinačnu dozu Pb ($P<0,01$).

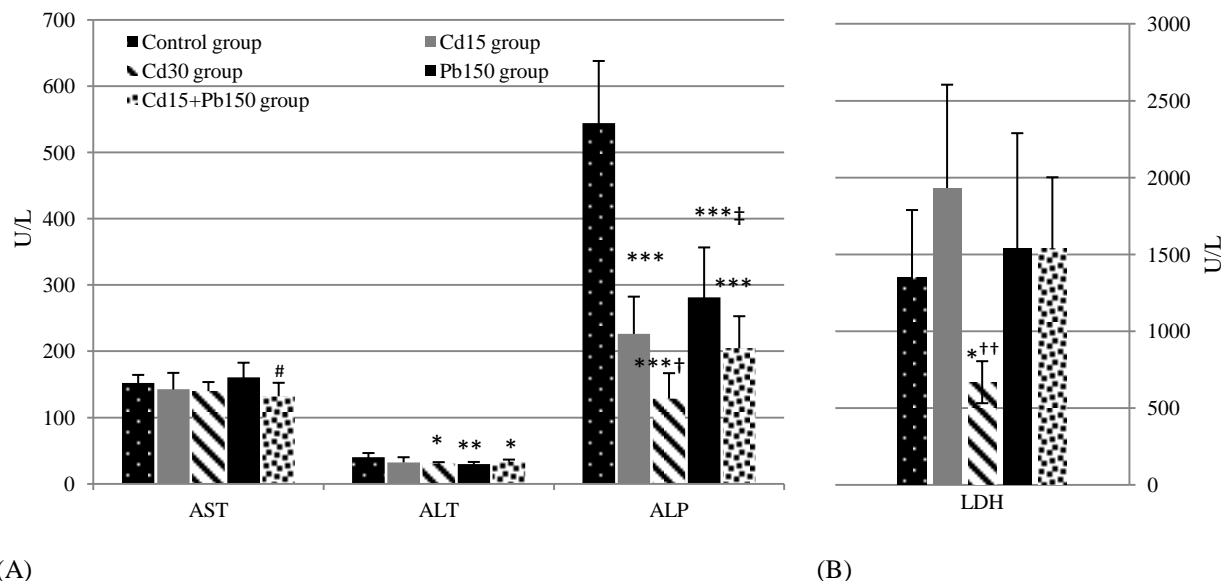
Primenjen dozni režim Cd i/ili Pb nije doveo do značajne promene serumskog testosterona kod eksperimentalnih životinja.

Tabela 4. Efekat Cd i/ili Pb na biokemijske parametre u seruma pacova nakon akutne ekspozicije

	Kontrolna grupa	Cd ₁₅ grupa	Cd ₃₀ grupa	Pb ₁₅₀ grupa	Cd ₁₅ +Pb ₁₅₀ grupa
BU (mmol/L) ¹	10,72±1,02	8,56±0,82***	8,76±1,08**	8,76±1,12**	9,08±1,13**
CRE (µmol/L) ²	42,45 39,5-43,4	44,75 35,5-53,4	45,45** 42,8-53,4	43,40* 41,4-46,7	43,40 40,5-46,1
TP (g/L) ²	59,0 53,4-63,3	60,3 45,3-74,2	61,8 53,4-64,9	59,5 55,1-66,8	52,4** [#] 48,7-58,0
ALB (g/L) ²	32,1 29,4-35,7	28,8 22,5-36,6	30,3 27,0-33,4	30,7 29,9-32,1	28,8* 26,3-32,0
DB (µmol/L) ²	0,4 0,3-0,5	0,45 0,2-0,5	0,4 0,3-0,6	0,7** ^{††‡‡} 0,7-0,9	0,4 ^{##} 0,4-0,6
TB (µmol/L) ¹	2,04±0,16	2,56±0,33**	2,38±0,38*	2,24±0,16	2,18±0,14 [†]
Fe (µmol/L) ¹	61,7±11,4	27,5±8,8***	21,6±5,8***	36,3±10,5***	31,4±6,3***
Ca (mmol/L) ²	2,93 2,5-3,2	2,73 2,2-3,2	2,65 2,5-3,1	2,65* 2,5-2,9	2,48** 2,2-2,7
Mg (mmol/L) ²	1,70 1,5-1,9	1,55 1,1-2,2	1,30* 1,3-1,8	1,35*** 1,0-1,5	1,30*** 1,1-1,5
P (mmol/L) ²	3,05 3,0-3,4	2,87 2,6-4,4	2,71* 2,4-3,3	3,15 2,9-3,2	3,05 2,1-3,4
Cl (mmol/L) ²	105,0 102,0-109,0	110,5 102,0-118,0	108,5* 105,0-116,0	113,0*** 108,0-118,0	106,0 ^{##} 100,0-109,0
Testosteron (ng/mL) ²	1,95 1,21-3,20	1,48 0,78-2,20	1,26 0,42-2,58	2,31 1,95-5,96	2,14 1,38-2,38

¹ Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ² Vrednosti su prikazane kao medijana i raspon. Urea (BU), kreatinin (CRE), ukupni proteini (TP), albumin (ALB), bilirubin direktni (DB), bilirubin ukupan (TB), gvožđe (Fe), kalcijum (Ca), magnezijum (Mg), neorganski fosfor (P), hlorid (Cl). Statistički značajne razlike ($P<0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, † u odnosu na Cd₁₅ grupu, ‡ u odnosu na Cd₃₀ grupu i # u odnosu na Pb₁₅₀ grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćene su jednofaktorska ANOVA i Kruskal-Wallis neparametarski test praćeni odgovarajućim post hoc testovima. *†‡# $P<0,05$; **†‡‡## $P<0,01$; ***††‡‡‡### $P<0,001$.

Značajno niža aktivnosti ALT utvrđena je kod grupe koja je primila veću dozu Cd kao i kod obe grupe koje su primile Pb, u odnosu na kontrolnu grupu. Sa druge strane, AST aktivnost je bila značajno niža nakon aplikacije smeše Cd i Pb u odnosu na pojedinačnu dozu Pb. Obe doze Cd dovele su do sniženja aktivnosti ALP u odnosu na kontrolu ($P<0,001$). Takođe, aktivnost ALP bila je značajno niža nakon aplikacije 30 mg Cd/kg t.m. u odnosu na aplikaciju 15 mg Cd/kg t.m. Slično, obe eksperimentalne grupe koje su bile izložene Pb imale su značajno nižu ALP aktivnost u odnosu na kontrolnu grupu ($P<0,001$). Značajno niža LDH aktivnost u seruma eksperimentalnih životinja Cd₃₀ grupe u odnosu na kontrolnu grupu i Cd₁₅ grupu ($P<0,05$, odnosno $P<0,01$) uočena je nakon akutne oralne ekspozicije. Primenjen dozni režim nije doveo do značajnih promena u aktivnostima amilaze u seruma pacova. Efekti pojedinačnih doza Cd i Pb kao i njihove smeše nakon akutne oralne ekspozicije pacova na aktivnost ispitivanih enzima u serumu, koji su bili značajno izmenjeni, prikazani su na Slici 5A i 5B.



Slika 5. Efekat Cd i/ili Pb na aktivnost enzima AST, ALT i ALP (A) i LDH (B) u serumu pacova nakon akutne oralne ekspozicije

Aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (ALP), laktat dehidrogenaza (LDH). Aktivnosti enzima su prikazane kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Statistički značajne razlike ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, † u odnosu na Cd₁₅ grupu, ‡ u odnosu na Cd₃₀ grupu i # u odnosu na Pb₁₅₀ grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćene je jednofaktorska ANOVA praćena odgovarajućim post hoc testom. *†‡# $P < 0,05$; **†‡‡‡### $P < 0,01$; ***†‡‡‡‡‡#### $P < 0,001$.

4.1.4. Parametri oksidativnog statusa

Akutna oralna ekspozicija toksičnim metalima kao i smeši metala izmenila je nivoe parametara oksidativnog statusa kako u krvi eksperimentalnih životinja tako i u ispitivanim organima, jetri i bubrezima (Tabela 5). U krvi, primena 30 mg/kg t.m. Cd značajno je povećala nivo MDA u odnosu na nižu dozu Cd (15 mg/kg t.m.). Potom, u eksperimentalnoj grupi koja je primila smešu Cd i Pb došlo je do značajnog porasta koncentracija MDA i AOPP u odnosu na grupe koje su primile istu dozu toksičnih metala ali kao pojedinačnu supstancu. Takođe, značajno veća koncentracija AOPP je izmerena u krvi pacova nakon aplikacije smeše u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0,001$). Primenjen dozni režim nije značajno promenio ukupne nivoe SHG, O₂⁻ i PAB, kao ni PON-1 aktivnost u krvi pacova.

Sa druge strane, u jetri, pojedinačne doze Cd i Pb su nakon akutne ekspozicije dovele do značajnog povećanja AOPP nivoa, bez razlike između grupa. Takođe, nakon primene smeše Cd i Pb, nivo AOPP u jetri pacova nije se razlikovao od kontrolne grupe, međutim, bio je značajno niži od AOPP vrednosti izmerenih kod eksperimentalnih grupa koje su primile pojedinačnu dozu toksičnih metala. Ostali ispitivani parametri oksidativnog statusa u jetri pacova (nivo MDA, SHG, O₂⁻, kao i PON-1 i SOD aktivnost) nisu se značajno razlikovali nakon tretmana u odnosu na kontrolu.

Aplikacija pojedinačne doze Cd od 30 mg/kg t.m. značajno je povećala nivo MDA u bubrezima pacova u odnosu na nižu dozu Cd (15 mg/kg t.m.). Obe eksperimentalne grupe koje su tretirane olovom takođe

su imale veće MDA nivoe u bubrezima u odnosu na kontrolnu grupu pri čemu je izraženiji efekat ostvaren nakon primene smeše ($P<0,001$). Takođe, primena smeše dovela je do većih MDA nivoe u odnosu na pojedinačnu dozu Cd ($P<0,01$). Nivoi AOPP, SHG, O_2^- kao i SOD aktivnosti, nisu se značajno razlikovali u bubrezima izloženih pacova i kontrolne grupe.

Tabela 5. Parametri oksidativnog statusa u krvi, jetri i bubrezima pacova nakon akutne ekspozicije Cd i/ili Pb

		Kontrolna grupa	Cd ₁₅ grupa	Cd ₃₀ grupa	Pb ₁₅₀ grupa	Cd ₁₅ +Pb ₁₅₀ grupa
Krv	MDA (µmol/L)	2,23 1,99-3,68	1,94 1,49-2,82	2,66 [†] 2,17-3,13	2,10 [‡] 1,62-2,46	2,41 ^{†#} 2,16-3,21
	AOPP (µmol/g proteina)	1,84 1,67-2,19	1,40* 1,20-1,95	1,97 1,26-3,68	2,34 [†] 1,53-6,04	13,53***†††††### 9,94-16,59
	SHG (mmol/L)	0,12 0,08-0,21	0,16 0,10-0,22	0,13 0,10-0,13	0,16 0,13-0,26	0,18 0,13-0,27
	PAB (HKU)	136,6 105,3-181,6	186,2 169,0-215,9	189,6 144,3-203,5	191,0 133,6-201,4	128,6 87,2-150,0
Jetra	MDA (µmol/mg protein)	80,1 56,77-95,52	75,76 64,08-89,08	104,75 68,64-124,80	77,15 36,59-101,19	76,59 62,66-98,31
	AOPP (µmol/g protein)	83,16 35,82-166,36	234,84*** 172,37-252,13	201,66*** 179,94-324,36	178,99* [†] 114,81-228,23	81,42 ^{†‡} 38,05-194,69
	SHG (mmol/g proteina)	0,31 0,25-0,33	0,31 0,22-0,38	0,30 0,25-0,40	0,31 0,20-0,39	0,27 0,15-0,36
	SOD (U/g)	56,92 52,07-60,82	53,56 45,54-57,35	52,80 48,47-59,67	55,70 47,77-60,65	52,45 51,48-63,25
Bubrezi	MDA (µmol/mg protein)	209,42 132,68-232,39	171,94 143,99-253,74	237,65 [†] 194,81-397,13	283,88* ^{††} 197,42-328,57	273,15*** ^{††} 233,25-321,88
	AOPP (µmol/g protein)	273,68 153,97-341,22	255,58 206,36-317,21	286,65 250,53-360,61	297,75 231,56-368,82	273,79 226,38-362,08
	SHG (mmol/g proteina)	0,27 0,18-0,34	0,25 0,17-0,39	0,25 0,21-0,35	0,24 0,22-0,30	0,27 0,17-0,31
	SOD (U/g)	62,31 37,84-74,04	57,02 46,90-63,07	52,56 46,88-70,01	61,83 50,54-73,51	60,65 37,58-76,60

Parametri su prikazani kao medijana i raspon. Malondialdehid (MDA), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), ukupne sulfhidrilne grupe (SHG), prooksidativni-antioksidativni balans (PAB), superoksid dizmutaza (SOD). Parametri koje su ostali nepromenjeni nakon akutne oralne ekspozicije toksičnim metalima nisu prikazani. Statistički značajne razlike ($P<0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, † u odnosu na Cd₁₅ grupu, ‡ u odnosu na Cd₃₀ grupu i # u odnosu na Pb₁₅₀ grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Kruskal-Wallis neparametarski test praćen odgovarajućim post hoc testom. *†‡# $P<0,05$; **†‡‡‡### $P<0,01$; ***†††‡‡‡‡#### $P<0,001$.

Totalni antioksidativni status, totalni oksidativni status i indeks oksidativnog stresa u krvi, jetri i bubrezima pacova nakon akutne oralne ekspozicije toksičnim metalima i smeši metala prikazani su na Slici 6. Veće TOS vrednosti u krvi uočene su kod kod Cd₃₀ i Pb₁₅₀ grupe u odnosu na kontrolu. Primenjen dozni režim doveo je do inverzne izmene u vrednostima TAS u krvi. Naime, eksperimentalne grupe koje su primile pojedinačne doze Cd i Pb imale su niže TAS nivoe u odnosu na kontrolu, dok je nakon primene smeše, TAS nivo bio značajno veći u odnosu na grupe koje su primile pojedinačnu dozu metala. Indeks oksidativnog stresa u krvi, izračunat kao odnos TOS i TAS, imao je značajno više vrednosti nakon 30 mg Cd/kg t.m. i 150 mg Pb/kg t.m. u odnosu na kontrolnu grupu.

U jetri, značajno niži TAS nivo ostvaren je nakon primene niže doze Cd i pojedinačne doze Pb u odnosu na kontrolu. U saglasnosti sa ovim rezultatom je i dobijen rezultat za OSI indeks koji je kod

on je obuhvatio sledeće parametre: TAS, SOD, SHG i PON-1 aktivnost. Skor oksidativnog oštećenja izračunat je na isti način, izračunavanjem prosečne vrednosti standardizovane vrednosti varijabli izračunavanjem Z skora pri čemu je ovaj skor obuhvatio TOS, PAB, MDA, AOPP i O_2^- . Na kraju smo izračunali OXY skor po formuli Veglia i sar. [143] kao odnos PS i DS. Vrednost OXY skora je bliska nuli kada je suma svih ispitivanih analita približna normalnim vrednostima, ili kada je visoka vrednost skora oksidativnog oštećenja kompenzovana visokom vrednošću skora antioksidativne zaštite [143]. Nakon evaluacije prethodno prikazanih rezultata za parametre oksidativnog statusa u prikazanoj studiji, DS je imao pozitivan ishod kod Cd₃₀ ($P<0,05$) i Pb₁₅₀ grupe ($P<0,05$). Sa druge strane, parametri koji su korišćeni za evaluaciju skora antioksidativne zaštite iako su imali trend nižih vrednosti kod svih tretmana, nisu se značajno razlikovali do kontrolne grupe. Prekomerna produkcija prooksidanasa naspram antioksidativne zaštite kod Cd₃₀ grupe i Pb₁₅₀ grupe rezultovala je visokim vrednostima OXY ove dve tretirane grupe.

Tabela 6. Skor oksidativnog statusa pacova nakon akutne ekspozicije Cd i/ili Pb

	Kontrolna grupa	Cd ₁₅ grupa	Cd ₃₀ grupa	Pb ₁₅₀ grupa	Cd ₁₅ +Pb ₁₅₀ grupa
Skor oksidativnog oštećenja	-0,083±0,49	0,088±0,51	0,526±0,26*	0,485±0,24*	-0,254±0,39 [#]
Skor antioksidativne zaštite	-0,038±0,34	-0,37±0,56	-0,29±0,24	-0,11±0,37	-0,22±0,63
Globalni skor oksidativne ravnoteže	-0,045±0,58	0,46±0,89	0,81±0,39*	0,77±0,30*	-0,037±0,80 [#]

Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Statistički značajne razlike ($P<0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, † u odnosu na Cd₁₅ grupu, ‡ u odnosu na Cd₃₀ grupu i # u odnosu na Pb₁₅₀ grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA praćena odgovarajućim post hoc testom.

4.1.5. Bioelementi u krvi i organima

Eksperimentalna grupa koja je akutno bila izložena Cd u dozi od 15 mg/kg t.m. imala je značajno nižu koncentraciju Cu u krvi u odnosu na kontrolnu grupu ($P<0,001$), ali i u odnosu na grupu koja je primila smešu Cd i Pb ($P<0,001$). Sa druge strane, eksperimentalna grupa koja je akutno bila izložena Cd u dozi od 30 mg/kg t.m. imala je značajno nižu koncentraciju Zn u krvi u odnosu na kontrolnu grupu ($P<0,05$) i u odnosu na Cd₁₅ grupe ($P<0,001$). Ekspozicija smeši Cd i Pb rezultovala je značajno nižom koncentracijom Zn u krvi u odnosu na Cd₁₅ grupu i Pb₁₅₀ grupe.

Dozni režim od 30 mg Cd/kg t.m. značajno je povećao nivo Cu u jetri pacova u odnosu na kontrolnu grupu ($P<0,01$). Viša koncentracija Cu u jetri izmerena je i nakon primene Pb, bilo kao pojedinačne supstance ili u smeši, pri čemu je izraženiji efekat postignut nakon primene smeše ($P<0,01$). Nivo Zn u jetri u sve četiri eksperimentalne grupe bio je značajno viši u odnosu na netretirane pacove, pri čemu je kod primene Pb efekat bio izraženiji ($P<0,001$).

Koncentracija bioelemenata u bubrezima nakon akutne ekspozicije pacova toksičnim metalima imala je nešto drugačiji scenario, jer nije zapažena promena u koncentraciji Cu dok su koncentracije Zn bile značajno niže. Posmatrajući eksperimentalnu grupu koja je primila smešu Cd i Pb, vrednosti Zn su značajno više u odnosu na Cd₁₅ grupu, odnosno nisu se razlikovale od Pb₁₅₀ grupe.

Koncentracije bioelemenata u krvi, jetri i bubrezima pacova nakon akutne oralne ekspozicije Cd i Pb i njihovoj smeši prikazane su u Tabeli 7.

Tabela 7. Koncentracije bioeleminata u krvi, jetri i bubrezima pacova nakon akutne oralne ekspozicije Cd i/ili Pb

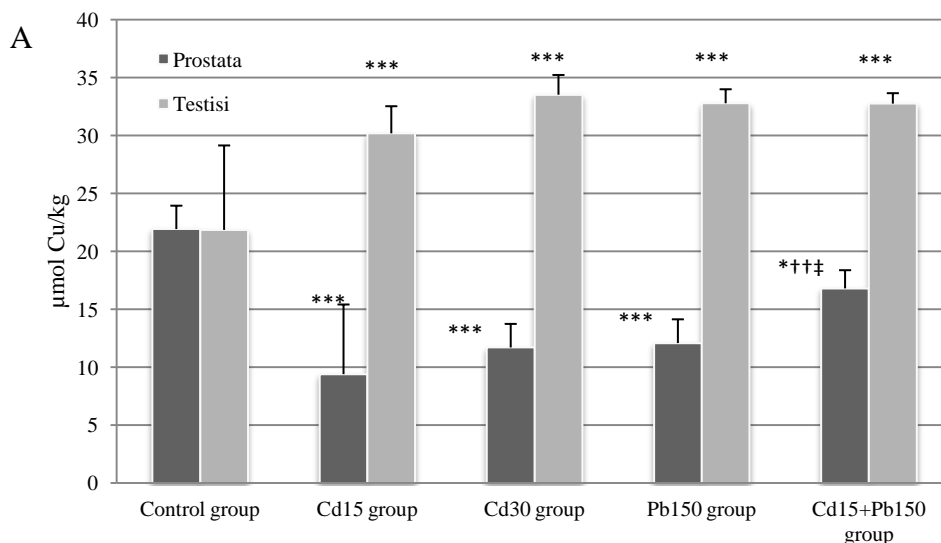
	Krv		Jetra		Bubrezi	
	Cu ($\mu\text{mol/L}$)	Zn ($\mu\text{mol/L}$)	Cu ($\mu\text{mol/kg}$)	Zn ($\mu\text{mol/kg}$)	Cu ($\mu\text{mol/kg}$)	Zn ($\mu\text{mol/kg}$)
Kontrolna grupa	22,10 \pm 1,81	87,76 \pm 3,24	50,74 \pm 2,80	462,77 \pm 57,37	96,92 \pm 10,39	374,18 \pm 38,14
Cd₁₅ grupa	16,09 \pm 1,22 ^{***}	93,19 \pm 8,61	57,60 \pm 5,58	585,16 \pm 90,11 ^{**}	79,27 \pm 4,06	299,70 \pm 25,88 ^{***}
Cd₃₀ grupa	20,00 \pm 2,34 ^{††}	74,20 \pm 15,81 ^{*†††}	65,08 \pm 10,48 ^{**}	576,49 \pm 43,11 [*]	88,27 \pm 21,02	310,47 \pm 12,89 ^{***}
Pb₁₅₀ grupa	20,59 \pm 2,40 ^{††}	92,23 \pm 7,62 ^{††}	63,26 \pm 3,65 [*]	613,06 \pm 24,48 ^{***}	110,95 \pm 22,11 ^{†††‡}	329,07 \pm 22,95 ^{**}
Cd₁₅+Pb₁₅₀ grupa	20,19 \pm 1,53 ^{†††}	81,04 \pm 7,34 ^{†#}	67,00 \pm 13,17 ^{**}	609,78 \pm 102,73 ^{***}	95,42 \pm 11,37	336,67 \pm 24,44 ^{*†}

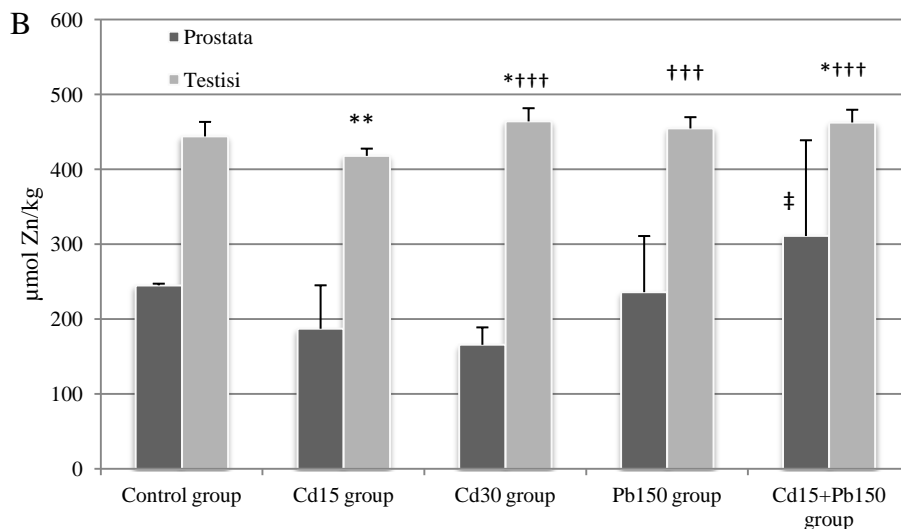
Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Statistički značajne razlike ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, † u odnosu na Cd₁₅ grupu, ‡ u odnosu na Cd₃₀ grupu i # u odnosu na Pb₁₅₀ grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA praćena odgovarajućim post hoc testom. *†‡# $P < 0,05$; **†‡‡## $P < 0,01$; ***†††‡‡‡### $P < 0,001$.

Akutna ekspozicija toksičnim metalima značajno je uticala i na nivo bioeleminata u tkivima prostate i testisa. Naime, nakon 24 h od ekspozicije u svim doznim grupama nivo Cu u tkivu prostate je bio značajno snižen u odnosu na kontrolnu grupu dok je nivo Zn bio u rangju kontrole.

Sasvim suprotan scenario primećen je u tkivu testisa gde je nakon tretmana izmeren značajno viši nivo Cu kod svih eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolu. Potom, dok je jedino kod Cd₁₅ grupe primećeno značajno sniženje Zn u tkivu testisa u odnosu na kontrolnu grupu, sve ostale dozne režime karakterisale su značajno više koncentracije Zn.

Koncentracije bioeleminata u prostati i testisima pacova nakon akutne oralne ekspozicije Cd i Pb i njihovoj smeši prikazane su na Slici 7A i 7B.

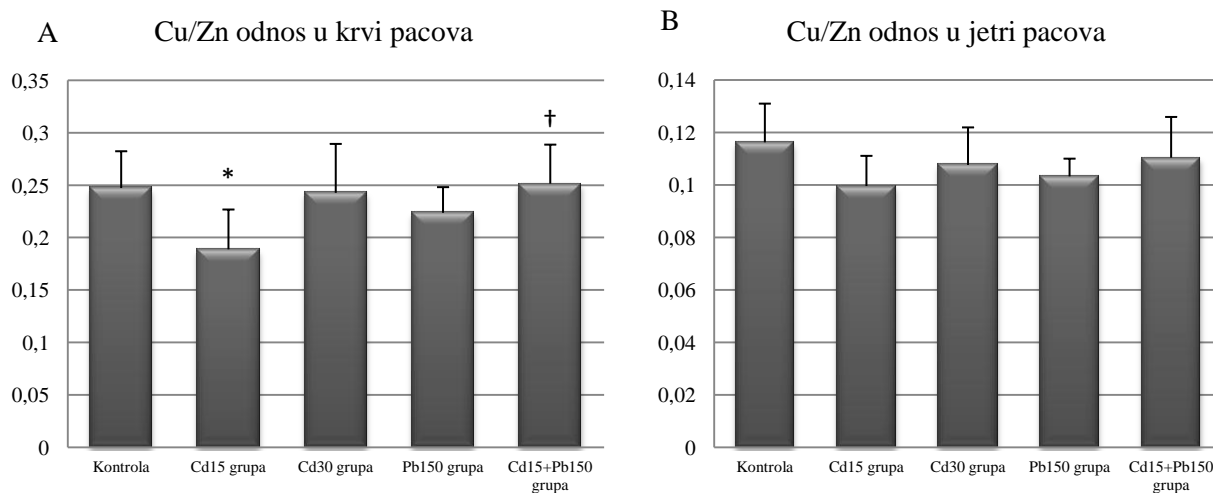


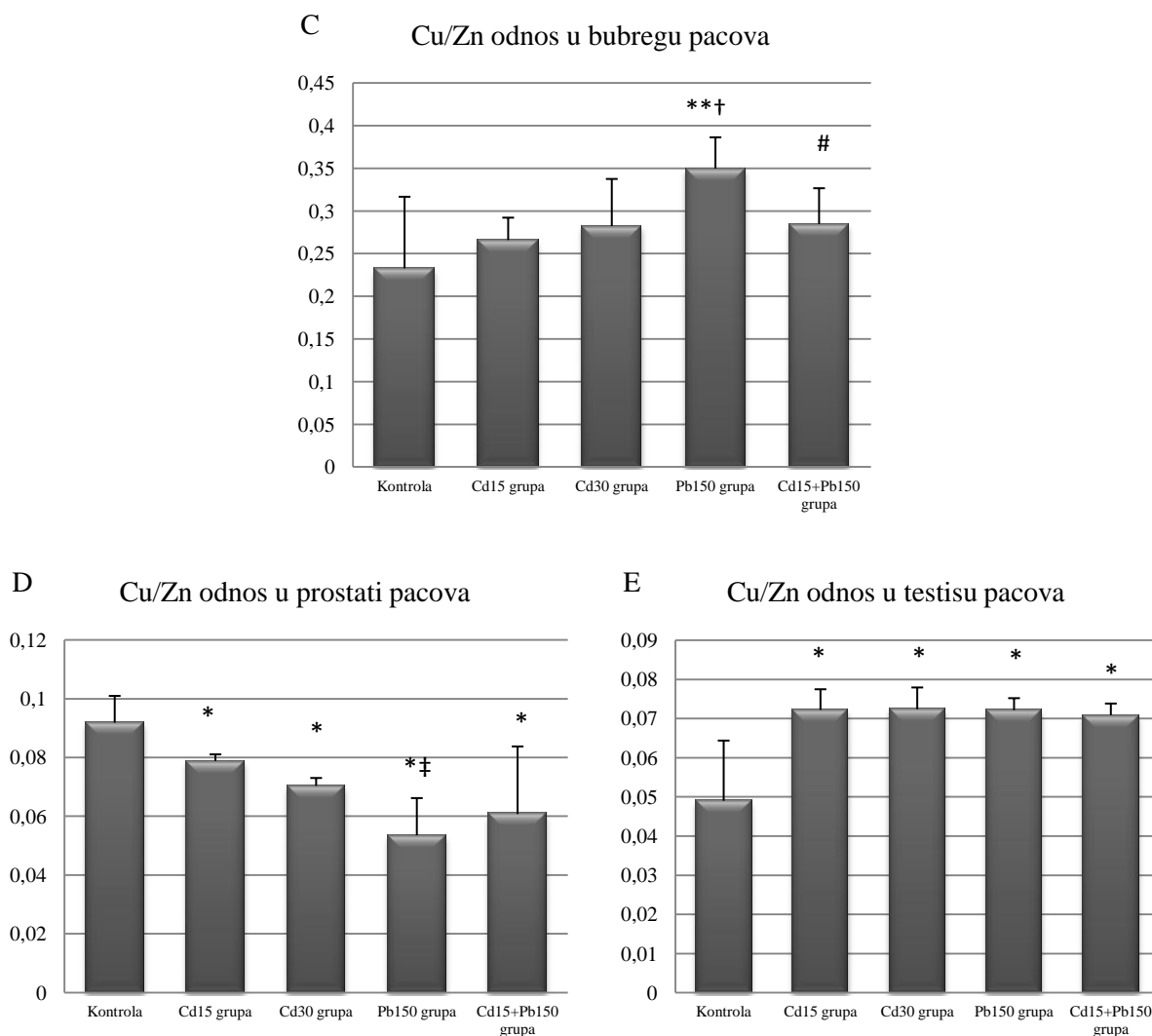


Slika 7. Koncentracije bakra (A) i cinka (B) u prostati i testisima pacova nakon akutne ekspozicije Cd i Pb

Koncentracija Cu izražena je u $\mu\text{mol Cu/kg}$. Koncentracija Zn izražena je u $\mu\text{mol Zn/kg}$. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Statistički značajne razlike ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, † u odnosu na Cd₁₅ grupu, ‡ u odnosu na Cd₃₀ grupu i # u odnosu na Pb₁₅₀ grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA praćena odgovarajućim post hoc testom. *†‡# $P < 0,05$; **†‡‡## $P < 0,01$; ***†††‡‡‡### $P < 0,001$.

Na Slici 8 prikazani su dobijeni Cu/Zn odnosi u krvi i ispitivanim organima pacova. Značajno niži Cu/Zn odnos u krvi pokazan je kod Cd₁₅ grupe u odnosu na kontrolnu grupu i Cd₁₅+Pb₁₅₀ grupu, dok promene Cu/Zn odnosa nije bilo u jetri pacova. Primena pojedinačne doze Pb značajno je izmenila Cu/Zn odnos u bubregu pacova. Naime, dobijen Cu/Zn odnos u bubregu Pb₁₅₀ grupe bio je značajno viši od vrednosti kontrolne grupe i Cd₁₅+Pb₁₅₀ grupe. U prostati pacova aplikaciju svih doznih režima pratilo je značajno sniženje Cu/Zn odnosa u odnosu na netretirane pacove, sa najizraženijem efektom sniženja nakon primene olova. Suprotno, ekspozicija toksičnim metalima je uticala na izmenu Cu/Zn odnos u tkivu testisa pacova u smislu povećanja u odnosu na kontrolu, dok između ispitivanih grupa razlika nije ostvorena.





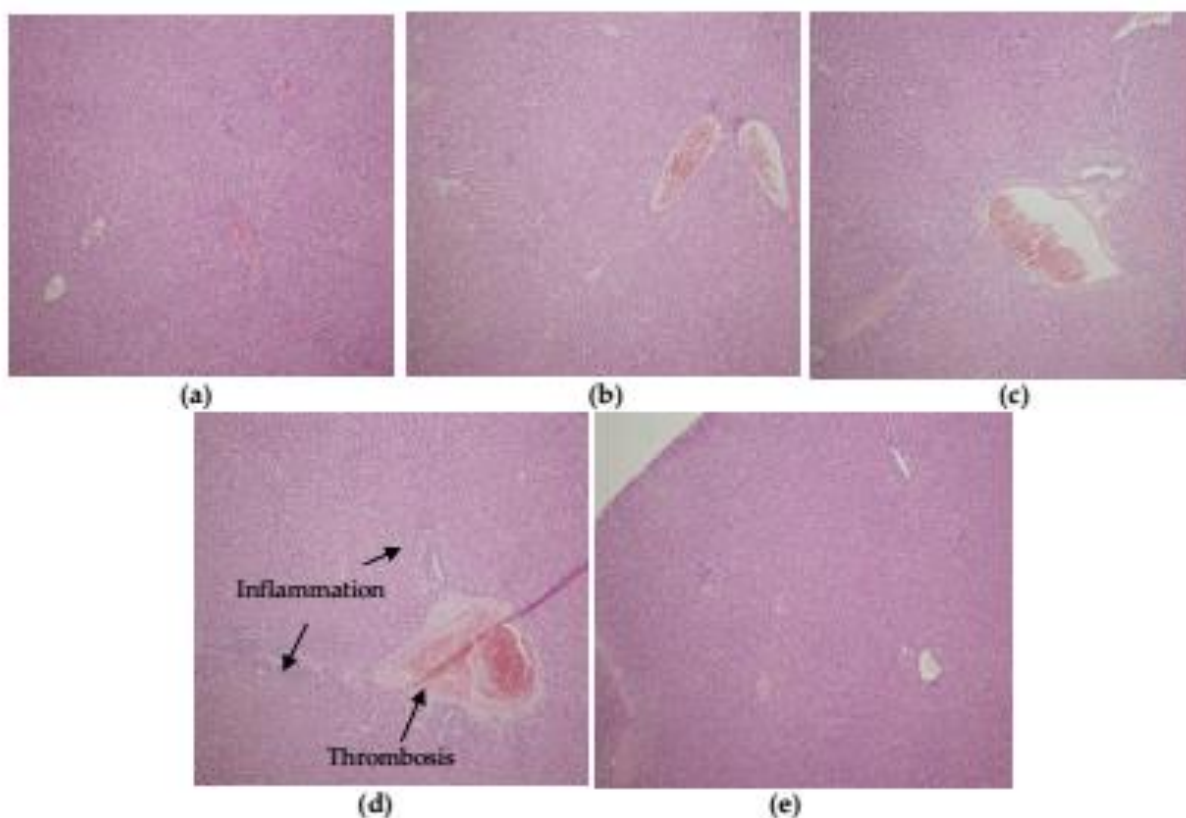
Slika 8. Cu/Zn odnosi u krvi (A), jetri (B), bubregu (C), prostati (D) i testisu (E) eksperimentalnih grupa pacova nakon akutne ekspozicije Cd i Pb

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Statistički značajne razlike ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, † u odnosu na Cd₁₅ grupu, ‡ u odnosu na Cd₃₀ grupu i # u odnosu na Pb₁₅₀ grupu. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA praćena odgovarajućim post hoc testom. *†‡# $P < 0,05$; **†‡‡‡## $P < 0,01$; ***††‡‡‡‡### $P < 0,001$.

4.1.6. Histopatološka analiza organa

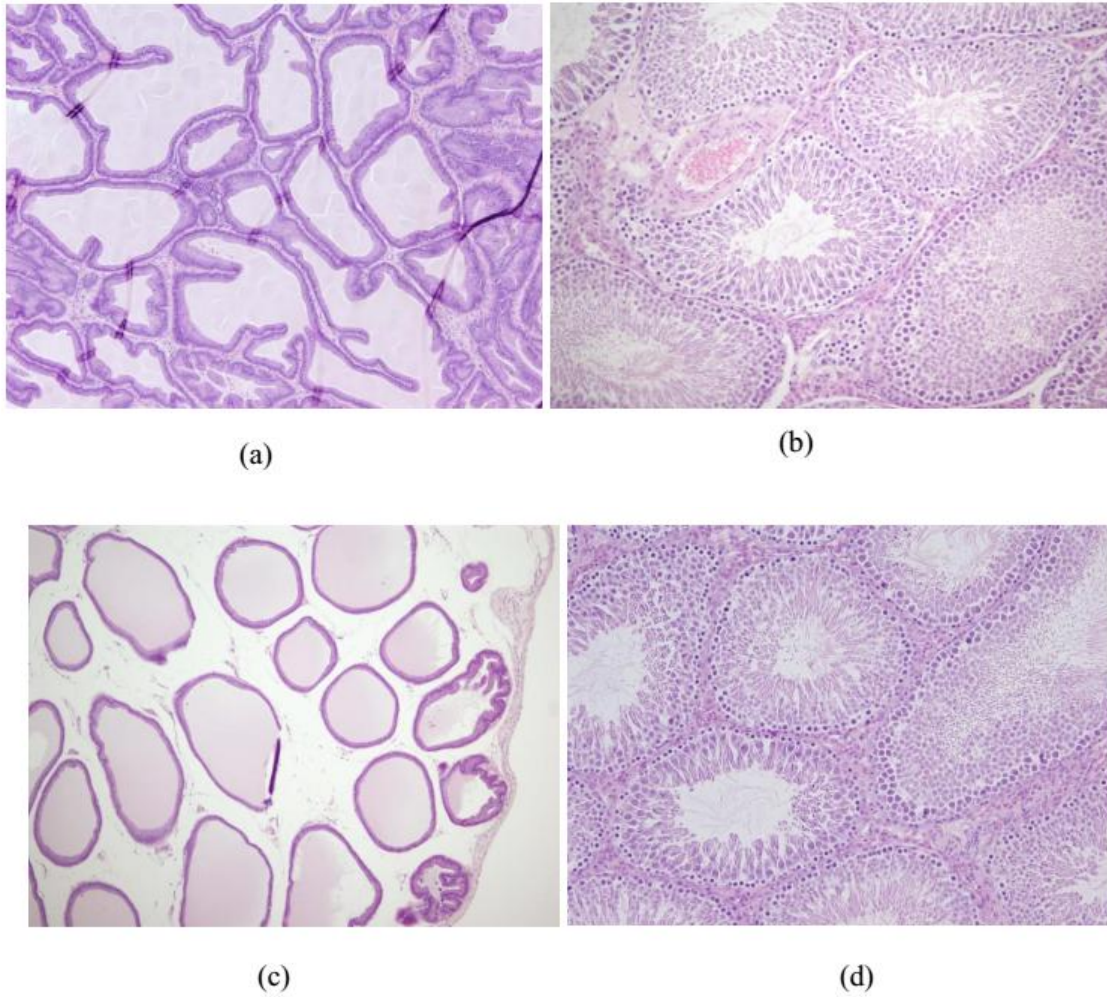
Histopatološka analiza jetre kontrolne grupe je normalne arhitekture (Slika 9a). Nakon aplikacije 15 mg Cd/kg t.m. histopatološkom analizom primećena je blaga infiltracija u portalnom prostoru sa blago dilatiranim sinusoidima (Slika 9b), dok je blaga do umerena dilatacija sinusoida sa infiltracijom leukocita u portalnim prostorima primećena u Cd₃₀ grupi (Slika 9c). Primenu pojedinačne doze Pb pratila je blaga dilatacija sinusoida sa infiltratom limfocita i neutrofila u portalnim prostorima, oko bilijarnog ductusa. Dodatno, sinusoidni prostor bio je ispunjen mononuklearima. U zoni 1 acinusa kondenzovani hromatin nukleusa je primećen kod Pb₁₅₀ grupe, dok je venska tromboza bila prisutna u

jednom od ispitivanih tkiva ove grupe pacova (Slika 9d). Kombinacija smeše Cd i Pb odlikovala se sličnim promenama kao kod Pb₁₅₀ grupe ali su one nakon primene smeše bile izraženije (Slika 9e). Histopatološka analiza bubrega kontrolne grupe je bila normalne arhitekture, dok je u svim tretiranim eksperimentalnim grupama primećena akutna pasivna hiperemija bez značajnih patoloških promena.



Slika 9. Efekat Cd i/ili Pb na mikrostrukturu jetre pacova; (a): kontrolna grupa; (b): Cd₁₅ grupa; (c): Cd₃₀ grupa; (d): Pb₁₅₀ grupa; (e): Cd₁₅+Pb₁₅₀ grupa

Akutna pasivna hiperemija lakog stepena uočena je nakon histopatološke analize prostate kod svih grupa pacova koje su primile pojedinačnu dozu metala, dok je kod eksperimentalne grupe koja je primila smešu Cd i Pb uočen izražen edem intersticijuma uz fokalnu atrofiju prostatičnog epitela vrlo lakog stepena. Akutna ekspozicija toksičnim metalima nije rezultovala značajnim histopatološkim promenama u ispitivanim uzorcima testisa pacova. Kod svih eksperimentalnih grupa uočena je samo akutna pasivna hiperemija lakog stepena.



Slika 10. Efekat Cd i/ili Pb na mikrostrukturu prostate i testisa pacova; (a): kontrolna grupa; (b): Cd₁₅ grupa; (c): Cd₃₀ grupa; (d): Pb₁₅₀ grupa; (e): Cd₁₅+Pb₁₅₀ grupa

4.2. Humana studija

4.2.1. Populacija žena sa karcinomom dojke

U ispitivanje je bilo uključeno 55 pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke prosečne starosti $61,2 \pm 12,2$ godina, dok je kontrolna grupa bila sastavljena od 41 zdrave žene koje su imale benigne promene dojke, prosečne starosti $39,5 \pm 10,8$ godina. Razlika u godinama starosti između ove dve kohorte je bila statistički značajna kako je pokazano *Student*-ovim *t* testom ($P < 0,001$). Značajna razlika pokazana je i u vrednostima ITM između ispitivanih grupa. Naime, ispitanice obolele od karcinoma imale su vrednost ITM $25,6 \text{ kg/m}^2$ (IQR 22,9-28,3) dok je kod zdravih žena iznosio $22,2 \text{ kg/m}^2$ (IQR 20,3-25,7) ($P < 0,01$).

U kontrolnoj grupi žena 39,0% je na pitanje o pušačkom statusu odgovorilo pozitivno. Prosečan broj godina pušenja u kategoriji aktivnih pušača iznosio je 15,0 (IQR 10,0-22,0) dok je prosečan broj cigareta 15 (IQR 10-20). Populacija obolelih žena sastavljena je od 32,7% ispitanica koje su se na pitanje pušačkog statusa izjasnile pozitivnim odgovorom (aktivni pušač). Prosečan broj godina pušenja u kategoriji aktivnih pušača iznosio je 30,0 (IQR 18,7-31,0) sa prosečnim brojem cigareta od 14 (IQR 9-20). Nije bilo značajne razlike u pušačkom statusu između ispitivanih grupa.

Na drugo pitanje o osnovnim životnim navikama, a koje se odnosilo na konzumiranje alkoholnih pića, 9,8% ispitanica kontrolne grupe je odgovorilo pozitivno, a 16,4% iz grupe obolelih žena. Većina ispitanica je konzument alkoholnih pića povremeno, učestalosti 1-2 puta nedeljno, ili jednom mesečno. Između ispitivanih grupa nije postojala značajna razlika po pitanju statusa konzumiranja alkoholnih pića.

Ispitivane grupe se nisu razlikovale prema incidenci karcinoma dojke u porodičnoj anamnezi. Naime, pozitivnu porodičnu anamnezu za karcinom dojke u grupi žena sa malignim promenama imala je 9,4%, a u kontrolnoj grupi 5,0% ispitanica. Dve ispitanice sa malignim promenama u porodičnoj anamnezi imale su prisutan karcinom debelog creva, bubrega i grla dok je ista vrsta karcinoma bila prisutna i u krugu porodica kod četiri žene iz kontrolne grupe. Po jedna ispitanica iz grupe obolelih je u svojoj prošlosti (10-20 godina unazad) imala karcinom mokraćne bešike i debelog creva dok je jedna ispitanica iz kontrolne grupe imala melanom.

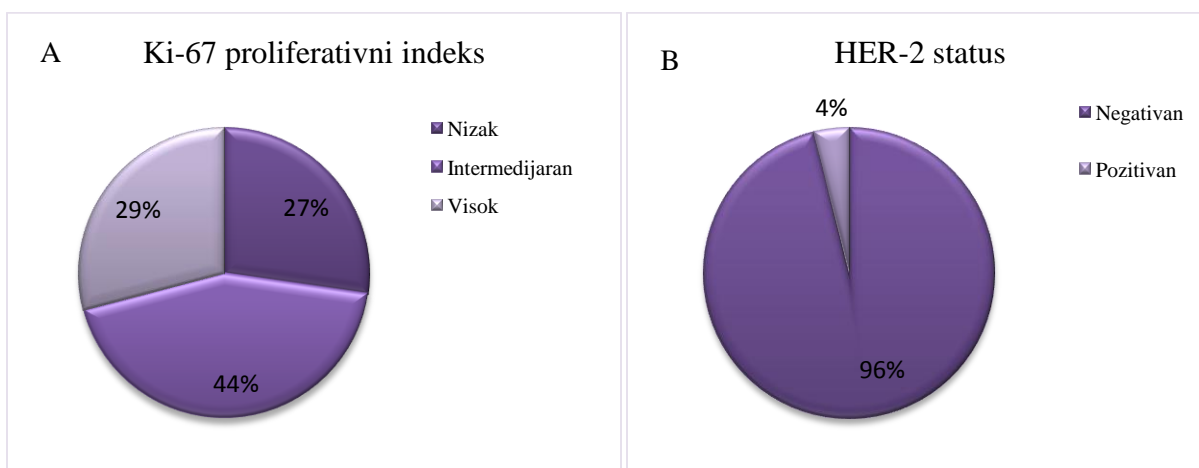
Osnova hormon-senzitivnosti karcinoma dojke je prisustvo receptora za estrogen i proteina regulisanih estrogenom (receptori za progesteron) [95]. U ispitivanoj grupi obolelih ER pozitivan karcinom dojke prisutan je bio kod 89,1% dok je 83,6% žena imalo pozitivan PR status. Negativan rezultat ER bio je prisutan kod šest (10,9%) dok je kod devet ispitanica (16,4%) rezultat za progesteron receptor bio negativan. Šest pacijentkinja sa negativnim statusom ER bile su istovremeno i PR negativne. Osnovne demografske i kliničke karakteristike žena učesnica studije prikazane su u Tabeli 8.

Tabela 8. Osnovne demografske i kliničke karakteristike žena učesnica studije

N = 96	Kontrolna grupa	Karcinom dojke	P
Starost, godine ¹⁾	39,5 ± 10,8	61,2 ± 12,2	<0,001
ITM, kg/m ² ²⁾	22,2 (20,3-25,7)	25,6 (22,9-28,3)	<0,01
Aktivan pušač, % ³⁾	39,0%	32,7%	0,732
Unos alkohola, % ³⁾	9,8%	16,4%	0,166
Pozitivna porodična anamneza, % ³⁾	5,0%	9,4%	0,257
Estrogen receptor (pozitivan/negativan) ³⁾	/	89,1%/10,9%	/
Progesteron receptor (pozitivan/negativan) ³⁾	/	83,6%/16,4%	/

¹⁾ Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ²⁾ Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. ³⁾ Kategorički podaci su prikazane kao apsolutne ili relativne frekvence. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov t test i Mann-Whitney U test. Kategoričke varijable analizirane su Chi-kvadrat (χ^2) testom.

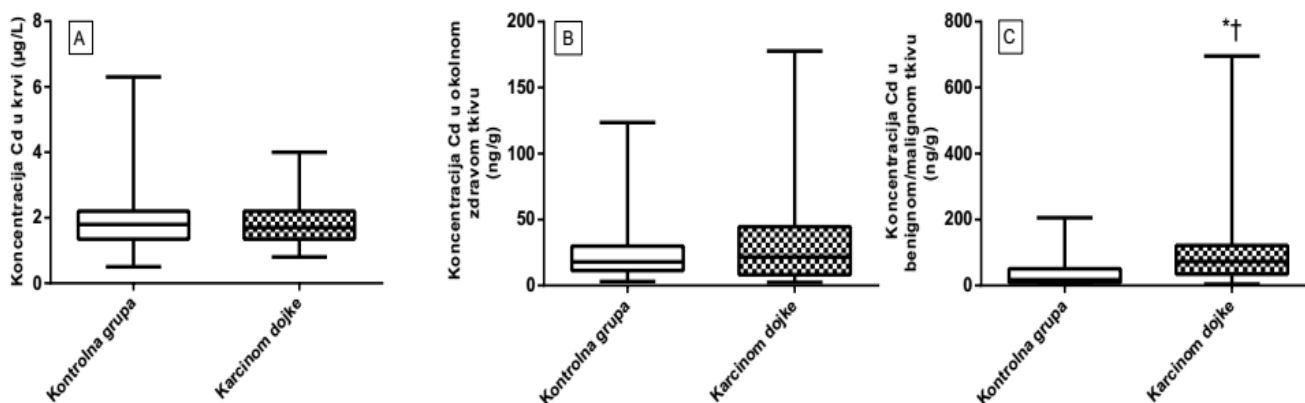
Kao pomoćni dijagnostički kriterijum pri odabiru terapije, pored klasifikacije statusa ER i PR, koriste se protein Ki-67, marker proliferacije i protein HER-2, prognostički marker za pojavu recidiva i preživljavanje ćelija karcinoma dojke [94]. U ovoj studiji 15 pacijentkinja je klasifikovano u kategoriju karcinoma dojke sa niskim Ki-67 proliferativnim indeksom, 24 u kategoriju sa intermedijarnim dok je visok Ki-67 proliferativni indeks bio prisutan kod 16 pacijentkinja (Slika 11A). HER-2 negativan status bio je prisutan kod 50 žena (Slika 11B).



Slika 11. Frekvencija ispitanica na osnovu Ki-67 proliferativnog indeksa (A) i HER-2 statusa (B)

4.2.1.1. Kadmijum i olovo u krvi i tkivima

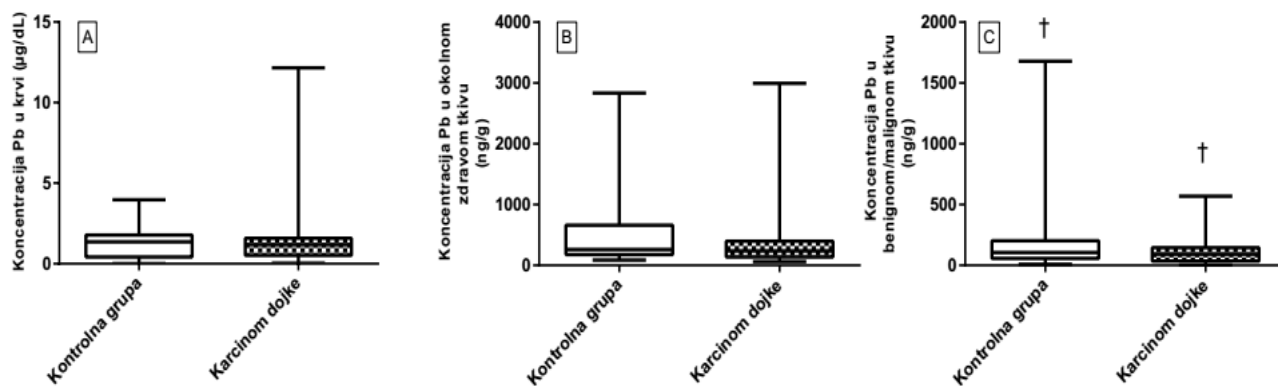
Koncentracija Cd izmerena u krvi pacijentkinja sa karcinomom dojke nije se značajno razlikovala od zdravih žena. Kod pacijentkinja sa karcinomom dojke koncentracija Cd značajno je bila viša u tumorskom tkivu dojke u poređenju sa okolnim zdravim tkivom, što nije zapaženo kod kontrolne grupe. Takođe, koncentracija Cd u tumorskom tkivu bila je značajno viša i od koncentracije Cd u benignom tkivu kontrolne grupe ($P < 0,001$). Koncentracije Cd u tri kompartmenta (krv, okolno zdravo i tumorsko tkivo dojke) kod učesnica studije prikazane su na Slici 12.



Slika 12. Koncentracija kadmijuma u krvi (A), okolnom zdravom tkivu (B) i tkivu dojke sa benignom/malignom promenom (C)

Pravougaonici predstavljaju interkvartilni raspon (25-75th percentil), unutrašnja linija pravougaonika predstavlja medijanu a spoljašnje linije predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Statistički značajne razlike ($P < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, odnosno † u odnosu na okolno zdravo tkivo unutar grupe. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test.

Koncentracija Pb u krvi pacijentkinja sa karcinomom dojke nije se značajno razlikovala od zdravih žena. U obe ispitivane grupe, značajno viši nivoi Pb utvrđeni su u okolnim zdravim tkivima u odnosu na tkiva izmenjene strukture ($P < 0,001$). Naime, kod zdravih ispitanica koncentracija olova iznosila je 261,06 ng/g (IQR: 178,99-660,28) u okolnom zdravom tkivu, a u tkivu izmenjene strukture 106,32 ng/g (IQR: 57,92-202,91). Kod pacijentkinja sa karcinomom dojke koncentracija olova je iznosila 238,89 ng/g (IQR: 139,28-397,09) u okolnom zdravom tkivu, a u tumorskom tkivu 91,89 ng/g (IQR: 36,24-146,36). U skladu sa dobijenim rezultatima je i odsustvo značajne razlike između istih regiona (zdravo, odnosno izmenjeno tkivo) ispitivanih grupa. Koncentracije Pb u tri kompartenta (krv, okolno zdravo i tumorsko tkivo dojke) kod učesnica studije prikazane su na Slici 13.



Slika 13. Koncentracija olova u krvi (A), okolnom zdravom tkivu (B) i tkivu dojke sa benignom/malignom promenom (C)

Pravougaonici predstavljaju interkvartilni raspon (25-75th percentil), unutrašnja linija pravougaonika predstavlja medijanu a spoljašnje linije predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Statistički značajne razlike ($P < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, odnosno † u odnosu na okolno zdravo tkivo unutar grupe. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test.

Nakon klasifikacije žena po pušačkom statusu, u grupi žena sa negativnim pušačkim statusom koje su imale karcinom dojke značajno viša koncentracija Cd pokazana je u tumorskom tkivu dojke u odnosu na benigno tkivo kontrolne grupe ($P<0,001$) kao i u odnosu na okolno zdravo tkivo iste dojke ($P<0,001$). Sa druge strane, značajno više koncentracije Pb uočene su u okolnim zdravim tkivima u odnosu na tkiva izmenjene strukture obe ispitivane grupe ($P<0,001$), kod ispitanica koje su nepušači.

U grupi žena koje su imale pozitivan pušački status, a koje su imale karcinom dojke, značajno viša koncentracija Cd pokazana je u tumorskom tkivu u odnosu na benigno tkivo kontrolne grupe ($P<0,05$) kao i u odnosu na okolno zdravo tkivo iste dojke ($P<0,001$). Kao i kod žena nepušača, značajno više koncentracije Pb uočene su u okolnim zdravim tkivima u odnosu na tkiva izmenjene strukture obe ispitivane grupe pušača.

Upoređujući dobijene koncentracije toksičnih metala u tri kompartmenta kod žena različitog pušačkog statusa dobili smo nešto drugačije zaključke. Značajno viša koncentracija Pb u krvi pacijentkinja pozitivnog pušačkog statusa pokazana je u odnosu na pacijentkinje negativnog pušačkog statusa ($P<0,01$), dok razlika nije pokazana za nivo Cd u krvi. Potom, koncentracija Pb u okolnom zdravom tkivu pacijentkinja pozitivnog pušačkog statusa značajno je bila viša od koncentracije Pb okolnog zdravog tkiva pacijentkinja negativnog pušačkog statusa. Koncentracije Cd i Pb u tri kompartmenta žena nakon klasifikacije po pitanju pušačkog statusa prikazane su u Tabeli 9.

Tabela 9. Koncentracije kadmijuma i olova u krvi i tkivima dojke nakon klasifikacije po pušačkom statusu

Pušački status		Kontrolna grupa	Karcinom dojke
Negativan			
Cd	Krv, µg/L	1,60 (1,30-2,25)	1,70 (1,30-2,20)
	Okolno zdravo tkivo, ng/g	13,18 (8,98-27,07)	19,33 (5,84-48,31)
	Benigno/maligno tkivo, ng/g	13,97 (9,08-30,86)	59,00 (27,28-113,91)***†††
Pb	Krv, µg/dL	1,14 (0,29-1,75)	0,85 (0,34-1,35)
	Okolno zdravo tkivo, ng/g	288,58 (231,91-487,07)	211,45 (124,71-296,10)*
	Benigno/maligno tkivo, ng/g	78,14 (54,74-164,75)†††	74,69 (31,78-154,19)†††
Pozitivan			
Cd	Krv, µg/L	1,90 (1,50-2,20)	1,80 (1,62-2,47)
	Okolno zdravo tkivo, ng/g	24,52 (16,67-50,55)#	25,51 (12,38-45,06)
	Benigno/maligno tkivo, ng/g	30,98 (9,91-109,02)	102,81 (56,96-130,76)*†††
Pb	Krv, µg/dL	1,51 (0,44-1,85)	1,45 (0,81-3,75)##
	Okolno zdravo tkivo, ng/g	233,39 (141,81-1411,93)	378,42 (164,14-727,71)#
	Benigno/maligno tkivo, ng/g	113,43 (57,92-222,49)†	108,18 (75,28-146,28)†††

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu istog pušačkog statusa nose oznaku *, † u odnosu na okolno zdravo tkivo unutar grupa istog pušačkog statusa, odnosno # u odnosu na različiti pušački status (krv-krv, okolno zdravo-okolno zdravo, benigno/maligno-benigno/maligno).

Nakon klasifikacije pacijentkinja po hormonskoj senzitivnosti receptora, ispitanice pozitivnog statusa oba receptora imale su značajno više koncentracije Pb u krvi u odnosu na pacijentkinje sa negativnim statusom. Značajno viša koncentracija Cd u tumorskom tkivu pokazana je kod žena koje su imale pozitivan status estrogen receptora u odnosu na negativnu ekspresiju receptora. Koncentracije Cd i Pb u tri kompartmenta pacijentkinja nakon klasifikacije po hormonskoj senzitivnosti receptora prikazane su u Tabeli 10.

Tabela 10. Koncentracije kadmijuma i olova u krvi i tkivima dojke nakon klasifikacije pacijentkinja po hormonskoj senzitivnosti receptora

	Estrogen receptor		Progesteron receptor		
	Negativan	Pozitivan	Negativan	Pozitivan	
Cd	Krv, µg/L	1,65 (1,40-2,65)	1,70 (1,30-2,20)	1,90 (1,40-2,30)	1,70 (1,30-2,17)
	Okolno zdravo tkivo, ng/g	20,52 (5,88-44,66)	21,65 (9,06-45,50)	22,10 (8,77-61,96)	21,47 (8,15-44,09)
	Tumorsko tkivo, ng/g	35,21 (9,74-58,02)	80,50 (38,40-127,70)*	54,02 (22,99-99,65)	76,95 (34,70-127,40)
Pb	Krv, µg/dL	0,43 (0,27-0,74)	1,23 (0,62-1,66)*	0,51 (0,24-1,01)	1,24 (0,63-1,68)*
	Okolno zdravo tkivo, ng/g	231,0 (137,7-459,8)	239,2 (137,8-383,8)	272,9 (135,2-393,8)	234,9 (138,7-403,7)
	Tumorsko tkivo, ng/g	54,46 (5,72-124,3)	100,3 (45,8-154,2)	117,0 (21,2-149,1)	90,14 (36,4-148,4)

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test. Statistički značajne razlike u odnosu na negativan status receptora nose oznaku*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.2.1.2. Hematološki parametri

Nakon evaluacije osnovnih hematoloških parametara pacijentkinja sa karcinomom dojke nije bilo značajnih razlika u poređenju sa kontrolnom grupom među vrednostima ukupnog broja leukocita, eritrocita i trombocita, koncentracije hemoglobina, hematokritne vrednosti te izvedenih parametara eritrocitne loze (MCV, MCH, MCHC) (Tabela 11).

Tabela 11. Rezultati hematoloških parametara učesnica studije

	Kontrolna grupa	Karcinom dojke	P
WBC ($10^9/L$) ¹	6,45 ± 1,61	6,77 ± 1,76	0,370
Limfociti ($10^9/L$) ¹	2,09 ± 0,57	2,15 ± 0,67	0,669
Neutrofili ($10^9/L$) ¹	3,74 ± 1,40	4,02 ± 1,32	0,329
RBC ($10^{12}/L$) ²	4,44 (4,27-4,57)	4,42 (4,24-4,69)	0,490
HGB (g/L) ¹	132,1 ± 10,6	134,0 ± 10,1	0,375
HCT (L/L) ²	0,394 (0,373-0,412)	0,401 (0,389-0,419)	0,127
MCV (fL) ¹	89,46 ± 4,77	89,54 ± 3,51	0,930
MCH (pg) ¹	29,82 ± 2,07	29,68 ± 1,43	0,720
MCHC (g/L) ¹	333,1 ± 11,0	331,5 ± 8,6	0,459
PLT ($10^9/L$) ¹	265,4 ± 51,4	153,7 ± 63,3	0,338

¹ Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ² Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. WBC = leukociti; RBC = eritrociti; HGB = hemoglobin; HCT = hematokrit; MCV = prosečna zapremina eritrocita; MCH = prosečna količina hemoglobina u eritrocitu; MCHC = prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima; PLT = trombociti. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov t test i Mann-Whitney U test.

4.2.1.3. Osnovni biohemijski parametri i status polnih hormona

Od ispitivanih parametara lipidnog profila statistički značajna razlika pokazana je za vrednost triglicerida pri čemu je dobijena koncentracija bila značajno viša kod pacijentkinja ($P < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu. Značajno viša koncentracija uree pokazana je kod obolelih žena ($P < 0,001$) u

odnosu na zdrave. Takođe, aktivnosti alkalne fosfataze i laktat dehidrogenaze bile su značajno veće kod pacijentkinja sa karcinomom u odnosu na zdrave žene kao i vrednost C reaktivnog proteina ($P<0,05$, $P<0,001$, odnosno $P<0,01$). Između ostalih ispitivanih parametara razlika nije pokazana. Osnovni biohemijski parametri u populaciji žena prikazani su u Tabeli 12.

Tabela 12. Osnovni biohemijski parametri učesnica studije

	Kontrolna grupa	Karcinom dojke	P
GL (mmol/L) ²	5,22 (4,86-5,49)	5,31 (4,86-6,12)	0,194
HOL (mmol/L) ¹	5,46 ± 1,40	5,91 ± 1,34	0,113
TG (mmol/L) ²	1,02 (0,79-1,35)	1,66 (1,04-2,07)	<0,001
HDL (mmol/L) ¹	1,54 ± 0,31	1,49 ± 0,33	0,499
LDL (mmol/L) ¹	3,37 ± 1,07	3,63 ± 1,10	0,269
BU (mmol/L) ¹	4,17 ± 1,16	5,33 ± 1,57	<0,001
CRE (µmol/L) ²	66,1 (61,6-70,0)	68,9 (61,1-73,4)	0,381
TP (g/L) ¹	66,5 ± 4,0	65,6 ± 5,4	0,406
ALB (g/L) ¹	45,7 ± 2,4	44,5 ± 3,5	0,051
DB (µmol/L) ²	1,60 (1,20-1,92)	1,40 (1,10-1,80)	0,126
TB (µmol/L) ²	8,7 (7,1-11,0)	9,0 (7,2-9,7)	0,568
Fe (µmol/L) ¹	18,4 ± 7,5	17,6 ± 6,9	0,499
AST (U/L) ²	17 (15-19)	19 (16-21)	0,066
ALT (U/L) ²	7 (6-9)	9 (7-11)	0,051
ALP (U/L) ²	50 (42-61)	60 (50-73)	<0,05
LDH (U/L) ²	258 (229-277)	301 (275-323)	<0,001
CRP (mg/L) ²	0,75 (0,42-1,87)	1,30 (0,90-4,10)	<0,01

¹ Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ² Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Glukoza (GL), Holesterol (HOL), trigliceridi (TG), HDL (HDL holesterol), LDL (LDL holesterol), urea (BU), kreatinin (CRE), ukupni proteini (TP), albumin (ALB), bilirubin direktni (DB), bilirubin ukupan (TB), gvožđe (Fe), aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (ALP), laktat dehidrogenaza (LDH), C reaktivni protein (CRP). Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov t test i Mann-Whitney U test.

Nivoi humanih gonadotropina, FSH i LH, su bili značajno viši u krvi pacijentkinja sa karcinomom u odnosu na zdrave žene ($P<0,001$), a estradiola, glavnog polnog hormona kod žena, značajno niži kod obolelih žena ($P<0,001$). U skladu sa prikazanim rezultatima ispitivanih hormona su i dobijeni rezultati za preračunate indekse. Naime, značajno niži FEI indeks je pokazan kod pacijentkinja sa karcinomom ($P<0,001$) dok razlika nije bila značajna u vrednostima FTI indeksa u odnosu na zdrave žene. U Tabeli 13 su prikazani rezultati hormonskog statusa učesnica ispitivanja.

Tabela 13. Rezultati hormonskog statusa učesnica studije

	Kontrolna grupa	Karcinom dojke	P
FSH (mIU/mL)	8,8 (5,86-17,85)	79,7 (57,50-101,80)	<0,001
LH (IU/L)	7,1 (4,04-20,45)	22,9 (14,40-29,90)	<0,001
Estradiol (pg/mL)	54,5 (32,70-123,75)	9,0 (5,30-10,0)	<0,001
Testosteron (ng/mL)	0,18 (0,10-0,26)	0,17 (0,11-0,23)	0,844
SHBG (nmol/L)	82,6 (58,7-145,0)	75,0 (49,5-112,0)	0,099
FTI (%)	0,62 (0,41-0,98)	0,69 (0,41-1,34)	0,216
FEI (%)	282,9 (118,5-382,4)	43,1 (23,6-90,2)	<0,001

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. FTI - free testosterone index, FEI - free estradiol index. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test.

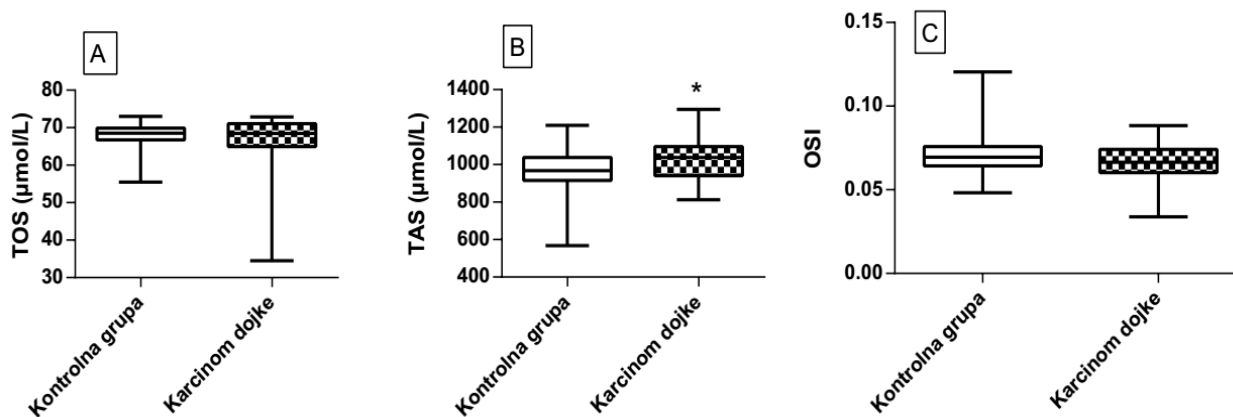
4.2.1.4. Parametri oksidativnog statusa

Pacijentkinje sa karcinomom dojke karakterisale su značajno više vrednosti AOPP, jednog od markera oksidativnog stresa, kao i viši nivoi totalnog antioksidativnog statusa, međutim TOS i OSI vrednosti, kao i ostali ispitivani parametri oksidativnog statusa, nisu se značajno razlikovali između obolelih i zdravih žena. U Tabeli 14 i na Slici 14 su prikazani rezultati ispitivanih parametara oksidativnog statusa u krvi učesnica studije.

Tabela 14. Parametri oksidativnog statusa u krvi učesnica studije

	Kontrolna grupa	Karcinom dojke	P
AOPP ($\mu\text{mol/L}$ ekvivalenata HloraminaT) ²⁾	30,0 (26,5-32,9)	32,7 (29,4-38,8)	<0,05
SHG mmol/L) ²⁾	0,272 (0,250-0,354)	0,279 (0,205-0,328)	0,336
PAB (HCU) ¹⁾	88,7 \pm 13,8	93,6 \pm 17,5	0,141
IMA (apsorbanca) ³⁾	27/41 (65,8%)	40/55 (72,7%)	0,112

¹⁾ Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. ²⁾ Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. ³⁾ Kategorički podaci su prikazane kao apsolutne ili relativne frekvence. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov t test i Mann-Whitney U test. Kategoričke varijable analizirane su Chi-kvadrat (χ^2) testom.



Slika 14. Totalni oksidativni status (TOS), totalni antioksidativni status (TAS) i vrednost OSI indeksa u krvi žena (redom A, B i C)

Pravougaonici predstavljaju interkvartilni raspon (25-75th percentil), unutrašnja linija pravougaonika predstavlja medijanu a spoljašnje linije predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Statistički značajne razlike ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.2.1.5. Bioelementi u krvi i tkivima

Koncentracije Cu i Zn u okolnom zdravom tkivu pacijentkinja sa karcinomom dojke bile su značajno niže u odnosu na isti region kontrolne grupe. Između ispitivanih grupa nije bilo značajne razlike u nivoima Cu, odnosno Zn u krvi, u tumorskom tkivu u odnosu na benigno tkivo, kao ni u odnosu na okolno zdravo tkivo. Koncentracije ispitivanih bioelemenata i Cu/Zn odnosi prikazani su u Tabeli 15.

Tabela 15. Koncentracije bakra i cinka u uzorcima krvi i tkivima dojke

Cu	Kontrolna grupa	Karcinom dojke	P
Krv (µmol/L)	6,85 (4,42-11,57)	7,67 (4,25-11,81)	0,544
Okolno zdravo tkivo (µmol/kg)	26,19 (10,04-51,02)	15,48 (3,36-31,27)*	<0,05
Benigno/maligno tkivo (µmol/kg)	17,36 (8,03-29,91)	19,79 (10,95-29,86)	0,369
Zn			
Krv (µmol/L)	73,92 (60,28-79,43)	76,83 (67,79-90,08)	0,075
Okolno zdravo tkivo (µmol/kg)	93,72 (36,55-162,45)	44,31 (25,82-75,74)*	<0,05
Benigno/maligno tkivo (µmol/kg)	69,02 (23,17-149,20)	51,29 (23,67-92,36)	0,218
Cu/Zn odnos			
Krv (µmol/L)	0,123 (0,054-0,172)	0,103 (0,061-0,159)	0,994
Okolno zdravo tkivo (µmol/kg)	0,331 (0,138-0,776)	0,260 (0,112-0,736)	0,461
Benigno/maligno tkivo (µmol/kg)	0,218 (0,103-0,614)	0,394 (0,161-1,217)	0,052

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, odnosno † u odnosu na okolno zdravo tkivo unutar grupe.

4.2.1.6. Korelaciona analiza između koncentracija Cd i Pb i analiziranih parametara

U ispitivanoj populaciji pacijentkinja sa karcinomom dojke (N=55) značajna pozitivna korelacija ostvarena je između nivoa Cd oba ispitivana humana gonadotropina (u krvi FSH $\rho=0,274$, $P<0,05$; LH $\rho=0,363$, $P<0,01$), kao i Cd u krvi i Cu u tumorskom tkivu ($\rho=0,283$, $P<0,05$).

Značajna pozitivna korelacija pokazana je između Cd u okolnom zdravom tkivu i tumorskom tkivu ($\rho=0,474$, $P<0,01$), a negativna između Cd u okolnom zdravom tkivu i Fe u krvi ($\rho=-0,313$, $P<0,05$). Pozitivna korelacija pokazana je i između Cd u okolnom zdravom tkivu i LH ($\rho=0,278$, $P<0,05$).

Kadmijum u tumorskom tkivu bio je u pozitivnoj korelaciji sa humanim gonadotropinima (FSH $\rho=0,320$, $P<0,05$; LH $\rho=0,311$, $P<0,05$). Rezultati *Spearman*-ove korelacione analize u kohorti pacijentkinja sa karcinomom dojke prikazani su u Tabeli 16.

Tabela 16. *Spearman*-ova korelaciona analiza između koncentracija Cd u krvi i tkivima i ispitivanih parametara u populaciji pacijentkinja sa karcinomom dojke

N=55	Cd u krvi	Cd u okolnom zdravom tkivu	Cd u tumorskom tkivu
Godine starost	0,002	0,091	0,056
ITM	0,103	-0,163	0,065
Cd u krvi	/	0,198	0,216
Cd u okolnom zdravom tkivu	0,198	/	0,474**
Cd u tumorskom tkivu	0,216	0,474**	/
HOL	0,067	0,159	-0,030
TG	0,258	0,092	0,194
HDL	-0,221	-0,160	-0,183
LDL	0,091	0,222	0,006
CRP	0,091	0,038	0,071
Fe	-0,014	-0,313*	-0,161
FSH	0,274*	0,253	0,320*
LH	0,363**	0,278*	0,311*
Estradiol	-0,197	-0,207	-0,219
Testosteron	-0,134	-0,137	-0,143
SHBG	0,030	0,160	0,050
TAS	0,121	0,083	0,209
TOS	-0,200	-0,148	-0,092
OSI	-0,115	-0,123	-0,215
PAB	0,186	0,251	0,141
PON-1	0,017	0,032	0,038
SHG	-0,037	-0,049	0,140
IMA	0,145	0,237	-0,117
AOPP	0,163	0,206	0,154
Cu u krvi	0,124	-0,127	0,027
Cu u okolnom zdravom tkivu	-0,100	0,190	0,169
Cu u tumorskom tkivu	0,283*	0,064	-0,087
Zn u krvi	0,216	0,138	0,017
Zn u okolnom zdravom tkivu	0,023	0,212	0,053
Zn u tumorskom tkivu	0,070	0,117	-0,071
Cu/Zn odnos u krvi	0,106	-0,121	0,140
Cu/Zn odnos u okolnom zdravom tkivu	-0,109	0,029	0,093
Cu/Zn odnos u tumorskom tkivu	0,118	-0,072	-0,021

Podaci su prikazani kao koeficijent korelacije ρ . * $P<0,05$; ** $P<0,01$

Značajna pozitivna korelacija u populaciji žena (N=96) ostvarena je između Cd u krvi i Cu u tkivu izmenjene strukture ($\rho=0,274$, $P<0,01$) te Cd u okolnom zdravom tkivu i tkivu izmenjene strukture ($\rho=0,502$, $P<0,01$). Takođe, pozitivna korelacija je pokazana između Cd u okolnom zdravom tkivu i oba humana gonadotropina (FSH $\rho=0,237$, $P<0,05$; LH $0,238$, $P<0,05$), Zn u okolnom zdravom i Zn u izmenjenom tkivu ($\rho=0,245$, $P<0,05$; $\rho=0,216$, $P<0,05$, redom).

Kadmijum u tkivu izmenjene strukture bio je pozitivnoj korelaciji sa godinama starosti ($\rho=0,483$, $P<0,01$), ITM ($\rho=0,241$, $P<0,05$), trigliceridima ($\rho=0,246$, $P<0,05$), CRP ($\rho=0,265$, $P<0,05$), FSH ($\rho=0,496$, $P<0,01$), LH ($\rho=0,358$, $P<0,01$), TAS ($\rho=0,322$, $P<0,01$), AOPP ($\rho=0,216$, $P<0,05$), a u negativnoj sa estradiolom ($\rho=-0,430$, $P<0,01$) i OSI indeksom ($\rho=-0,288$, $P<0,01$). Između ostalih ispitivanih parametara nije bilo značajnih korelacija. Rezultati *Spearman*-ove korelacione analize u populaciji žena prikazani su u Tabeli 17.

Tabela 17. *Spearman*-ova korelaciona analiza između koncentracija Cd u krvi i tkivima i ispitivanih parametara u populaciji žena

N=96	Cd u krvi	Cd u okolnom zdravom tkivu	Cd u izmenjenom tkivu
Godine starost	-0,029	0,172	0,483**
ITM	-0,012	-0,127	0,241*
Cd u krvi	/	0,138	0,154
Cd u okolnom zdravom tkivu	0,138	/	0,502**
Cd u izmenjenom tkivu	0,154	0,502**	/
HOL	0,064	0,088	0,093
TG	0,022	0,051	0,246*
HDL	-0,045	-0,174	-0,180
LDL	0,097	0,145	0,087
CRP	0,066	0,082	0,265**
Fe	0,134	-0,291**	-0,168
FSH	0,113	0,237*	0,496**
LH	0,154	0,238*	0,358**
Estradiol	-0,085	-0,170	-0,430**
Testosteron	-0,027	-0,067	-0,134
SHBG	0,031	0,095	-0,081
TAS	0,085	0,100	0,322**
TOS	-0,184	-0,060	-0,061
OSI	-0,100	-0,100	-0,288**
PAB	0,182	0,199	0,176
PON-1	-0,008	-0,030	-0,079
SHG	0,011	-0,144	-0,042
IMA	0,122	0,170	-0,077
AOPP	0,048	0,102	0,216*
Cu u krvi	0,005	-0,038	0,184
Cu u okolnom zdravom tkivu	-0,055	0,132	-0,017
Cu u izmenjenom tkivu	0,274**	0,077	-0,002
Zn u krvi	0,096	0,001	0,009
Zn u okolnom zdravom tkivu	0,010	0,245*	0,040
Zn u izmenjenom tkivu	-0,064	0,216*	0,028
Cu/Zn odnos u krvi	0,005	0,001	0,198
Cu/Zn odnos u okolnom zdravom tkivu	-0,060	-0,064	0,086
Cu/Zn odnos u izmenjenom tkivu	0,186	-0,100	0,006

Podaci su prikazani kao koeficijent korelacije ρ . * $P<0,05$; ** $P<0,01$

U populaciji pacijentkinja sa karcinomom dojke, značajna pozitivna korelacija pokazana je između Pb u krvi i Pb u tumorskom tkivu ($\rho=0,315$, $P<0,05$) te između Pb u krvi i Cu u okolnom zdravom tkivu ($\rho=0,285$, $P<0,05$). Pozitivna korelacija pokazana je između Pb u tumorskom tkivu i IMA ($\rho=0,380$, $P<0,01$) kao i Cu u okolnom zdravom tkivu ($\rho=0,297$, $P<0,05$), a negativna sa testosteronom ($\rho=-0,316$, $P<0,05$) (Tabela 18).

Tabela 18. Spearman-ova korelaciona analiza između koncentracija Pb u krvi i tkivima i ispitivanih parametara u populaciji pacijentkinja sa karcinomom dojke

N=55	Pb u krvi	Pb u okolnom zdravom tkivu	Pb u tumorskom tkivu
Godine starost	0,023	0,043	-0,153
ITM	0,029	0,227	-0,122
Pb u krvi	/	-0,085	0,315*
Pb u okolnom zdravom tkivu	-0,085	/	-0,224
Pb u tumorskom tkivu	0,315*	-0,224	/
HOL	-0,034	-0,250	0,242
TG	0,060	0,093	-0,049
HDL	-0,003	-0,256	0,143
LDL	-0,028	-0,157	0,264
CRP	-0,250	-0,015	-0,237
Fe	-0,031	0,014	-0,260
FSH	-0,068	-0,078	0,086
LH	-0,185	0,072	0,058
Estradiol	0,210	0,135	-0,057
Testosteron	-0,159	-0,032	-0,316*
SHBG	0,112	-0,089	0,066
TAS	0,144	0,037	0,133
TOS	0,096	0,081	-0,100
OSI	-0,090	0,027	-0,179
PAB	-0,092	0,034	0,171
PON-1	-0,035	0,055	0,063
SHG	0,168	-0,084	0,008
IMA	0,081	0,046	0,380**
AOPP	0,071	-0,003	0,123
Cu u krvi	-0,026	-0,072	-0,030
Cu u okolnom zdravom tkivu	0,285*	0,166	0,297*
Cu u tumorskom tkivu	-0,160	0,179	0,172
Zn u krvi	0,210	-0,008	-0,006
Zn u okolnom zdravom tkivu	0,053	0,182	0,178
Zn u tumorskom tkivu	-0,141	-0,040	-0,152
Cu/Zn odnos u krvi	0,026	0,011	0,030
Cu/Zn odnos u okolnom zdravom tkivu	0,197	-0,001	0,129
Cu/Zn odnos u tumorskom tkivu	-0,012	0,191	0,183

Podaci su prikazani kao koeficijent korelacije ρ . * $P<0,05$; ** $P<0,01$

U populaciji svih učesnica studije značajna pozitivna korelacija pokazana je između Pb u krvi i estradiola ($\rho=0,224$, $P<0,05$) kao i TOS nivoom u krvi ($\rho=0,267$, $P<0,01$). Pozitivna korelacija pokazana je i između Pb i Cu, odnosno Zn u okolnom zdravom tkivu ($\rho=0,296$, $P<0,01$ i $\rho=0,293$, $P<0,01$ redom).

Značajna pozitivna korelacija pokazana je i između Pb u tkivu izmenjene strukture sa IMA ($\rho=0,262$, $P<0,05$), Cu i Zn okolnog zdravog tkiva ($\rho=0,300$, $P<0,01$ i $\rho=0,217$, $P<0,05$ redom), a negativna sa testosteronom ($\rho=-0,235$, $P<0,05$). Rezultati Spearman-ove korelacione analize u populaciji žena prikazani su u Tabeli 19.

Tabela 19. Spearman-ova korelaciona analize između koncentracija Pb krvi i tkivima i ispitivanih parametara u populaciji žena

N=96	Pb u krvi	Pb u okolnom zdravom tkivu	Pb u izmenjenom tkivu
Godine starost	-0,037	-0,086	-0,104
ITM	0,010	0,076	-0,079
Pb u krvi	/	-0,178	0,193
Pb u okolnom zdravom tkivu	-0,178	/	-0,076
Pb u izmenjenom tkivu	0,194	-0,076	/
HOL	-0,145	-0,059	0,083
TG	0,013	0,043	-0,132
HDL	-0,138	-0,158	0,129
LDL	-0,128	0,005	0,102
CRP	-0,166	-0,072	-0,124
Fe	-0,087	0,097	-0,093
FSH	-0,184	-0,111	0,023
LH	-0,138	-0,021	-0,038
Estradiol	0,224*	0,137	0,044
Testosteron	-0,134	-0,106	-0,235*
SHBG	0,012	-0,072	0,053
TAS	0,060	0,012	0,084
TOS	0,267**	-0,047	-0,069
OSI	0,034	0,008	-0,089
PAB	-0,074	0,046	0,020
PON-1	-0,040	0,034	0,178
SHG	-0,046	0,006	0,019
IMA	0,118	-0,022	0,262*
AOPP	-0,031	0,073	0,061
Cu u krvi	0,012	-0,076	-0,053
Cu u okolnom zdravom tkivu	0,157	0,296**	0,300**
Cu u izmenjenom tkivu	-0,155	-0,024	0,073
Zn u krvi	-0,014	-0,016	-0,067
Zn u okolnom zdravom tkivu	0,155	0,293**	0,217*
Zn u izmenjenom tkivu	-0,011	-0,021	-0,122
Cu/Zn odnos u krvi	0,069	-0,037	-0,030
Cu/Zn odnos u okolnom zdravom tkivu	0,010	0,028	0,073
Cu/Zn odnos u izmenjenom tkivu	-0,078	-0,007	0,116

Podaci su prikazani kao koeficijent korelacije ρ . * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.2.1.7. Binarna logistička regresiona analiza

Varijable koje su nakon primene univarijantne logističke regresione analize imale značajan *odds ratio* su: godine starosti ($P < 0,001$), ITM ($P = 0,008$), koncentracija Cd u tkivu izmenjene strukture ($P = 0,001$), koncentracije FSH ($P < 0,001$), LH ($P = 0,007$) i estradiola u krvi ($P = 0,001$), TAS ($P = 0,013$), AOPP ($P = 0,031$) i koncentracija Zn u okolnom zdravom tkivu ($P = 0,028$). Ostali testirani parametri nisu pokazali značajan prediktivni potencijal. Vrednost *Nagelkerke* indeksa bila je najveća za prediktor godine starosti ($R^2 = 0,593$). Rezultati univarijantne logističke regresije u populaciji žena prikazani su u Tabeli 20.

Tabela 20. Prediktivna sposobnost ispitivanih parametara u odnosu na prisustvo karcinoma dojke

Prediktor	OR (95% CI)	P	Negjelkerke R²
Starost, godine	1,159 (1,095-1,227)	0,000	0,593
ITM, kg/m ²	1,164 (1,041-1,302)	0,008	0,120
Cd u krvi	1,111 (0,865-1,428)	0,410	0,016
Cd u okolnom zdravom tkivu	1,004 (0,991-1,018)	0,538	0,006
Cd u tkivu izmenjene strukture	1,017 (1,006-1,027)	0,001	0,183
Pb u krvi	1,105 (0,822-1,485)	0,507	0,007
Pb u okolnom zdravom tkivu	0,999 (0,999-1,000)	0,151	0,032
Pb u tkivu izmenjene strukture	0,998 (0,996-1,001)	0,239	0,027
FSH	1,040 (1,025-1,056)	0,000	0,482
LH	1,048 (1,013-1,085)	0,007	0,117
Estradiol	0,984 (0,974-0,993)	0,001	0,225
Testosteron	0,528 (0,008-36,99)	0,768	0,001
SHBG	0,991 (0,982-1,001)	0,064	0,052
TAS	1,005 (1,001-1,009)	0,013	0,100
TOS	0,995 (0,917-1,079)	0,898	0,000
PAB	1,020 (0,993-1,047)	0,143	0,031
PON-1	0,999 (0,998-1,000)	0,217	0,022
SHG	0,273 (0,010-7,686)	0,446	0,008
AOPP	1,065 (1,006-1,129)	0,031	0,073
Cu u krvi	1,014 (0,936-1,098)	0,738	0,002
Cu u okolnom zdravom tkivu	0,985 (0,970-1,000)	0,055	0,056
Cu u tkivu izmenjene strukture	1,012 (0,990-1,034)	0,301	0,017
Zn u krvi	1,018 (0,995-1,041)	0,123	0,036
Zn u okolnom zdravom tkivu	0,994 (0,989-0,999)	0,028	0,076
Zn u tkivu izmenjene strukture	0,996 (0,989-1,002)	0,208	0,066
Cu/Zn odnos u krvi	2,847 (0,144-55,38)	0,490	0,010
Cu/Zn odnos u okolnom zdravom tkivu	0,864 (0,470-1,590)	0,639	0,003
Cu/Zn odnos u tkivu izmenjene strukture	1,158 (0,819-1,637)	0,407	0,011

Unete varijable su predstavljene kao kontinuirani podaci. Primenjen je enter metod.

4.2.2. Populacija muškaraca sa karcinomom prostate

Populaciju muškaraca sa karcinomom prostate reprezentovao je 41 ispitanik prosečne starosti $65,6 \pm 7,5$ godina dok je kontrolna grupa bila sastavljena od 61 zdrave odrasle muške osobe prosečne starosti $42,3 \pm 12,8$ godina. Pacijenti oboleli od karcinoma prostate bili su značajno stariji od kontrolne grupe ($P < 0,001$) što je u skladu sa činjenicom da se bolest prevashodno javlja kod starijih osoba sa incidencijom 1:7 iznad šeste decenije života. Sa druge strane, vrednost indeksa telesne mase nije se razlikovala između ispitivanih grupa (kontrolna grupa ITM=28,7 kg/m²; IQR 25,3-30,4 vs. oboleli od karcinoma prostate ITM=26,8 kg/m²; IQR 24,9-28,2).

U kontrolnoj grupi sedamnaest zdravih ispitanika (27,8%) je imalo aktivni pušački status. Prosečan broj godina pušenja iznosio je 16,5 (IQR 7,50-22,00) sa prosečnim brojem cigareta na dnevnom nivou od 30 (IQR 24-40). Kod pacijenata sa karcinomom prostate 14,6% je pripadalo kategoriji aktivnih pušača. Prosečan broj godina pušenja iznosio je 25,0 (IQR 20,0-40,0), a prosečan broj cigareta na dnevnom nivou iznosio je 20 (IQR 15-50). Između ispitivanih grupa postojala je značajna razlika po pitanju pušačkog statusa..

U kontrolnoj grupi muškaraca pozitivan status konzumiranja alkoholnih pića imala je trećina ispitanika (19/61), a u grupi pacijenata 48,7%. Primenom *Chi*-kvadrat (χ^2) testa ova razlika nije bila statistički značajna.

Pozitivnu porodičnu anamnezu u kontrolnoj grupi muškaraca imao je samo jedan ispitanik, a u populaciji pacijenata sedam. Primenom *Chi*-kvadrat (χ^2) testa ova razlika je dostigla statističku značajnost.

Koncentracija tumor markera specifičnog za tkivo prostate, prostata specifičan antigen (PSA), izmerena u krvi obolelih (13,81 ng/mL) bila je 4 puta veća od vrednosti koja je prihvaćena za procenu niskog rizika obolevanja od karcinoma prostate (<3 ng/mL) [144]. Vrednost slobodne forme ovog tumor markera, (eng. *free prostate-specific antigen*, FPSA), iznosila je 1,36 ng/mL. U Tabeli 21 su prikazane osnovne demografske i kliničke karakteristike učesnika studije.

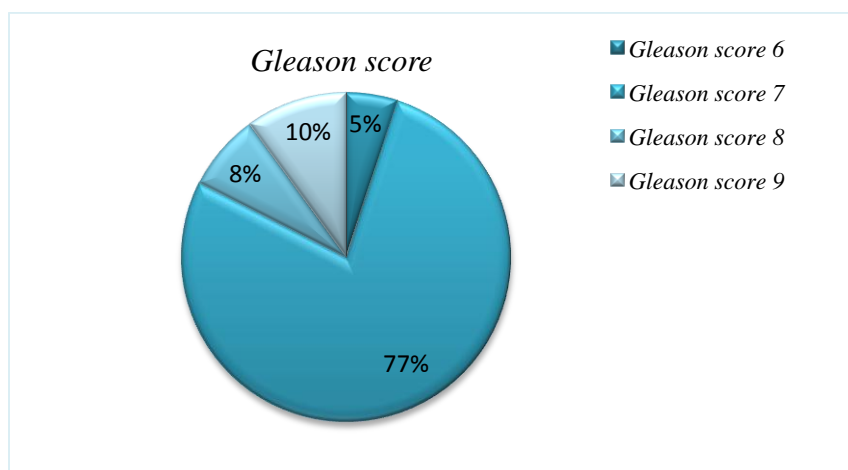
Tabela 21. Osnovne demografske i kliničke karakteristike muškaraca učesnika studije

	Kontrolna grupa	Karcinom prostate	P
Starost, godine ¹⁾	42,3 ± 12,8	65,6 ± 7,5	<0,001
ITM, kg/m ^{2,2)}	28,7 (25,3-30,4)	26,8 (24,9-28,2)	0,076
Aktivan pušač, % ³⁾	27,8%	14,6%	<0,05
Unos alkohola, % ³⁾	31,1%	48,7%	0,873
Pozitivna porodična anamneza, % ³⁾	1,6%	17,1%	<0,05
PSA, ng/mL ²⁾	/	13,81 (7,75-22,53)	/
FPSA, ng/mL ²⁾	/	1,36 (0,67-2,40)	/

¹⁾ Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ²⁾ Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. ³⁾ Kategorički podaci su prikazane kao apsolutne ili relativne frekvence. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov t test i Mann-Whitney U test. Kategoričke varijable analizirane su Chi-kvadrat (χ^2) testom.

Kao pokazatelj malignog potencijala i prognoze karcinoma prostate koriste se gradus sistemi karcinoma, među kojima najširu primenu ima tzv. *Gleason* sistem baziran na glandularnoj arhitekturi karcinoma. Prema Međunarodnom udruženju patologa u oblasti urologije (*The International Society of Urological Pathology*) *Gleason score* ≤ 6 pripada grupi nizak/veoma nizak rizik (dobro diferentovan), *Gleason score* 7 pripada intermedijarnom riziku (srednje diferentovan) dok *Gleason score* od 8 do 10

pripadaju grupi visok/veoma visok rizik (slabo diferentovan) [145]. U našoj populaciji pacijenata vrednost *Gleason score* 6 je prisutan kod 5% ispitanika, *Gleason score* 7 je imao najveću učestalost od 77%, *Gleason score* 8 je prisutan kod 8% dok je vrednost *Gleason score* 9 prisutna kod 10% pacijenata. U našoj ispitivanoj grupi nije bilo pacijenta sa vrednošću *Gleason score* 10. Na Slici 15 je prikazana učestalost *Gleason score* u populaciji obolelih.

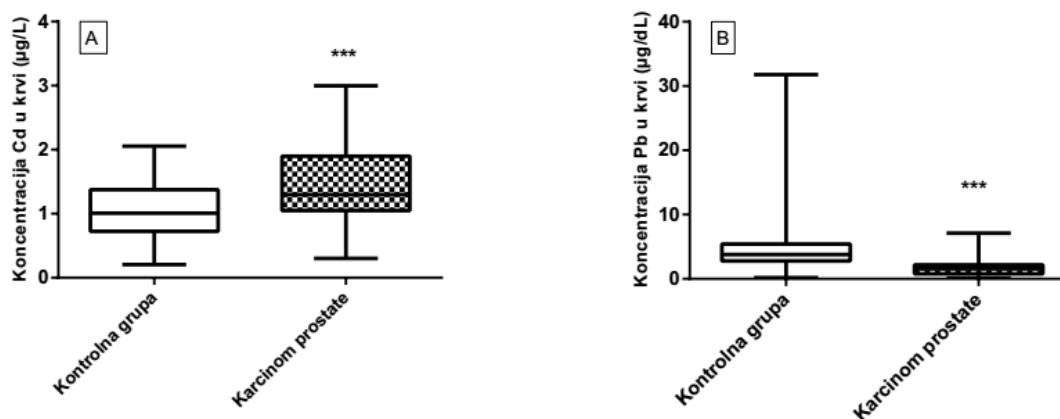


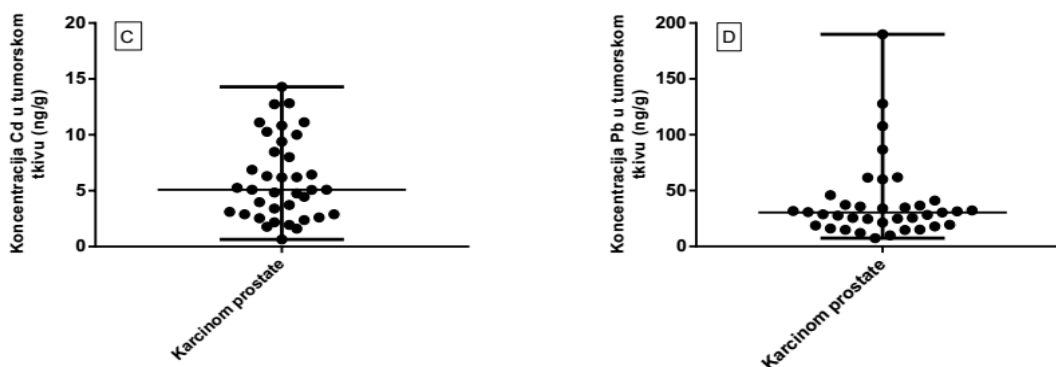
Slika 15. Vrednosti *Gleason score* u populaciji pacijenata sa karcinomom prostate

4.2.2.1. Kadmijum i olovo u krvi i tkivima

U populaciji muškaraca, koncentracija Cd u krvi pacijenata sa karcinomom prostate iznosila je 1,29 $\mu\text{g/L}$ (IQR: 1,01-1,87 $\mu\text{g/L}$) i bila je značajno viša ($P < 0,001$) u poređenju sa kontrolnom grupom 1,01 $\mu\text{g/L}$ (IQR: 0,72-1,37 $\mu\text{g/L}$). Sa druge strane, koncentracija Pb u krvi pacijenata (1,54 $\mu\text{g/dL}$, IQR: 0,76-2,16 $\mu\text{g/dL}$) bila je značajno niža od vrednosti kontrolne grupe (3,76 $\mu\text{g/dL}$, IQR: 2,77-5,40 $\mu\text{g/dL}$; $P < 0,001$) (Slika 16).

Prosečne koncentracije toksičnih metala izmerene u tumorskom tkivu prostate iznosile su 5,09 ng/g (IQR: 3,05-8,71 ng/g) za Cd i 29,56 ng/g (IQR: 19,22-38,24 ng/g) za Pb (Slika 16).





Slika 16. Koncentracije Cd i Pb u krvi (A i B) i tumorskom tkivu prostate (C i D)

Pravougaonici predstavljaju interkvartilni raspon (25-75th percentil), unutrašnja linija pravougaonika predstavlja medijanu a spoljašnje linije predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Scatter plot definiše medijanu koja je reprezentovana srednjom linijom grafika dok spoljašnje linije predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Statistički značajne razlike ($P < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku ***. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test.

Nakon klasifikacije ispitanika po pušačkom statusu, u populaciji pacijenata negativnog pušačkog statusa, značajno viša koncentracija Cd ($P < 0,01$), odnosno niža koncentracija Pb ($P < 0,001$), pokazana je u krvi u odnosu na kontrolnu grupu muškaraca negativnog pušačkog statusa.

Populaciju pacijenata pozitivnog pušačkog statusa pratila je značajno viša koncentracija Cd u krvi ($P < 0,01$), dok razlika nije bila značajna za koncentraciju Pb, u odnosu na kontrolnu grupu muškaraca pozitivnog pušačkog statusa.

Sa druge strane, koncentracija Cd u krvi pacijenata pozitivnog pušačkog statusa je bila značajno viša od koncentracije Cd u krvi obolelih nepušača ($P < 0,05$) dok razlika nije pokazana za koncentraciju Pb u krvi između ove dve grupe.

Koncentracije Cd i Pb u tumorskom tkivu nisu se značajno razlikovale između pušača i nepušača. Koncentracije Cd i Pb u krvi i tumorskom tkivu pacijenata sa karcinomom prostate nakon klasifikacije po pušačkom statusu prikazane su u Tabeli 22.

Tabela 22. Koncentracije kadmijuma i olova u krvi i tkivu prostate pacijenata sa karcinomom prostate nakon klasifikacije po pušačkom statusu

Pušački status		Kontrolna grupa	Karcinom prostate
Negativan			
Cd	Krv, $\mu\text{g/L}$	0,96 (0,71-1,33)	1,27 (0,95-1,69)**
	Tumorsko tkivo, ng/g	/	4,80 (2,81-8,12)
Pb	Krv, $\mu\text{g/dL}$	3,46 (2,46-5,34)	1,54 (0,69-2,16)***
	Tumorsko tkivo, ng/g	/	31,07 (23,22-38,24)
Pozitivan			
Cd	Krv, $\mu\text{g/L}$	1,04 (0,73-1,47)	1,98 (1,69-2,19)**#
	Tumorsko tkivo, ng/g	/	8,15 (6,22-10,82)
Pb	Krv, $\mu\text{g/dL}$	3,85 (3,09-7,37)	3,02 (0,53-5,95)
	Tumorsko tkivo, ng/g	/	14,86 (9,32-19,76)

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu istog pušačkog statusa nose oznaku *, odnosno # u odnosu na različiti pušački status.

4.2.2.2. Hematološki parametri

Značajno niže vrednosti ukupnog broja eritrocita, koncentracije hemoglobina kao i hematokritne vrednosti uočene su kod pacijenata sa karcinomom prostate u odnosu na zdrave muškarce ($P<0,01$, $P<0,001$, odnosno $P<0,001$) dok promene nije bilo u izvedenim parametrima eritrocitne loze (MCV, MCH i MCHC), kao ni u vrednostima ukupnog broja leukocita i trombocita (Tabela 23).

Tabela 23. Rezultati hematoloških parametara učesnika studije

	Kontrolna grupa	Karcinom prostate	P
WBC ($10^9/L$) ¹	7,17 ± 1,83	6,51 ± 1,75	0,071
Limfociti ($10^9/L$) ¹	2,58 ± 0,97	1,88 ± 0,52	<0,001
Neutrofili ($10^9/L$) ¹	3,92 ± 1,18	3,86 ± 1,37	0,828
RBC ($10^{12}/L$) ²	4,96 (4,76-5,24)	4,70 (4,36-5,09)	<0,01
HGB (g/L) ¹	155,8 ± 10,8	144,6 ± 16,1	<0,001
HCT (L/L) ²	0,444 (0,429-0,467)	0,416 (0,393-0,449)	<0,001
MCV (fL) ¹	90,02 ± 3,62	88,77 ± 5,55	0,161
MCH (pg) ¹	31,07 ± 1,44	30,82 ± 1,18	0,155
MCHC (g/L) ¹	345,2 ± 8,6	347,1 ± 13,7	0,384
PLT ($10^9/L$) ¹	226,7 ± 41,4	226,8 ± 59,6	0,991

¹ Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ² Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. WBC = leukociti; RBC = eritrociti; HGB = hemoglobin; HCT = hematokrit; MCV = prosečna zapremina eritrocita; MCH = prosečna količina hemoglobina u eritrocitu; MCHC = prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima; PLT = trombociti. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov t test i Mann-Whitney U test.

4.2.2.3. Osnovni biohemijski parametri i status polnih hormona

Populaciju pacijenata sa karcinomom prostate pratila je značajno viša koncentracija glukoze i značajno niža koncentracija ukupnog holesterola u odnosu na zdrave. Dalje, značajno viša koncentracija ukupnog bilirubina ($P<0,01$), značajno niže koncentracije kreatinina ($P<0,001$), ukupnih proteina ($P<0,001$) i albumina ($P<0,001$) pratile su pacijente u odnosu na kontrolu. Potom, značajno niža aktivnost transaminaza ($P<0,01$ za AST i $P<0,001$ za ALT) i laktat dehidrogenaze ($P<0,001$) uočena je kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Značajno viša koncentracija FSH ($P<0,001$), odnosno niža estradiola ($P<0,01$) pokazana je kod pacijenata u odnosu na zdrave muškarce, dok razlika nije bila značajna za koncentracije LH i testosterona. Osnovni biohemijski parametri i hormonski status muškaraca prikazani su u Tabelama 24 i 25.

Tabela 24. Osnovni biokemijski parametri učesnika studije

	Kontrolna grupa	Karcinom prostate	P
GL (mmol/L) ²	5,60 (5,20-6,05)	5,80 (5,40-6,75)	<0,05
HOL (mmol/L) ¹	5,89 ± 1,27	5,38 ± 1,10	<0,05
TG (mmol/L) ²	1,96 (1,17-2,71)	1,57 (1,15-2,10)	0,166
HDL (mmol/L) ¹	1,15 ± 0,25	1,23 ± 0,26	0,149
LDL (mmol/L) ¹	3,68 ± 1,03	3,36 ± 0,87	0,103
BU (mmol/L) ¹	5,76 ± 1,74	6,11 ± 1,26	0,264
CRE (μmol/L) ²	93,6 (87,3-103,9)	82,0 (73,5-91,5)	<0,001
TP (g/L) ¹	74,6 ± 3,9	69,3 ± 9,3	<0,001
ALB (g/L) ¹	49,3 ± 3,2	41,4 ± 3,6	<0,001
DB (μmol/L) ²	2,30 (1,75-2,95)	2,65 (1,92-3,55)	0,169
TB (μmol/L) ²	12,4 (9,4-16,6)	14,8 (11,6-20,3)	<0,01
Fe (μmol/L) ¹	20,6 ± 5,7	19,1 ± 9,0	0,376
AST (U/L) ²	26 (22,5-31,0)	24 (19,0-27,5)	<0,01
ALT (U/L) ²	31 (25,5-44,0)	22 (16-27)	<0,001
ALP (U/L) ²	64 (56-77)	63 (55,0-73,5)	0,508
LDH (U/L) ²	355 (301-413)	303,5 (266,7-333,0)	<0,001
CRP (mg/L) ²	2,30 (1,90-3,50)	2,05 (0,67-3,57)	<0,05

¹ Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ² Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Glukoza (GL), Holesterol (HOL), trigliceridi (TG), HDL (HDL holesterol), LDL (LDL holesterol), urea (BU), kreatinin (CRE), ukupni proteini (TP), albumin (ALB), bilirubin direktni (DB), bilirubin ukupan (TB), gvožđe (Fe), aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (ALP), laktat dehidrogenaza (LDH), C reaktivni protein (CRP). Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov t test i Mann-Whitney U test.

Tabela 25. Rezultati hormonskog statusa učesnika studije

	Kontrolna grupa	Karcinom prostate	P
FSH (mIU/mL)	4,58 (3,42-7,59)	8,81 (5,59-13,77)	<0,001
LH (IU/L)	6,09 (4,32-8,81)	7,01(4,98-9,84)	0,192
Estradiol (pg/mL)	43,02 (34,98-51,41)	38,24 (27,61-44,84)	<0,01
Testosteron (ng/mL)	5,24 (3,95-6,79)	5,07 (3,83-6,60)	0,621

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test.

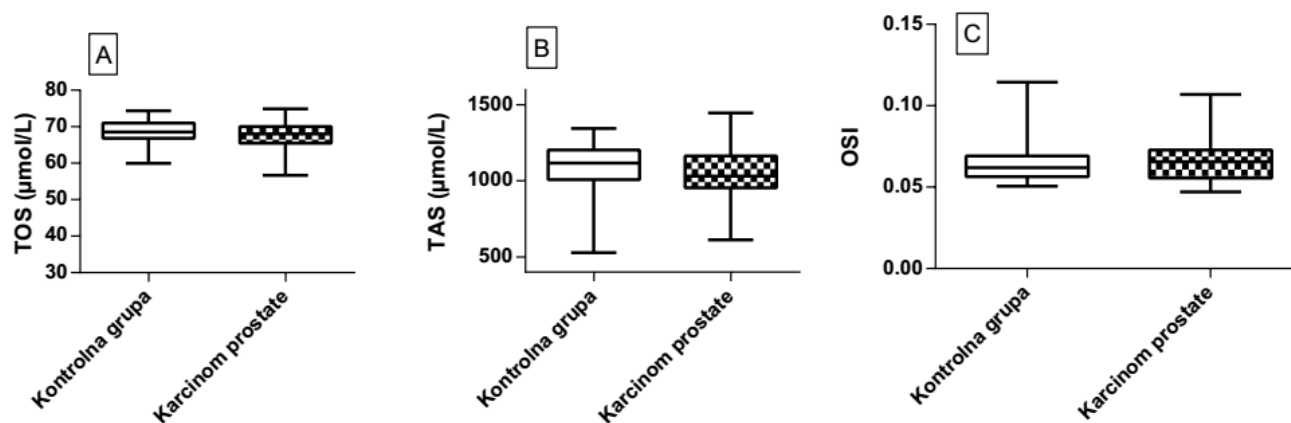
4.2.2.4. Parametri oksidativnog statusa

Značajno niže vrednosti AOPP i SHG utvrđene su u krvi pacijenata sa karcinomom prostate u odnosu na zdrave muškarce ($P < 0,001$). U slučaju ostalih ispitivanih parametara oksidativnog statusa nije bilo značajne razlike između pacijenata i kontrolne grupe. U Tabeli 26 i na Slici 17 prikazani su rezultati ispitivanih parametara oksidativnog statusa u krvi muškaraca učesnika studije.

Tabela 26. Parametri oksidativnog statusa u krvi učesnika studije

	Kontrolna grupa	Karcinom prostate	P
AOPP ($\mu\text{mol/L}$ ekvivalenata HloraminaT) ²⁾	42,0 (34,2-54,7)	24,8 (20,5-31,1)	<0,001
SHG (mmol/L) ²⁾	0,407 (0,324-0,551)	0,274 (0,224-0,392)	<0,001
PAB (HCU) ¹⁾	102,8 \pm 31,5	98,4 \pm 29,2	0,418
IMA (apsorbanca) ³⁾	22/61 (36,0%)	33/41 (80,5%)	0,138

¹⁾ Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. ²⁾ Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. ³⁾ Kategorički podaci su prikazane kao apsolutne ili relativne frekvence. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov t test i Mann-Whitney U test. Kategoričke varijable analizirane su Chi-kvadrat (χ^2) testom.



Slika 17. Totalni oksidativni status (TOS), totalni antioksidativni status (TAS) i vrednost OSI indeksa u krvi muškaraca (redom A, B i C)

Pravougaonici predstavljaju interkvartilni raspon (25-75th percentil), unutrašnja linija pravougaonika predstavlja medijanu a spoljašnje linije predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Statistički značajne razlike ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.2.2.5. Bioelementi u krvi i tkivima

Populaciju pacijenata sa karcinomom prostate karakterisale su značajno više koncentracije Cu u krvi u odnosu na zdrave muškarce ($P < 0,001$) dok se nivo Zn u krvi nije značajno razlikovao među ispitivanim grupama. U skladu sa prikazanim rezultatima, značajno viši Cu/Zn odnos utvrđen je u krvi pacijenata ($P < 0,001$) (Tabela 27).

Tabela 27. Koncentracije bakra i cinka u krvi i tumorskom tkivu prostate muškaraca učesnika studije

Cu	Kontrolna grupa	Karcinom prostate	P
Krv ($\mu\text{mol/L}$)	14,72 (8,74-22,01)	35,66 (25,66-40,74)	<0,001
Tumorsko tkivo ($\mu\text{mol/kg}$)	/	39,71(30,64-57,33)	/
Zn			
Krv ($\mu\text{mol/L}$)	81,80 (72,97-88,95)	82,07 (68,19-93,04)	0,827
Tumorsko tkivo ($\mu\text{mol/kg}$)	/	831,4 (569,4-1604,9)	/
Cu/Zn odnos			
Krv ($\mu\text{mol/L}$)	0,181 (0,119-0,270)	0,478 (0,307-0,526)	<0,001
Tumorsko tkivo ($\mu\text{mol/kg}$)	/	0,054 (0,018-0,089)	/

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test.

4.2.2.6. Korelaciona analiza između koncentracija Cd i Pb i analiziranih parametara

U ispitivanoj populaciji pacijenata sa karcinomom prostate značajna pozitivna korelacija pokazana je između Cd i estradiola u krvi ($\rho=0,339$, $P<0,05$), Cd u krvi i Zn u tumorskom tkivu ($\rho=0,344$, $P<0,05$), odnosno negativna između Cd u krvi i Cu u tumorskom tkivu ($\rho=-0,384$, $P<0,05$), Cd u krvi i Cu/Zn odnosa u tumorskom tkivu ($\rho=-0,523$, $P<0,01$) (Tabela 28).

Potom, u populaciji pacijenata, olovo u krvi je bilo u negativnoj korelaciji sa Cu u tumorskom tkivu ($\rho=-0,328$, $P<0,05$), Cu/Zn odnosom u krvi ($\rho=-0,344$, $P<0,05$) i Cu/Zn odnosom u tumorskom tkivu ($\rho=-0,350$, $P<0,05$). Takođe, negativna korelacija pokazana je i između Pb u tumorskom tkivu i Cu/Zn odnosa u krvi ($\rho=-0,352$, $P<0,05$) (Tabela 29).

Tabela 28. Spearman-ova korelaciona analiza između koncentracije Cd u krvi i tkivu i ispitivanih parametara u populaciji pacijenata sa karcinomom prostate

N=41	Cd u krvi	Cd u tumorskom tkivu
Godine starost	-0,209	0,079
ITM	-0,052	0,077
Cd u krvi	/	0,161
Cd u tumorskom tkivu	0,161	/
HOL	0,141	0,035
TG	0,081	-0,094
HDL	0,083	0,200
LDL	0,154	0,003
CRP	0,183	0,249
Fe	-0,176	-0,179
FSH	-0,105	-0,135
LH	-0,110	0,122
Estradiol	0,339*	-0,052
Testosteron	0,135	-0,099
TAS	0,018	-0,037
TOS	-0,144	0,018
OSI	-0,035	0,089
PAB	0,250	0,121
PON-1	0,060	-0,021
SHG	-0,072	-0,241
IMA	0,180	-0,162
AOPP	0,168	-0,063
Cu u krvi	-0,057	0,290
Cu u tumorskom tkivu	-0,384*	0,234
Zn u krvi	0,039	-0,191
Zn u tumorskom tkivu	0,344*	0,107
Cu/Zn odnos u krvi	-0,101	0,177
Cu/Zn odnos u tumorskom tkivu	-0,523**	0,082

Podaci su prikazani kao koeficijent korelacije ρ . * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Tabela 29. Spearman-ova korelaciona analiza između koncentracije Pb u krvi i tkivu i ispitivanih parametara u populaciji pacijenata sa karcinomom prostate

N=41	Pb u krvi	Pb u tumorskom tkivu
Godine starost	-0,117	0,104
ITM	-0,157	0,224
Pb u krvi	/	0,042
Pb u tumorskom tkivu	0,042	/
HOL	0,200	0,204
TG	0,012	0,059
HDL	0,028	-0,030
LDL	0,234	0,217
CRP	-0,103	-0,022
Fe	-0,338	0,111
FSH	-0,131	-0,073
LH	-0,121	-0,174
Estradiol	0,108	-0,144
Testosteron	0,012	0,080
TAS	-0,109	-0,082
TOS	-0,140	-0,149
OSI	0,000	0,015
PAB	0,089	0,122
PON-1	-0,045	0,044
SHG	-0,197	0,119
IMA	0,092	-0,012
AOPP	-0,167	0,107
Cu u krvi	-0,073	-0,245
Cu u tumorskom tkivu	-0,328*	-0,053
Zn u krvi	0,240	0,324
Zn u tumorskom tkivu	0,115	-0,162
Cu/Zn odnos u krvi	-0,344*	-0,352*
Cu/Zn odnos u tumorskom tkivu	-0,350*	0,041

Podaci su prikazani kao koeficijent korelacije ρ . * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

4.2.2.7. Binarna logistička regresiona analiza

Primenom univarijantne logističke regresije značajan prediktivni potencijal za predviđanje karcinoma prostate imali su sledeći parametri: godine starosti ($P < 0,001$), koncentracija Cd u krvi ($P < 0,001$), koncentracija Pb u krvi ($P < 0,001$), PON-1 aktivnost ($P < 0,001$), AOPP ($P < 0,001$) i koncentracija Cu u krvi ($P < 0,001$). Vrednost *Negelkerke* indeksa bila je najveća za prediktor Cu u krvi ($R^2 = 0,681$), za kojim sledi prediktor godine starosti ($R^2 = 0,651$). Za ostale testirane parametre nije postignut značajan prediktivni potencijal. Rezultati univarijantne logističke regresije u populaciji muškaraca prikazani su u Tabeli 30.

Tabela 30. Prediktivna sposobnost ispitivanih parametara u odnosu na prisustvo karcinoma prostate

Prediktor	OR (95% CI)	P	Nagelkerke R²
Starost, godine	1,170 (1,104-1,239)	<0,001	0,651
ITM, kg/m ²	0,907 (0,803-1,024)	0,115	0,037
Cd u krvi	1,183 (1,077-1,299)	<0,001	0,190
Pb u krvi	0,530 (0,390-0,720)	<0,001	0,347
FSH	1,036 (0,986-1,089)	0,163	0,029
LH	1,009 (0,926-1,099)	0,845	0,001
Estradiol	0,974 (0,941-1,007)	0,123	0,039
Testosteron	0,953 (0,778-1,166)	0,638	0,003
TAS	0,999 (0,996-1,001)	0,263	0,018
TOS	0,926 (0,823-1,043)	0,205	0,023
PAB	0,994 (0,981-1,008)	0,414	0,009
PON-1	1,013 (1,007-1,019)	<0,001	0,473
AOPP	0,832 (0,770-0,898)	<0,001	0,556
Cu u krvi	1,253 (1,149-1,366)	<0,001	0,681
Zn u krvi	0,999 (0,976-1,024)	0,966	0,000

Unete varijable su predstavljene kao kontinuirani podaci. Primenjen je enter metod.

4.2.3. Populacija muškaraca sa karcinomom testisa

Populacija pacijenata sa karcinomom testisa, prosečne starosti $35,8 \pm 8,7$ godina, sastavljena od 52 ispitanika, bila je značajno mlađa od kontrolne grupe ($42,3 \pm 12,8$ godina) koju je reprezentovao 61 zdrav muškarac. Ispitivane grupe se nisu razlikovale po vrednostima ITM, po pušačkom statusu kao ni unosu alkoholnih pića. U kontrolnoj grupi prosečan broj godina pušenja iznosio je 16,5 (IQR 7,50-22,00) sa prosečnim brojem cigareta na dnevnom nivou od 30 (IQR 24-40). Prosečan broj godina pušenja u kohorti pacijenata iznosio je 16,0 (IQR 6,75-19,25), a prosečan broj cigareta na dnevnom nivou 20 (IQR 19-22).

Kod pacijenata sa karcinomom testisa pozitivna porodična anamneza bila je prisutna kod 9,6% ispitanika dok u populaciji zdravih nije bilo pozitivnih slučajeva karcinoma testisa u najbližem krugu srodnika. Osnovne demografske i kliničke karakteristike muškaraca učesnika studije prikazane su u Tabeli 31.

Tabela 31. Osnovne demografske i kliničke karakteristike učesnika studije

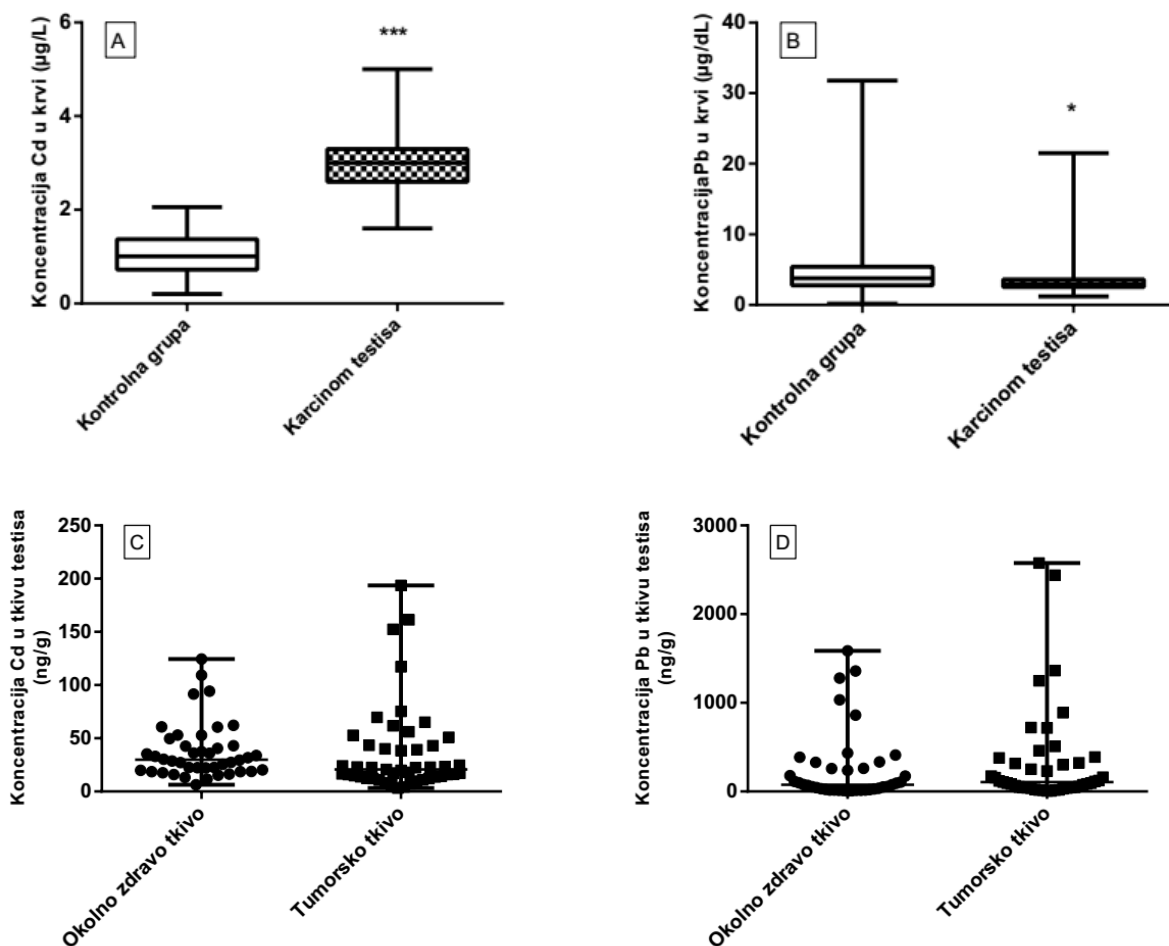
	Kontrolna grupa	Karcinom testisa	P
Starost, godine ¹⁾	$42,3 \pm 12,8$	$35,8 \pm 8,7$	<0,01
ITM, kg/m ² ²⁾	28,7 (25,3-30,4)	26,2 (24,4-28,7)	0,081
Aktivan pušač, % ³⁾	27,8%	17,4%	0,117
Unos alkohola, % ³⁾	31,1%	38,4%	0,873
Pozitivna porodična anamneza, % ³⁾	/	9,6%	/

¹⁾ Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. ²⁾ Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. ³⁾ Kategorički podaci su prikazane kao apsolutne ili relativne frekvence. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov t test i Mann-Whitney U test. Kategoričke varijable analizirane su Chi-kvadrat (χ^2) testom.

4.2.3.1. Kadmijum i olovo u krvi i tkivima

U populaciji pacijenata sa karcinomom testisa prosečna koncentracija Cd u krvi značajno je bila viša od kontrolne grupe (3,00 $\mu\text{g/L}$, IQR: 2,57-3,30 $\mu\text{g/L}$ vs. 1,01 $\mu\text{g/L}$, IQR: 0,72-1,37 $\mu\text{g/L}$, $P < 0,001$). Sa druge strane, koncentracija Pb u krvi pacijenata bila je značajno niža u odnosu na zdrave ispitanike (2,99 $\mu\text{g/dL}$, IQR: 2,54-3,61 $\mu\text{g/dL}$ vs 3,76 $\mu\text{g/dL}$, IQR: 2,77-5,40 $\mu\text{g/dL}$, $P < 0,05$) (Slika 18).

Prosečna koncentracija Cd izmerena u tumorskom tkivu testisa iznosila je 19,40 ng/g (IQR: 13,30-43,09 ng/g) i nije se značajno razlikovala od okolnog zdravog tkiva (29,05 ng/g IQR: 18,84-41,06 ng/g). Takođe, prosečna koncentracija Pb izmerena u tumorskom tkivu testisa (94,00 ng/g, IQR: 42,43-377,26 ng/g) nije se značajno razlikovala od prosečne koncentracije Pb okolnog zdravog tkiva (77,31 ng/g, IQR: 22,17-277,21 ng/g) (Slika 18).



Slika 18. Koncentracije Cd i Pb u krvi (A, B), okolnom zdravom i tumorskom tkivu testisa (C, D)

Pravougaonici predstavljaju interkvartilni raspon (25-75th percentil), unutrašnja linija pravougaonika predstavlja medijanu a spoljašne linije predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Scatter plot definiše medijanu koja je reprezentovana srednjom linijom grafika dok spoljašne linije predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test. Statistički značajne razlike ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, odnosno okolno zdravo tkivo †. *† $P < 0,05$; **†† $P < 0,01$; ***††† $P < 0,001$.

Nakon klasifikacije ispitanika po pušačkom statusu, pacijenti sa karcinomom testisa negativnog pušačkog statusa imali su značajno više koncentracije Cd u krvi u odnosu na zdrave nepušače ($P < 0,001$), dok razlika nije pokazana za koncentraciju Pb u krvi.

Značajno više koncentracije Cd u krvi pokazane su i kod pacijenata pozitivnog pušačkog statusa ($P < 0,001$), kao i niže koncentracije Pb ($P < 0,05$), u odnosu na kontrolnu grupu pušača.

Prosečne koncentracije Cd u tumorskom tkivu nisu su značajno razlikovale između pacijenata različitog pušačkog statusa, međutim koncentracija Pb je bila značajno niža u tumorskom tkivu pušača ($P < 0,05$) u odnosu na tumorsko tkivo nepušača.

Koncentracije Cd i Pb u krvi i tumorskom tkivu pacijenata sa karcinomom testisa nakon klasifikacije po pušačkom statusu prikazane su u Tabeli 32.

Tabela 32. Koncentracije kadmijuma i olova u krvi i tkivima testisa pacijenata sa karcinomom testisa nakon klasifikacije po pušačkom statusu

Pušački status		Kontrolna grupa	Karcinom testisa
Negativan			
Cd	Krv, µg/L	0,96 (0,71-1,33)	3,00 (2,40-3,10)***
	Okolno zdravo tkivo, ng/g	/	22,52 (18,58-33,95)
	Tumorsko tkivo, ng/g	/	17,78 (10,94-50,84)
Pb	Krv, µg/dL	3,46 (2,46-5,34)	2,98 (2,50-3,51)
	Okolno zdravo tkivo, ng/g	/	69,4 (31,1-327,7)
	Tumorsko tkivo, ng/g	/	114,4 (56,0-721,0)
Pozitivan			
Cd	Krv, µg/L	1,04 (0,73-1,47)	2,95 (2,65-3,30)***
	Okolno zdravo tkivo, ng/g	/	37,32 (25,50-53,09)
	Tumorsko tkivo, ng/g	/	17,36 (13,64-38,50)
Pb	Krv, µg/dL	3,85 (3,09-7,37)	3,01 (2,64-3,22)*
	Okolno zdravo tkivo, ng/g	/	27,98 (20,24-97,89)
	Tumorsko tkivo, ng/g	/	35,63 (18,18-93,08)#

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu istog pušačkog statusa nose oznaku *, † u odnosu na okolno zdravo tkivo unutar grupa istog pušačkog statusa, odnosno # u odnosu na različiti pušački status.

4.2.3.2. Hematološki parametri

Značajno niža vrednost limfocita u apsolutnom broju bez promena u ukupnom broju leukocita primećena je kod pacijenata sa karcinomom testisa ($P < 0,001$) u odnosu na zdrave ispitanike. Obolele su karakterisale i značajno niže vrednosti MCH ($P < 0,05$). Vrednosti ukupnog broja eritrocita i trombocita, koncentracija hemoglobina, hematokritna vrednost kao i izvedeni parametri eritrocitne loze (MCV, MCHC) nisu se značajno razlikovali između ispitivanih grupa (Tabela 33).

Tabela 33. Rezultati hematoloških parametara učesnika studije

	Kontrolna grupa	Karcinom testisa	P
WBC ($10^9/L$) ¹	7,17 ± 1,83	6,97 ± 2,19	0,435
Limfociti ($10^9/L$) ¹	2,58 ± 0,97	1,64 ± 0,61	<0,001
Neutrofili ($10^9/L$) ¹	3,92 ± 1,18	4,55 ± 2,02	0,193
RBC ($10^{12}/L$) ²	4,96 (4,76-5,24)	4,93 (4,66-5,36)	0,965
HGB (g/L) ¹	155,8 ± 10,8	148,8 ± 23,9	0,107
HCT (L/L) ²	0,444 (0,429-0,467)	0,450 (0,414-0,460)	0,280
MCV (fL) ¹	90,02 ± 3,62	88,64 ± 4,77	0,086
MCH (pg) ¹	31,07 ± 1,44	30,61 ± 2,01	<0,05
MCHC (g/L) ¹	345,2 ± 8,6	345,2 ± 14,4	0,985
PLT ($10^9/L$) ¹	226,7 ± 41,4	231,4 ± 54,2	0,610

¹ Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ² Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. WBC = leukociti; RBC = eritrociti; HGB = hemoglobin; HCT = hematokrit; MCV = prosečna zapremina eritrocita; MCH = prosečna količina hemoglobina u eritrocitu; MCHC = prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima; PLT = trombociti. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov t test i Mann-Whitney U test.

4.2.3.3. Osnovni biohemijski parametri i status polnih hormona

Kohortu pacijenata sa karcinomom testisa karakterisale su značajno niže koncentracije glukoze holesterola, triglicerida, a više HDL holesterola u odnosu na zdrave ispitanike. Potom, značajno niža koncentracija kreatinina i albumina, te niža ALT aktivnost pratile su pacijente u odnosu na kontrolu. Dalje, niže koncentracije estradiola i testosterona (redom $P < 0,001$ i $P < 0,05$) uočene su kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Osnovni biohemijski parametri i hormonski status muškaraca prikazani su u Tabelama 34 i 35.

Tabela 34. Osnovni biohemijski parametri učesnika studije

	Kontrolna grupa	Karcinom testisa	P
GL (mmol/L) ²	5,60 (5,20-6,05)	5,30 (4,97-5,60)	<0,05
HOL (mmol/L) ¹	5,89 ± 1,27	5,42 ± 1,17	<0,05
TG (mmol/L) ²	1,96 (1,17-2,71)	1,53 (0,95-2,07)	<0,05
HDL (mmol/L) ¹	1,15 ± 0,25	1,28 ± 0,24	<0,01
LDL (mmol/L) ¹	3,68 ± 1,03	3,37 ± 0,94	0,113
BU (mmol/L) ¹	5,76 ± 1,74	5,25 ± 1,10	0,090
CRE (μmol/L) ²	93,6 (87,3-103,9)	79,5 (74,7-88,0)	<0,001
TP (g/L) ¹	74,6 ± 3,9	72,9 ± 6,0	0,141
ALB (g/L) ¹	49,3 ± 3,2	45,8 ± 4,5	<0,001
DB (μmol/L) ²	2,30 (1,75-2,95)	2,70 (1,85-3,67)	0,223
TB (μmol/L) ²	12,4 (9,4-16,6)	16,1 (12,0-23,1)	<0,01
Fe (μmol/L) ¹	20,6 ± 5,7	18,5 ± 8,1	0,088
AST (U/L) ²	26 (22,5-31,0)	22 (20,5-27,5)	0,370
ALT (U/L) ²	31 (25,5-44,0)	22 (15,0-25,5)	<0,01
ALP (U/L) ²	64 (56-77)	67 (61,5-83,0)	0,305
LDH (U/L) ²	355 (301-413)	347 (311,5-388,5)	0,969
CRP (mg/L) ²	2,30 (1,90-3,50)	1,50 (0,60-2,75)	<0,001

¹ Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ² Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Glukoza (GL), Holesterol (HOL), trigliceridi (TG), HDL (HDL holesterol), LDL (LDL holesterol), urea (BU), kreatinin (CRE), ukupni proteini (TP), albumin (ALB), bilirubin direktni (DB), bilirubin ukupan (TB), gvožđe (Fe), aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (ALP), laktat dehidrogenaza (LDH), C reaktivni protein (CRP). Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov t test i Mann-Whitney U test.

Tabela 35. Rezultati hormonskog statusa učesnika studije

	Kontrolna grupa	Karcinom testisa	P
FSH (mIU/mL)	4,58 (3,42-7,59)	10,09 (2,79-27,67)	0,054
LH (IU/L)	6,09 (4,32-8,81)	5,73 (2,04-10,27)	0,523
Estradiol (pg/mL)	43,02 (34,98-51,41)	29,85 (23,55-41,04)	<0,001
Testosteron (ng/mL)	5,24 (3,95-6,79)	4,04 (2,54-5,41)	<0,05

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test.

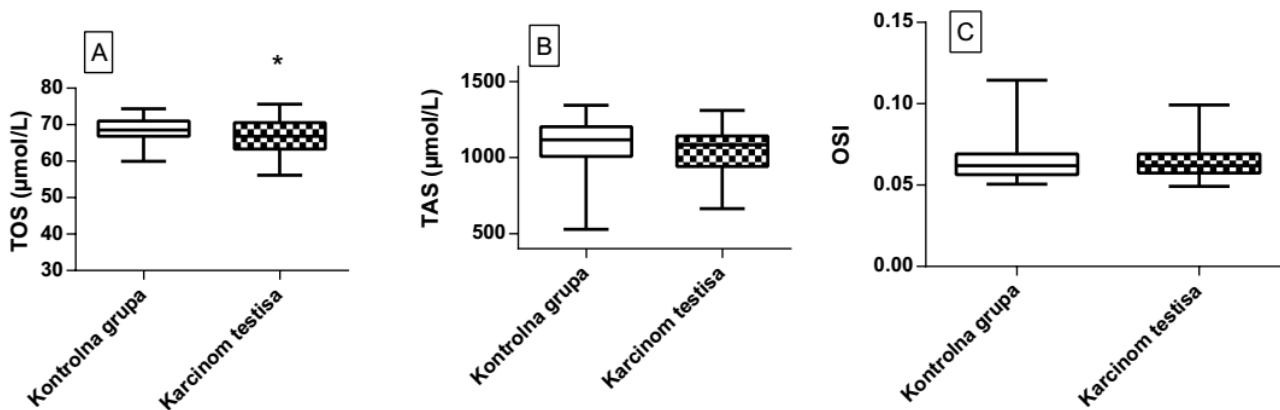
4.2.3.4. Parametri oksidativnog statusa

Značajno niža koncentracija AOPP ($P<0,001$) kao i značajno viša IMA vrednost ($P<0,01$) karakterisala je pacijente sa karcinomom testisa u odnosu na zdrave ispitanike. Pacijente su pratile i značajno niže vrednosti PAB i TOS dok su TAS nivoi bili u rangu kontrolne grupe. U Tabeli 36 i na Slici 19 su prikazani rezultati ispitivanih parametara oksidativnog statusa u krvi muškaraca učesnika studije.

Tabela 36. Parametri oksidativnog statusa u krvi učesnika studije

	Kontrolna grupa	Karcinom testisa	<i>P</i>
AOPP ($\mu\text{mol/L}$ ekvivalenata HloraminaT) ²⁾	42,0 (34,2-54,7)	26,4 (22,2-48,44)	<0,001
SHG (mmol/L) ²⁾	0,407 (0,324-0,551)	0,404 (0,322-0,521)	0,421
PAB (HCU) ¹⁾	102,8 \pm 31,5	87,28 \pm 31,3	<0,05
IMA (apsorbanca) ³⁾	22/61 (36,0%)	44/52 (84,6%)	<0,01

¹⁾ Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. ²⁾ Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. ³⁾ Kategorički podaci su prikazane kao apsolutne ili relativne frekvence. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćeni su Student-ov *t* test i Mann-Whitney *U* test. Kategoričke varijable analizirane su Chi-kvadrat (χ^2) testom.



Slika 19. Totalni oksidativni status (TOS), totalni antioksidativni status (TAS) i vrednost OSI indeksa u krvi muškaraca (redom A, B i C)

Pravougaonici predstavljaju interkvartilni raspon (25-75th percentil), unutrašnja linija pravougaonika predstavlja medijanu a spoljašnje linije predstavljaju najveću i najmanju vrednost. Statistički značajne razlike ($P<0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney *U* neparametarski test. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

4.2.3.5. Bioelementi u krvi i tkivima

Kod pacijenata sa karcinomom testisa koncentracija Cu u krvi bila je značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu ($P<0,001$), dok razlika nije bila značajna za koncentraciju Zn u krvi. Međutim, tumorsko tkivo karakterisala je značajno viša koncentracija Zn u odnosu na okolno zdravo tkivo ($P<0,01$). U skladu sa prikazanim rezultatima, Cu/Zn odnos u krvi pacijenata sa karcinomom testisa

značajno je niži od kontrolne ($P<0,001$). Takođe, Cu/Zn odnos tumorskog tkiva značajno se razlikovao od dobijenog Cu/Zn odnosa okolnog zdravog tkiva testisa ($P<0,001$). Koncentracije ispitivanih bioelemenata i Cu/Zn odnosi u krvi i tkivima prikazani su u Tabeli 37.

Tabela 37. Koncentracije bakra i cinka u krvi i tkivima testisa muškaraca učesnika studije

Cu	Kontrolna grupa	Karcinom testisa	P
Krv ($\mu\text{mol/L}$)	14,72 (8,74-22,01)	3,38 (1,73-5,82)***	<0,001
Okolno zdravo tkivo ($\mu\text{mol/kg}$)	/	59,24 (22,09-144,17)	/
Tumorsko tkivo ($\mu\text{mol/kg}$)	/	50,15 (19,84-117,54)	/
Zn			
Krv ($\mu\text{mol/L}$)	81,80 (72,97-88,95)	76,14 (69,95-92,20)	0,252
Okolno zdravo tkivo ($\mu\text{mol/kg}$)	/	97,20 (52,98-209,18)	/
Tumorsko tkivo ($\mu\text{mol/kg}$)	/	196,32 (111,92-253,38)††	/
Cu/Zn odnos			
Krv ($\mu\text{mol/L}$)	0,181 (0,119-0,270)	0,038 (0,021-0,095)***	<0,001
Okolno zdravo tkivo ($\mu\text{mol/kg}$)	/	0,340 (0,161-1,041)	/
Tumorsko tkivo ($\mu\text{mol/kg}$)	/	0,305 (0,144-0,460)†††	/

Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon. Za testiranje postojanja razlika između ispitivanih grupa korišćen je Mann-Whitney U neparametarski test. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu nose oznaku *, odnosno † u odnosu na okolno zdravo tkivo unutar grupe. *† $P<0,05$; **†† $P<0,01$; ***††† $P<0,001$

4.2.3.6. Korelaciona analiza između koncentracija Cd i Pb i analiziranih parametara

U populaciji pacijenata sa karcinomom testisa Cd u krvi je pozitivno korelirao sa Cu u krvi ($\rho=0,417$, $P<0,05$), Zn u okolnom zdravom tkivu ($\rho=0,381$, $P<0,05$) i Cu/Zn odnosom u krvi ($\rho=0,377$, $P<0,01$), a negativno sa AOPP ($\rho=-0,333$, $P<0,05$) i Cu/Zn odnosom u okolnom zdravom tkivu ($\rho=-0,347$, $P<0,05$).

Cd u okolnom zdravom tkivu bio je u pozitivnoj korelaciji sa godinama starosti ($\rho=0,430$, $P<0,01$), Cd u tumorskom tkivu ($\rho=0,541$, $P<0,01$), Cu u okolnom zdravom tkivu ($\rho=0,412$, $P<0,01$) i Cu/Zn odnosom u tumorskom tkivu ($\rho=0,333$, $P<0,05$), a u negativnoj korelaciji sa Zn u tumorskom tkivu ($\rho=-0,312$, $P<0,05$).

Pozitivna korelacija pokazana je između Cd u tumorskom tkivom sa TOS ($\rho=0,540$, $P<0,01$), OSI ($\rho=0,495$, $P<0,01$), SHG ($\rho=0,333$, $P<0,05$), Cu u tumorskom tkivu ($\rho=0,388$, $P<0,01$) i Cu/Zn odnosom u tumorskom tkivu ($\rho=0,432$, $P<0,01$) dok je negativna pokazana sa CRP ($\rho=-0,314$, $P<0,05$). Rezultati Spearman-ove korelacione analize u populaciji pacijenata sa karcinomom testisa prikazani su u Tabeli 38.

Tabela 38. Spearman-ova korelaciona analiza između koncentracija Cd u krvi i tkivima i ispitivanih parametara u populaciji pacijenata sa karcinomom testisa

N=52	Cd u krvi	Cd u okolnom zdravom tkivu	Cd u tumorskom tkivu
Godine starost	0,047	0,430**	0,194
ITM	0,034	-0,201	-0,051
Cd u krvi	/	0,092	0,096
Cd u okolnom zdravom tkivu	0,092	/	0,541**
Cd u tumorskom tkivu	0,096	0,541**	/
HOL	-0,262	-0,065	-0,208
TG	-0,114	0,301	0,064
HDL	-0,091	-0,277	-0,211
LDL	-0,201	-0,233	-0,284
CRP	-0,058	-0,016	-0,314*
Fe	-0,046	0,098	0,183
FSH	0,028	0,319	0,293
LH	-0,016	0,257	0,294
Estradiol	-0,171	-0,277	-0,165
Testosteron	-0,104	-0,217	-0,285
TAS	-0,172	-0,116	0,251
TOS	-0,028	0,157	0,540**
OSI	0,133	0,259	0,495**
PAB	-0,205	-0,044	0,000
PON-1	-0,056	-0,038	-0,243
SHG	-0,088	0,222	0,333*
IMA	0,100	0,120	0,290
AOPP	-0,333*	-0,081	-0,095
Cu u krvi	0,417*	0,261	0,151
Cu u okolnom zdravom tkivu	-0,122	0,412**	0,230
Cu u tumorskom tkivu	-0,145	0,206	0,388**
Zn u krvi	-0,045	-0,167	-0,073
Zn u okolnom zdravom tkivu	0,381*	0,135	0,093
Zn u tumorskom tkivu	-0,102	-0,312*	-0,277
Cu/Zn odnos u krvi	0,377**	0,199	0,136
Cu/Zn odnos u okolnom zdravom tkivu	-0,347*	0,092	0,032
Cu/Zn odnos u tumorskom tkivu	-0,106	0,333*	0,432**

Podaci su prikazani kao koeficijent korelacije ρ . * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

U istoj populacionoj grupi Pb u okolnom zdravom tkivu pozitivno je korelirao sa Pb u tumorskom tkivu ($\rho=0,389$, $P < 0,05$), Cu u krvi ($\rho=0,445$, $P < 0,01$), Cu u okolnom zdravom tkivu ($\rho=0,363$, $P < 0,05$) kao i Cu/Zn odnosom u krvi ($\rho=0,443$, $P < 0,01$).

Pozitivna korelacija Pb u tumorskom tkivu pokazana je sa Cu u okolnom zdravom tkivu ($\rho=0,344$, $P < 0,05$), Cu u tumorskom tkivu ($\rho=0,444$, $P < 0,01$), Zn u okolnom zdravom tkivu ($\rho=0,345$, $P < 0,05$) i Cu/Zn odnosom u tumorskom tkivu ($\rho=0,419$, $P < 0,01$), a negativna sa CRP ($\rho=-0,393$, $P < 0,05$). Rezultati Spearman-ove korelacione analize u populaciji pacijenata sa karcinomom testisa prikazani su u Tabeli 39.

Tabela 39. Spearman-ova korelaciona analiza između koncentracija Pb u krvi i tkivima i ispitivanih parametara u populaciji pacijenata sa karcinomom testisa

N=52	Pb u krvi	Pb u okolnom zdravom tkivu	Pb u tumorskom tkivu
Godine starost	0,115	-0,070	0,064
ITM	-0,128	-0,179	-0,113
Pb u krvi	/	-0,015	-0,040
Pb u okolnom zdravom tkivu	-0,015	/	0,389*
Pb u tumorskom tkivu	-0,040	0,389*	/
HOL	0,068	-0,138	-0,148
TG	-0,154	-0,039	-0,131
HDL	0,237	-0,165	0,027
LDL	0,129	-0,235	-0,188
CRP	0,152	0,123	-0,393*
Fe	-0,327	-0,131	0,260
FSH	0,142	-0,164	0,015
LH	0,098	-0,224	0,055
Estradiol	-0,005	0,020	-0,109
Testosteron	0,052	-0,131	-0,073
TAS	0,235	-0,073	-0,126
TOS	0,105	-0,137	0,179
OSI	-0,234	0,020	0,211
PAB	0,259	0,012	-0,198
PON-1	0,230	-0,141	0,086
SHG	-0,034	0,024	0,108
IMA	-0,184	0,110	0,098
AOPP	-0,119	-0,044	-0,055
Cu u krvi	0,017	0,445**	-0,028
Cu u okolnom zdravom tkivu	-0,142	0,363*	0,344*
Cu u tumorskom tkivu	-0,110	0,148	0,466**
Zn u krvi	-0,128	-0,285	-0,140
Zn u okolnom zdravom tkivu	-0,022	-0,262	0,345*
Zn u tumorskom tkivu	-0,051	0,131	-0,215
Cu/Zn odnos u krvi	0,057	0,443**	0,013
Cu/Zn odnos u okolnom zdravom tkivu	-0,147	0,157	0,066
Cu/Zn odnos u tumorskom tkivu	-0,177	0,235	0,419**

Podaci su prikazani kao koeficijent korelacije ρ . * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

4.2.3.7. Binarna logistička regresiona analiza

Primenom univarijantne logističke regresije značajan prediktivni potencijal za predviđanje karcinoma testisa imale su sledeće varijable: godine starosti ($P < 0,01$), koncentracija Cd u krvi, koncentracija FSH u krvi ($P < 0,05$), TOS ($P < 0,05$), PAB ($P < 0,05$), PON-1 aktivnost ($P < 0,001$), AOPP ($P < 0,001$) i koncentracija Cu u krvi ($P < 0,001$). Vrednost *Negelkerke* indeksa bila je najveća za prediktor Cd u krvi ($R^2 = 0,935$), za kojim slede prediktori PON-1 ($R^2 = 0,610$), Cu u krvi ($R^2 = 0,553$), AOPP ($R^2 = 0,316$), FSH ($R^2 = 0,125$) i godine starosti ($R^2 = 0,109$). Za ostale testirane parametre nije postignut značajan prediktivni potencijal. Rezultati univarijantne logističke regresije u populaciji muškaraca prikazani su u Tabeli 40.

Tabela 40. Prediktivna sposobnost ispitivanih parametara u odnosu na prisustvo karcinoma testisa

Prediktor	OR (95% CI)	P	Negelkerke R ²
Starost, godine	0,945 (0,909-0,983)	<0,01	0,109
ITM, kg/m ²	0,961 (0,880-1,049)	0,370	0,011
Cd u krvi	1,980 (1,370-2,826)	<0,001	0,935
Pb u krvi	0,927 (0,829-1,036)	0,181	0,028
FSH	1,047 (1,010-1,086)	<0,05	0,125
LH	1,025 (0,984-1,068)	0,236	0,024
Estradiol	0,987 (0,964-1,011)	0,295	0,018
Testosteron	0,880 (0,727-1,065)	0,189	0,026
TAS	0,998 (0,995-1,000)	0,101	0,036
TOS	0,892 (0,803-0,991)	<0,05	0,062
PAB	0,983 (0,970-0,996)	<0,05	0,083
PON-1	1,016 (1,009-1,023)	<0,001	0,610
SHG	0,415 (0,049-3,518)	0,420	0,008
AOPP	0,915 (0,879-0,953)	<0,001	0,316
Cu u krvi	0,749 (0,668-0,839)	<0,001	0,553
Zn u krvi	0,985 (0,967-1,004)	0,126	0,030

Unete varijable su predstavljene kao kontinuirani podaci. Primenjen je enter metod.

5. DISKUSIJA

5.1. Toksični efekti kadmijuma i olova nakon akutne oralne ekspozicije *Wistar* pacova

5.1.1. Efekat na hematopoezni sistem

Toksikokinetika metala zavisi od brojnih faktora, poput fizičko-hemijskih karakteristika metala, doze, puta unosa i dužine ekspozicije, kao i od sposobnosti metala da se vezuje za ćelijske strukture te individualnih karakteristika samog organizma. Nakon oralne administracije oba toksična metala, Cd i Pb, podležu apsorpciji, prelaze u krv, vezuju se za proteine plazme i distribuiraju kroz organizam. Osim transportne uloge, krv reflektuje skorašnju ekspoziciju toksičnim metalima a hematopoezni sistem predstavlja i potencijalno ciljno mesto toksičnog dejstva oba metala, primarno olova [10,78].

Značajno više koncentracije Cd u krvi u odnosu na netretirane pacove uočene su nakon akutne oralne gavaže *Wistar* pacova dvema različitim dozama Cd, međutim razlika između ova dva dozna režima nije zapažena. Odsustvo značajne razlike može se objasniti ograničenom apsorpcijom u gastrointestinalnom traktu, uzevši u obzir činjenicu da se apsorpcija Cd nakon oralne ekspozicije kreće u intervalu od 1,1 do 10,6%, potom potencijalnom zasićenju transportnih proteina u krvi kao i klirensu toksičnih metala [9]. Sa druge strane, nivo Cd u krvi eksperimentalne grupe koja je primila smešu metala bio je u rangi vrednosti kontrolne grupe, odnosno značajno niži od Cd₁₅ grupe, dok je nivo Pb bio značajno viši u odnosu na grupu koja je primala samo olovo. Moguće objašnjenje za ovu pojavu je potencijalna kompeticija pri apsorpciji na nivou gastrointestinalnog trakta kao i različit afinitet Cd i Pb za transportne proteine sa mogućim kompetitivnim antagonizmom [146,147]. Slična zapažanja uočena su u eksperimentalnom modelu realizovanom od strane *Masso* i sar. [148] u kojem su ženke *Wistar* pacova bile tretirane oralno smešom rastvora Cd i Pb (10 mg/L Cd i 300 mg/L Pb) od prvog dana začeca. Aplikacija smeše Cd i Pb dovela je do značajno niže koncentracije oba metala u krvi pacova u odnosu na eksperimentalne grupe koje su primale pojedinačnu dozu ovih metala, kako u nultom vremenu tako i nakon perioda laktacije od 21 dana, što je i navelo autore da iznesu hipotezu potencijalnog antagonizma na nivou apsorpcije u gastrointestinalnom traktu [148].

Rezultat ove disertacije jasno ukazuje da primena Cd (15 i 30 mg/kg t.m.) dovodi do apsolutne limfopenije koju je kod primene više doze pratila i leukopenija. Sličan efekat nakon akutne ekspozicije uočen je i u drugim studijama [149,150], kao i nakon izloženosti od 14 dana mužjaka BALB/c miševa [151] te nakon četvoronedeljne ekspozicije *Wistar* pacova CdCl₂ putem vode za piće [152,153]. Povećana destrukcija leukocita je moguće objašnjenje za leukopeniju u ovom eksperimentalnom modelu uzevši u obzir podatak da su nivoi Cd kako u slezini tako i u timusu životinja koje su bile tretirane pojedinačnim dozama Cd bile značajno viši i nakon akutne ekspozicije od netretiranih pacova. U prilog izraženijem efektu veće doze Cd (30 mg/kg t.m.) na ukupan broj leukocita kao i ostvarenu limfopeniju su i značajno više koncentracije Cd u slezini i jetri u odnosu na Cd₁₅ grupu. Slična zapažanja pokazana su u eksperimentalnom modelu *Lafuente* i sar. [154] sa mužjacima pacova koji su oralnim putem bili izloženi Cd u koncentraciji od 5 do 100 ppm putem vode za piće. Naime, nakon jednomesečne izloženosti značajno više koncentracije Cd u slezini i timusu tretiranih grupa bile su praćene smanjenim brojem B limfocita, dok su doze od 25 do 50 ppm značajno smanjile i ukupan broj CD4⁺ ćelija u slezini ukazujući na direktnu citotoksičnost kadmijuma [154]. Citotoksičan efekat Cd pokazan je i u *in vitro* studiji naše grupe autora [155]. Sa druge strane, literaturni podaci toksičnog efekta Pb na belu krvnu lozu su dvosmisleni, jer rezultati izvesnih studija ne ukazuju na promene u ukupnom broju leukocita i leukocitarnoj formuli [156,157], dok je kod drugih primećena leukocitoza

[158] ali i leukopenija [159]. Rezultat ove studije ukazao je na neutrofiliju u apsolutnom broju sa umerenom leukocitozom nakon primene smeše Cd i Pb u odnosu na kontrolnu grupu kao moguću posledicu oslobađanja neutrofila i njihove mobilizacije iz marginalnih neutrofilnih pulova usled prisustva inflamatornih citokina (IL-6 i TNF- α) [160,161].

Primenjen dozni režim kod svih eksperimentalnih grupa doveo je do značajnih promena u crvenoj lozi. Značajno niže vrednosti ukupnog broja eritrocita, hemoglobina i hematokritne vrednosti ostvarene su u svim tretiranim grupama, a najizraženiji efekat postignut je kod životinja izloženih smeši Cd i Pb što ukazuje na potencijalno aditivan toksičan efekat Cd i Pb. Prikazani rezultati su u skladu sa rezultatima drugih istraživača koji su takođe uočili sniženje parametara eritrocitne loze kod različitih animalnih modela, puteva ekspozicije kao i doznih režima [150–153,158,159,162]. Kako je u krvi eksperimentalnih grupa pacova pokazana značajno viša koncentracija toksičnih metala može se pretpostaviti da je uzrok značajno nižih vrednosti RBC, HGB i HCT u odnosu na kontrolnu grupu intravaskularna hemoliza. U skladu sa drugim studijama [152,153,156], akutna ekspozicija nije dovela do značajne promene veličine eritrocita, izražene preko MVC i indeksa anizocitoze (RDW), kao ni vrednosti MCHC, parametara koji su odraz hronične anemije nastale kao posledica produžene ekspozicije toksičnim metalima i koji reflektuju narušen proces hematopoeze. Rezultati ukupnog broja eritrocita i parametara eritrocitne loze ukazuju na činjenicu da oba toksična metala nakon akutne ekspozicije mogu dovesti do nastanka normocitne normohromne anemije. U osnovi uočene hemolizne anemije su generisanje slobodnih radikala sa jedne strane, te narušavanje antioksidativne zaštite organizma sa druge strane, kao potpora nastanka oksidativnog stresa, što je potvrđeno nakon akutne *i.p.* aplikacije 2 mg/kg t.m. CdCl₂ kod pacova [150]. Dodatno, dobro je poznata činjenica da se Pb u organizmu vezuje za sulfhidrilne grupe različitih enzima, i da posledično smanjuje aktivnost nekih od njih, poput superoksid dizmutaze i katalaze [18,20,163]. Takođe, Pb dovodi do značajnog porasta nivoa MDA i H₂O₂ u eritrocitima koja su često udružena sa redukovanjem nivoa glutaciona [157]. Pojava ranih znakova nastanka oksidativnog stresa nakon primene smeše Cd i Pb, demonstrirani su generisanjem porasta nivoa MDA u krvi, markera lipidne peroksidacije, koji je značajno bio veći u odnosu na grupe koje su primile pojedinačnu dozu metala, sa jedne strane, a sa druge, bio je u rangu MDA nivoa nakon primene 30 mg/kg t.m. kadmijuma. Osim lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina lipida ćelijskih membrana, toksični metali takođe mogu izazvati i oksidativna oštećenja proteina, izražena generisanjem AOPP [164]. Tako je primena smeše Cd i Pb dovela do značajno većih nivoa AOPP u odnosu na kontrolnu grupu, ali i u odnosu na pojedinačnu primenu Cd i Pb. Sagledano zajedno, rezultati nedvosmisleno ukazuju da primena smeše Cd i Pb ima daleko izraženiji toksičan efekat na ispitivane parametre oksidativnog statusa krvi, u odnosu na pojedinačne metale, a da je njihov zajednički efekat pre svega aditivan. Potom, totalni antioksidativni status, izražen kao suma antioksidativnih molekula [136], bio je značajno niži u krvi svih eksperimentalnih grupa, dok je TOS nivo, koji obuhvata i reaktivne vrste kiseonika poput vodonik-peroksida i lipidnih peroksida, bio značajno viši u krvi pacova nakon primene veće doze Cd (30 mg/kg t.m.) i nakon primene Pb (150 mg/kg t.m.), potvrđujući značajnu ulogu toksičnih metala u slabljenju antioksidativne zaštite organizma i generisanju nastanka slobodnih radikala iskazanih kroz promene TAS [165] i TOS nivoa [164].

Posmatrajući ukupan broj trombocita pacova, dobili smo nešto drugačija zapažanja. Dok je kod Cd₁₅ grupe nastupila trombocitoza, Cd₃₀ grupu karakterisala je trombocitopenija, u odnosu na kontrolnu grupu. Dostupni literaturni podaci su dvosmisleni, izvesne studije sa eksperimentalnim životinjama nakon akutne i subakutne ekspozicije nisu uočile promene u ukupnom broju trombocita [149,166], dok je kod drugih studija broj trombocita bio značajno niži nakon ekspozicije toksičnim metalima u odnosu na netretirane životinje [150,152,153]. Uočena trombocitoza nakon primene niže doze Cd može se opravdati inflamacijom, što je podržano i sniženjem ukupnog broja leukocita ove eksperimentalne grupe. Takođe, dobijen rezultat može biti i posledica tzv. reaktivne trombocitoze, koja je prolazna

pojava i vraća se u normalu nakon uklanjanja uzročnika, u našem slučaju toksičnog metala. Primena veće doze Cd kao i primena Pb kao pojedinačne supstance, odlikovala se trombocitopenijom, verovatno kao posledica direktnog toksičnog efekta visokih koncentracija Cd i Pb u slezini. Sa druge strane, veoma interesantno zapažanje uočeno je nakon tretmana smeše Cd i Pb koji je karakterisao antagonistički efekt Cd i Pb na ukupan broj trombocita, odnosno odlikovao se trombocitopenijom u odnosu na Cd₁₅ grupu, a trombocitozom u odnosu na Pb₁₅₀ grupu, te je broj trombocita bio u rangu kontrolne grupe. U prilog ovom rezultatu je i podatak o masi slezine pacova. Naime, prosečne mase slezine Cd₁₅ grupe i Pb₁₅₀ grupe bile su veće od kontrolne grupe, za razliku od Cd₁₅+Pb₁₅₀ grupe kod koje je bila u nivou kontrole. Promena u ukupnom broju PLT nakon primene smeše Cd i Pb nije zapažena ni u drugim studijama [156,167]. Prikazani rezultati ove studije nedvosmisleno ukazuju na potencijalan antagonizam Cd i Pb na ukupan broj trombocita nakon akutne ekspozicije pacova smeši toksičnih metala.

5.1.2. Efekat na jetru

Akutna oralna ekspozicija životinja Cd i/ili Pb izazvala je značajnu akumulacijom oba toksična metala u jetri pacova. U skladu sa primenjenim doznim režimom, dvostruka veća doza Cd dovela je i do dvostruko veće akumulacije Cd u jetri pacova u odnosu na nižu dozu Cd što je i očekivan rezultat nakon akutne oralne ekspozicije primarno zbog visokog sadržaja metalotioneina (MT) u jetri [4,10]. Metalotioneini su intracelularni proteini male molekulske mase bogati cisteinom, sa visokim afinitetom vezivanja za esencijalne i ne-esencijalne metale. Važnu ulogu imaju u održavanju homeostaze esencijalnih metala u organizmu, a dodatno, vezivanjem za toksične metale štite organizam od njihovog toksičnog dejstva s obzirom da metal-responsive transkripcioni faktor 1 (MTF-1), esencijalnu komponentu odgovornu za bazalnu ekspresiju i indukciju, aktiviraju metali, među kojima i Cd [168]. Koncentracija Cd u jetri eksperimentalne grupe koja je primila smešu Cd i Pb nije se značajno razlikovala od grupe koja je primila istu dozu Cd ali kao pojedinačnu supstancu, dok je koncentracija Pb bila trostruko veća nakon primene smeše u odnosu na Pb₁₅₀ grupu. Pri peroralnoj primeni, interakcija toksičnih metala pri apsorpciji, različita raspodela u krvi i tkivima, te značajna uloga DMT-1 za inter i intracelularni transport divalentnih metala [169], su neke od pretpostavki za uočenu distribuciju Cd i Pb u ovom eksperimentalnom modelu. Takođe, ova pojava se delom može pripisati i indukciji sinteze MT od strane Cd pri čemu novoformiranim Cd-MT kompleksima kao i povećanom sekvencijom Cd, MT ostvaruju zaštitnu ulogu [170]. Međutim, indukcija sinteze metalotioneina je pre sve odlika produžene izloženosti toksičnim metalima, potom potencijal Pb da indukuje sintezu MT je daleko manji od Cd, a dostupne studije ukazuju i na razliku u afinitetima toksičnih metala za MT [170]. U eksperimentalnom modelu *Pillai* i sar. [171] nakon dvonedeljne *i.p.* ekspozicije Cd u dozi od 0,05 mg/kg t.m., Pb u dozi od 0,05 mg/kg t.m. kao i smeši Cd i Pb (0,025 mg Cg/kg t.m. i 0,025 mg Pb/kg t.m.) koncentracije Cd i Pb u jetri pacova koji su primili smešu bile su u rangu primene pojedinačnih metala.

U osnovi hepatotoksičnosti Cd i Pb značajan doprinos nesumnjivo ima oksidativni stres što potvrđuju značajno više koncentracije uznapredovalih produkata oksidacije proteina eksperimentalnih grupa koje su primale Cd i Pb kao pojedinačnu supstancu, udružene sa značajno nižim TAS vrednostima u odnosu na kontrolnu grupu, iako je nivo MDA ostao nepromenjen, kao i nakon primene smeše Cd i Pb. Suprotno ovom rezultatu, značajno viši MDA nivoi u jetri eksperimentalnih životinja nakon ekspozicije Cd prikazani su u drugim studijama [171,172], dok nepromenjen nakon primene smeše Cd i Pb, uočen u našoj studiji, bio je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživača [148,156]. Stoga, izostanak razlika

mogu se pripisati akutnoj ekspoziciji sa jedne strane, a sa druge adaptaciji organizma na narušen oksidativni status nakon 24 h od ekspozicije Cd i Pb. Izostanak razlike može se jednim delom objasniti i protektivnom ulogom metalotionenina, odnosno malim udelom slobodne frakcije toksičnih metala slobodnih da generišu oksidativni stres [20] uzevši u obzir važnu ulogu MT i u zaštiti od reaktivnih vrsta kiseonika i adaptaciji ćelija na stanje stresa [170].

Biohemijski profil pacova nakon akutne ekspozicije toksičnim metalima karakterisao je značajno sniženje proteina kao i albumina u krvi kod svih tretiranih grupa, ali je ono najizraženije bilo nakon primene smeše Cd i Pb, koja je dovela i do smanjenja relativne mase jetre pa se može pretpostaviti da je došlo do izvesnog oštećenja hepatocita, uzevši u obzir podatak da je jetra glavni organ u kojem se sintetišu proteini [17]. Međutim, histopatološka analiza jetre nije pokazala oštećenja strukturnog integriteta hepatocita, aktivnost jetrinih transaminaza u krvi nije bila povećana, šta više, aktivnosti AST, ALT i ALP su bile umanjene, što uz smanjen nivo proteina ide u prilog izmenjenoj funkciji jetre nakon akutne ekspozicije Cd i Pb. Literaturni podaci pokazuju kontradiktorne podatke dobijene u studijama sa eksperimentalnim životinja, u smislu povećane [149,156,167] i smanjene enzimske aktivnosti [173–175]. Tako je smanjena aktivnost AST, ALT i ALP ostvarena nakon petodnevne *i.p.* izloženosti Pb (50 mg/kg t.m.) [173], petonedeljne oralne izloženosti 0,2% olova putem vode za piće [174] kao i nakon 90 dana ekspozicije smeši As, Cd, Pb, Cr i Hg [175]. Smanjena enzimska aktivnost koja je uočena u ovom eksperimentalnom modelu može se delimično objasniti kompeticijom između toksičnih metala i dvovalentnih jona, kao što su magnezijum, kobalt i mangan koji pripadaju grupi aktivatora enzima, ali i cinka koji je strukturna enzimska komponenta [17], što potvrđuje i disbalans u nivoima Mg, Cu i Zn u ovom radu. Interakcije između toksičnih metala i bioelemenata su intenzivno proučavane kod naše grupe autora [14–16,21,164,172,176–178], a brojne studije sprovedene na ovom polju potvrdile su hipotezu da kadmijum ometa normalnu apsorpciju Mg i Zn u gastrointestinalnom traktu pacova nakon akutne oralne i *i.p.* ekspozicije [164] te da produžena primena Mg ili Zn značajno smanjuje sadržaj Cd u krvi i jetri, a umanjuje i negativan efekat Cd na nivo Cu i Zn u krvi i organima [15,16,176].

5.1.3. Efekat na bubreg

Bubreg je ciljani organ toksičnosti Cd i Pb okarakterisan disfunkcijom glomerularne filtracije i tubularne reapsorpcije, te razvojem sindroma sličnog Fankoni sindromu (neselektivni gubitak proteina, glukoze, aminokiselina, bikarbonata, fosfata), stanja koja se dovode u vezu sa subakutnom i hroničnom ekspozicijom Cd [179,180]. U skladu sa primenjenom dozom grupa koja je primila 30 mg Cd/kg t.m. imala je višu koncentraciju Cd u bubregu u odnosu na grupu koja je primila nižu dozu Cd (15 mg/kg t.m.). Nakon ekspozicije smeši, koncentracije Cd i Pb bile su za oko 50% više kod Cd₁₅+Pb₁₅₀ grupe u odnosu na Cd₁₅ grupu, odnosno Pb₁₅₀ grupu, ističući da osim interakcije na nivou apsorpcije i distribucija metala može biti izmenjena. Naime, koncentracije Cd i Pb su značajno više kako u jetri tako i u bubrezima eksperimentalnih životinja nakon primene smeše u odnosu na pojedinačnu aplikaciju supstanci. Dobijene visoke koncentracije Cd i Pb u bubrezima pacova prevashodno su posledica osnovne fiziološke funkcije bubrega, kao i visokog sadržaja metalotioneina, kako je i prethodno bilo objašnjeno [79,181]. Kako je nefrotoksičnost kadmijuma vezana za koncentraciju metala u bubrezima, ozbiljna, ireverzibilna oštećenja bubrega se retko javljaju pri akutnim ekspozicijama [9] i pre svega su odlika subakutne i hronične izloženosti, što je u saglasnosti sa nalazom histopatološke analize bubrega ove studije.

Kao što je već izneto, rezultati studija su pokazali da oba toksična metala mogu da generišu nastanak oksidativnog stresa, primenjeni individualno ili u smeši, različitim putevima ekspozicije kao i različitim doznim režimom, i da bubrezi kao ciljni organ toksičnosti Cd i Pb, nisu pošteđeni [20,152,153,158,159,182,183]. Rezultati ove studije jasno ukazuju da primena smeše Cd i Pb ima izraženiji negativan efekat na lipidne strukture bubrega, na šta ukazuju značajno viši nivoi MDA, u odnosu na kontrolnu grupu i pojedinačnu dozu Cd. Takođe, značajno veći TAS nivo pratio je izloženost smeše Cd i Pb u odnosu na Cd₁₅ grupu, što je sve zajedno u korelaciji sa koncentracijama Cd i Pb u tkivu bubrega nakon primene smeše, koje su bile značajno više od koncentracije Cd i Pb nakon primene pojedinačnih doza metala. Uloga metalotioneina, kao i njihovo prisustvo u bubrezima može se pripisati dobijenom rezultatu ove studije, vodeći se činjenicom da MT u bubrezima jednim delom vode poreklo iz jetre, dospeli putem krvi iz kompleksa sa toksičnim metalom, te da se procesom *de novo* sinteze, koja se odvija u bubrezima, dodatno sintetišu. Aditivan efekat, sinergizam, ali i antagonizam, su dobro poznati scenariji nakon primene smeše toksičnih metala. Međutim, ograničenje ove studije je sam dizajn koji nije zadovoljio kriterijume za evaluaciju potencijalnih interakcija između ispitivanih toksičnih metala predložene od strane *Borget i sar.* [184], te je aditivan efekat, kao objašnjenje dobijenih rezultata za smešu Cd i Pb na nivou bubrega, na nivou pretpostavke.

Ukoliko se posmatraju osnovni biohemijski parametri koji reprezentuju bubrežnu funkciju, urea je bila značajno niža u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na netretirane životinje, dok je koncentracija kreatinina značajno povišena u Cd₃₀ grupi i Pb₁₅₀ grupi. Uočene promene uree i kreatinina nesumnjivo ukazuju da nakon akutne ekspozicije toksičnim metalima, ekskretorna funkcija bubrega može biti narušena [149,152,156,167], na šta dodatno ukazuju i rezultati koncentracije albumina u serumu koji su bili značajno niži kod svih eksperimentalnih grupa. U prilog narušenoj ekskretornoj funkciji bubrega je i izmenjen profil elektrolita u serumu (kalcijum, magnezijum, neorganski fosfor i hloridi) kao i nivoi Cu i Zn u krvi i bubrezima, te da je istovremena primena smeše Cd i Pb imala izraženiji efekat sniženja u odnosu na ekspoziciju pojedinačnih metala, na neke od njih.

5.1.4. Efekat na prostatu i testise

Akutna oralna ekspozicija kadmijumu i/ili olovu praćena je značajno višim koncentracijama oba toksična metala u tkivu prostate kod svih eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolu. U testisima, nakon aplikacije veće doze Cd (30 mg/kg t.m.) koncentracija Cd je bila 2,3 puta viša u odnosu na nižu dozu (15 mg/kg t.m.), dok se tretman smeše Cd i Pb odlikovao 1,7 puta višom koncentracijom Cd u odnosu na Cd₁₅ grupu. U slučaju olova, nakon primene smeše, koncentracija Pb u tkivu testisa nije se značajno razlikovala od Pb₁₅₀ grupe. Nivoi toksičnih metala u tkivu prostate i testisa jasno ukazuju da ni membrane reproduktivnih organa mužjaka nisu barijera za prolazak Cd i Pb, a dodatno predstavljaju i mesto toksičnog delovanja kao što je oštećenje krv-testis barijere [185]. Tako su u *in vivo* studiji sa *Swiss* mužjacima miševa nakon akutne oralne i *i.p.* ekspozicije (*i.p.* 1,5 mg Cd/kg odnosno 30 mg Cd/kg oralno), pokazane značajno više koncentracije Cd u tkivu testisa u odnosu na kontrolnu grupu, međutim, razlika u koncentracijama Cd u testisima nije uočena između ova dva puta ekspozicije [186]. Vezivanjem za DMT-1 receptore i kompeticija sa bioelementima, posebno Mg, Zn, Fe i Cu [169], koji su neophodni i za proces spermatogeneze, oba toksična metala mogu narušiti normalan reproduktivni ciklus, na šta ukazuju i rezultati ove studije. U studiji je pokazana značajno niža koncentracija Cu u prostati, odnosno viša u testisima, kod svih doznih režima, u odnosu na netretirane pacove, dok je redistribucija Zn u prostati, ali i testisima, u smislu viših koncentracija, uočena nakon primene smeše Cd i Pb. Dodatno, rezultati naše studije ukazali su na značajno sniženje Cu/Zn odnosa u prostati pri

svim tretmanima u odnosu na neizložene pacove, sa najizraženijem efektom sniženja nakon primene olova, odnosno ekspozicija toksičnim metalima je uticala na izmenu Cu/Zn odnos u testisima u smislu povećanja. Kako su bioelementi kofaktori enzima antioksidativne zaštite, poput superoksid-dizmutaze, redukovanje nivoa bioelemenata nesumnjivo umanjuje antioksidativni kapacitet i dodatno doprinosi reproduktivnoj toksičnosti Cd i Pb, što je i potvrđeno u eksperimentalnim studijama [186–189].

Uzevši u obzir novija istraživanja koja su Cd i Pb prepoznala kao endokrine ometače, narušavanje hormonskog statusa je dodatni mehanizam kojim oba metala ispoljavaju toksičnost na reproduktivne organe. Nakon akutne oralne ekspozicije mužjaka pacova različitim dozama Cd ove studije zapaža se pad nivoa testosterona u krvi u odnosu na kontrolnu grupu, mada ne značajan, što je u saglasnosti sa histopatološkim nalazom prostate i testisa koja nije bila značajno narušena primenjenim tretmanom. Niža koncentracija testosterona pokazana je nakon akutne oralne, ali ne i nakon *i.p* ekspozicije Cd (30 mg Cd/kg oralno, odnosno 1,5 mg Cd/kg *i.p.*) u studiji sa *Swiss* miševima [186] dok je očuvanost hipofiza-hipotalamus ose, odnosno nepromenjen nivo testosterona, utvrđen nakon osmonedeljne oralne ekspozicije niskim dozama Cd (2 mg/kg t.m.) kod miševa [190] kao i nakon sedmodnevne oralne izloženosti Pb (8 mg/kg t.m.) mužjaka *Albino* pacova [129].

Prikazani rezultati nesumnjivo ukazuju na značajnu implikaciju Cd i Pb na homeostazu testosterona eksperimentalnih životinja, te da vrsta animalnog modela, dizajn studije poput primenjene doze, puta ekspozicije kao i dužina ekspozicije, su razlozi različitih rezultata među studijama [185].

5.2. Uloga kadmijuma i olova u karcinomu dojke, prostate i testisa

5.2.1. Uloga kadmijuma i olova u karcinomu dojke

Karcinom dojke, kao multifaktorska bolest, dovodi se u vezu sa brojnim faktorima rizika za nastanak/progresiju, te i sa izloženošću toksičnim metalima iz životne sredine sa 8 do 20% većim rizikom od nastanka karcinoma dojke [43,191,192]. Stoga je u ovoj studiji praćena distribucija Cd i Pb u krvi, tumorskom i okolnom zdravom tkivu žena sa karcinomom dojke, a uzevši u obzir metaloestrogeni potencijal Cd i Pb kao i sve više dokaza iz eksperimentalnih *in vitro* i *in vivo* studija, kao i epidemioloških, o značajnoj ulozi hormona u etiologiji karcinoma dojke, u ovoj studiji je ispitivana i povezanost karcinoma dojke sa hormonskim statusom individue. Potom, kako se među glavnim mehanizmima toksičnosti Cd i Pb izdvajaju nastanak oksidativnog stresa i narušavanje homeostaze bioelemenata, u studiji su praćeni parametri oksidativnog statusa u krvi i distribucija bioelemenata, Cu i Zn, u tri kompartmenta obolelih žena.

Rezultati ove studije jasno ukazuju da su godine starosti značajan faktor rizika u predikciji karcinoma dojke, potvrđujući karakterističan obrazac povećane incidence karcinoma dojke sa godinama starosti žena [89]. Potom, značajno veća vrednost ITM kod pacijentkinja u odnosu na zdrave je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija koje govore o povezanosti gojaznosti i karcinoma dojke [193]. Jedan od novijih faktora rizika, prepoznat od strane IARC, koji se dovodi u vezu sa povećanom incidencom obolevanja od karcinoma dojke je i konzumiranje alkoholnih pića [46,194], međutim ova studija konzumiranje alkoholnih pića nije prepoznala kao značajnu varijablu u predikciji karcinoma dojke s obzirom da je oko 10% ispitanica kontrolne grupe konzumiralo alkoholna pića. Iako se većina karcinoma dojke javlja kod osoba koje nemaju pozitivnu porodičnu anamnezu, nekih 5 do 10% smatra se hereditarnim i dovodi se u vezu sa mutacijom gena značajnih u etiologiji ove bolesti [91–93]. Rezultat prikazane studije prati ovaj obrazac s obzirom da je kod 9,4% pacijentkinja prisutna pozitivna porodična anamneza, međutim, prevalenca pozitivne anamneze u kontrolnoj grupi iznosila je čak 5,0%. Dobijen rezultat ukazuje na veću verovatnoću obolevanja ukoliko je bolest prisutna u najužem krugu srodnika ali ne isključuje mogućnost pojave karcinoma ukoliko bolest nije prisutna u porodici. Tako rizik za nastanak BRCA 1/2 vezanog karcinoma dojke, kao dva najznačajnija gena čije mutacije se dovode u vezu sa povećanim rizikom obolevanja, kod žena iznosi 45 do 87%, dok se sa druge strane pretpostavlja da i 20-40% osoba sa karcinomom dojke bez pozitivne porodične anamneze u stvari poseduje neku BRCA1/2 mutaciju [95].

Nivoi Cd i Pb u krvi pacijentkinja u skladu su sa koncentracijama toksičnih metala opšte neizložene populacije, kako u Srbiji tako i u svetu [5,70,75,195]. Rezultati ove studije nisu prepoznali pušački status značajnom varijablom u predikciji karcinoma dojke. Sa tim u vezi, prosečne koncentracije Cd u krvi se nisu razlikovale između pacijentkinja i kontrolne grupe, kao ni između žena različitog pušačkog statusa, iako je trend viših vrednosti primećen kod pušača, što se može pripisati relativno malom broju ispitanica nakon klasifikacije po pušačkom statusu. Sa druge strane, iako razlika za koncentraciju Pb u krvi nije utvrđena između obolelih žena i kontrolne grupe, nakon klasifikacije po pušačkom statusu, značajno viša koncentracija Pb je pokazana u krvi pacijentkinja pozitivnog pušačkog statusa u odnosu na obolele nepušače (Tabela 9). Prema podacima IARC duvanski dim je klasifikovan u kategoriju agenasa koji se dovodi u vezu na nastankom karcinoma dojke, sa ograničenim dokazima u humanim studijama [46]. S obzirom da je biljka duvan poznati bioakumulator pre svega Cd, ali u manjem procentu i Pb [196,197], kao i da je primarni izvor Cd i Pb za opštu populaciju, pored hrane, duvanski dim, više koncentracije Pb u krvi pacijentkinja pozitivnog pušačkog statusa ove studije delimično se mogu pripisati pušenju [197,198].

Da bi dobili jedinstven obrazac distribucije metala u tumorskom tkivu, a sa ciljem daljeg rasvetljavanja potencijalne povezanosti Cd i Pb sa karcinomom dojke, oformljene su dve kontrole, interna, koju je predstavljalo okolno tkivo iste dojke, i eksterna, sačinjena od zdravih žena. Čak 3,5 puta viša koncentracija Cd u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo okolno tkivo iste dojke pokazana u ovoj studiji nesumnjivo ukazuje na obrazac distribucije kao i potencijalnu bioakumulaciju Cd u tumorskom tkivu. Potom, između koncentracija Cd u tumorskom i okolnom zdravom tkivu ostvarena je značajna pozitivna korelacija a Cd je prepoznat i kao značajna varijabla u predikciji karcinoma dojke (OR = 1,017). Suprotno kadmijumu, olovo je imalo drugačiju distribuciju, značajno niža koncentracija Pb pokazana je u tumorskom tkivu u odnosu na okolno zdravo tkivo iste dojke, a značajna pozitivna korelacija ostvarena je između koncentracija Pb u krvi i tumorskom tkivu ($\rho=0,315$). Za sada nije moguće objasniti korelacije ispitivanih metala između krvi, zdravog i tumorskog tkiva i definisati jedinstven obrazac distribucije u *in vivo* modelu upravo iz razloga postojanja individualnih karakteristika organizma i prirode bolesti sa jedne strane, te različitih toksikodinamskih profila metala sa druge strane. Jedno od mogućih objašnjenja za uočenu distribuciju Cd i Pb između ispitivanih kompartmenata je sposobnost vezivanja metala za različite funkcionalne grupe biomolekula. Uzevši u obzir dostupne podatke eksperimentalnih studija koji ukazuju na metaloestrogen potencijal Cd i Pb [40,42,50], kao i podatak da oko 90% učesnica ove studije ima pozitivnu ekspresiju estrogen receptora, značajno više koncentracije Cd i Pb u tumorskom tkivu ER+ u odnosu na ER- ekspresiju karcinoma, nesumnjivo ukazuju na sposobnost toksičnih metala da formiraju komplekse sa vezujućim domenima hormonskih receptora i ostvarivanju uloge metalohormona. Dobijeni rezultati ove studije u saglasnosti su sa rezultatima novijih studija [52,199], a slični obrasci distribucije i bioakumulacija Cd u tumorskim tkivima prikazani su i kod drugih endokrinih tumora. Tako su značajno više koncentracije Cd uočene ne samo u tumorskim tkivima dojke [200–202], već i u tumorskim tkivima pankreasa [203], prostate [204] i tiroidee [205]. Međutim, šest od sedam studija koje su istraživale nivoe toksičnih metala kod osoba obolelih od karcinoma bubrega ukazale su na niže nivoe Cd u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo, verovatno usled nižeg sadržaja metalotioneina u tumorskim ćelijama, odnosno dilucije metala u brzodelećim ćelijama karcinoma [206]. Slično kadmijumu, obrasci distribucije i potencijalna bioakumulacija Pb u tumorskim tkivima još uvek nisu decidno rasvetljeni, a dostupne studije prikazuju različite raspodele Pb između tumorskog i zdravog tkiva. Dok su rezultati ove studije ukazali na značajno nižu koncentraciju Pb u tumorskom tkivu u odnosu na okolno zdravo tkivo unutar iste dojke, u studiji *Siddique* i sar. [110] nije pokazana razlika između koncentracija Pb u tumorskom i okolnom zdravom tkivu, kao ni benignom tkivu. Takođe, razlika nije pokazana ni u studiji *Mohammadi* i sar. [51] ispitujući četiri različita regiona tkiva dojke. Suprotno ovim rezultatima, rezultati pojedinih studija ukazuju na više koncentracije Pb u tumorskom tkivu dojke u odnosu na zdravo [52,207]. Moguće objašnjenje za prikazane sheme distribucije Cd i Pb u tkivu dojke možemo potražiti u jedinstvenoj mikrosredini tumorskog tkiva koja rezultuje različitim apsorpcijama Cd i Pb usled kompeticije između toksičnih metala za kanale i transportere za dvovalentne jone. Takođe, različite vrednosti konstanti disocijacije toksičnih metala za estrogene receptore, a koje su pokazane u *in vitro* modelima sa MCF-7 tumorskim ćelijama [208], kao i različite vrednosti estrogenog potencijala iskazani preko EC₅₀ (efektivna koncentracija) [82], opravdavaju ovakve rezultate. Potom, potencijalna razlika u nivoima i obrascima distribucije MT u tkivu dojke, te afinitetu vezivanja toksičnih metala za njih [209–211] ide u prilog neuniformnoj raspodeli Cd i Pb. Na kraju, značajna sekvencijacija Cd i Pb iz tumorskih ćelija kao posledica izmene metabolizma i strukturnog integriteta malignog tkiva dojke opravdava ovakve rezultate.

Na kompleksnost etiologije karcinoma dojke ukazuju i rezultati eksperimentalnih studija koji su polne hormone, metabolite estrogena, deregulaciju i prekomernu ekspresiju nuklearnog ER (nER) i membranskog ER (mER) prepoznali značajnim u inicijaciji i progresiji bolesti [96,98,212–215], a

toksične metale, s obzirom na metaloestrogen potencijal, odgovornim za indukciju, proliferaciju, transkripciju i ekspresiju estrogen zavisnih gena [41–43,50]. Tako u *in vitro* studiji sa MCF-7 ćelijama Cd ostvaruje značajno sniženje nivoa ER i ER mRNA ali i povećanje PR [50], dok u *in vivo* studiji sa ženama pacova promoviše indukciju PR mRNA u tkivu dojke [216] ali i snižava koncentraciju estradiola u krvi [217]. Potom, u *in vitro* studiji primena Pb značajno stimuliše proliferaciju MCF-7 ćelija dojke, koju antiestrogeni blokiraju, potvrđujući sposobnost Pb da se vezuje za ER i ostvaruje ulogu metalohormona. Takođe, tretman Pb smanjuje nivo ER α i ER α mRNA, a povećava ekspresiju PR i PR mRNA [82]. U našoj studiji, značajno više koncentracije humanih gonadotropina (FSH i LH), odnosno niža koncentracija estradiola, pratile su žene obolele od karcinoma dojke. Koncentracije polnih hormona (FSH, LH i estradiol) prepoznate su u ovom radu kao značajne varijable u predikciji karcinoma dojke, a značajne pozitivne korelacije ostvarene su između koncentracija Cd u tkivu izmenjene strukture i oba humana gonadotropina, odnosno negativna između koncentracije Cd u tkivu izmenjene strukture i estradiola. Sa druge strane, negativna korelacija pokazana je i između koncentracije Pb u tkivu izmenjene strukture i testosterona. Prikazani rezultati ove studije u saglasnosti su sa menopauzalnim statusom učesnica studije, s obzirom da je preko 80% obolelih žena pripadalo kategoriji postmenopauze. Naime, gubitak ovarijalne funkcije manifestuje se smanjenom sintezom estradiola te posledično aktivacijom hipofiza-hipotalamus ose. Kao krajnji rezultat povećava se sinteza GnRH, odnosno povećava se sinteza humanih gonadotropina, FSH i LH. Slično prikazanim rezultatima ove studije, niži nivo estradiola udružen sa nižom vrednošću FEI indeksa primećen je u studiji Ali i sar. [55]. Međutim, prikazani rezultati naše studije nisu u saglasnosti sa rezultatima *The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group* koja je objedinila rezultate sedam prospektivnih studija i ukazala na značajnu ulogu polnih hormona, pre svega estradiola, u nastanku/razvoju karcinoma dojke [103]. Možemo pretpostaviti da je razlog niže koncentracije estradiola u krvi pacijentkinja posledica pre svega ubrzane razmene hormona između krvi i tumorskog tkiva, odnosno povećanog preuzimanja estradiola iz cirkulacije od strane maligno izmenjenog tkiva [218]. Takođe, cirkadijalni ritam sekrecije hormona, kao i velika fluktuacija nivoa hormona iz dana u dan u toku reproduktivnog perioda žena, su mogući razlozi dobijenih rezultata. Sa tim u vezi, uzorkovanje krvi u jednom vremenu, a sa ciljem ekstrapolacije dobijenih rezultata na hormonski profil individue doveden je u pitanje, uzevši u obzir podatak o značajnom međuklasnom koeficijentu korelacije koji se za estradiol kreće u rasponu od 0,38 za folikularnu fazu, odnosno 0,45 za lutealnu fazu [103,219]. Dodatno, postojanje značajne razlike u godinama starosti ispitivanih kohorti ove studije, kao i nedovoljan broj ispitanica za postizanje dovoljne snage studije nakon klasifikacije po menopauzalnom statusu, su ograničavajuće strane studije koje nam ne dozvoljavaju da jasno iznesemo zaključak o potvrđenoj ulozi Cd i Pb u narušavanju homeostaze polnih hormona, i posledično, u nastanku/razvoju karcinoma dojke.

Uloga oksidativnog stresa u inicijaciji, promociji i progresiji karcinoma dojke [22], potvrđena u *in vitro* kinetičkoj studiji sa MCF-7 ćelijskom kulturom kada je dokumentovana brža ćelijska smrt ukoliko se kultura tretira supstancom za neutralisanje glutaciona neposredno pre ekspozicije toksičnom metalu [220], usmerila je jedan deo našeg istraživanja ka rasvetljavanju uloge Cd i Pb u narušavanju homeostaze oksidativnog statusa kod pacijentkinja sa karcinomom dojke, s obzirom da je oksidativni stres jedan od važnih mehanizma njihove toksičnosti [221–226], a ujedno je prepoznat kao značajni događaj koji se dovodi u vezu sa pojavom i razvojem karcinoma [22–25]. Na značajnu ulogu oksidativnog stresa u etiologiji karcinoma dojke ukazali su i rezultati prospektivne studije slučaja u kojoj je visok nivo sulfhidrilnih grupa, koji imaju značajnu ulogu u neutralisanju slobodnih radikala, doveden u vezu sa smanjenim rizikom od nastanka karcinoma dojke [227]. Kako su reaktivne vrste kiseonika kao i nastanak oksidativnog stresa posledica narušene ravnoteže između prooksidanasa i antioksidanasa, viši TAS nivoi kod pacijentkinja ove studije ukazuju na povećanu antioksidativnu

zaštitu koja pokušava da izbalansira narušenu homeostazu oksidativnog statusa. Šta više, značajna pozitivna korelacija ostvarena je između koncentracije Cd u tkivu izmenjene strukture i TAS nivoa ($\rho=0,322$), odnosno TAS je prepoznat značajnom varijablom u predikciji karcinoma dojke. Takođe, značajno viši AOPP nivoi kod pacijentkinja ove studije kao i pozitivna korelacija između koncentracije Cd u tkivu izmenjene strukture i AOPP nivoa, odnosno pozitivna korelacija između koncentracije Pb u tumorskom tkivu i IMA, dodatno potkrepljuju stav o ulozi oksidativnog stresa kod karcinoma dojke i potencijalan doprinos Cd i Pb njemu. Prikazani rezultati naše studije u saglasnosti su sa rezultatima drugih studija koji su kod pacijentkinja sa karcinomom dojke ukazali na narušenu homeostazu oksidativnog statusa, odnosno na izmenjene TAS i TOS nivoe [223,228,229], te redukovanu aktivnost SOD i glutation reduktaze [228]. Šta više, snižena aktivnost katalaze sa porastom histološkog gradusa karcinoma pokazana je i u samom tumorskom tkivu dojke [230]. Međutim, iako prikazani rezultati ove studije potvrđuju narušenu homeostazu oksidativnog statusa, ne može se jasno doneti zaključak da li je ona uzrok ili posledica bolesti, odnosno da li su Cd i Pb direktno odgovorni.

U cilju objašnjenja eventualne ulogu Cd i Pb u pojavi i razvoju karcinoma dojke, usmerili smo istraživanje i ka njihovim interakcijama sa bioelementima, važnim mehanizmom toksičnosti metala [12], ali i usled interakcije pri apsorpciji, distribuciji i eliminaciji. Iako su promene u koncentracijama Cu i Zn u krvi primećene kod različitih patologija [231], obrasci distribucije još uvek nisu decidno rasvetljeni. Dok su izvesne studije ukazale na niže koncentracije Cu i Zn [232], ili nisu ukazale na značajne promene nivoa Zn u krvi [233], Gupta i sar. [234] su prikazali više koncentracije Cu, a niže Zn u krvi žena sa karcinomom dojke u odnosu na zdrave, dok je dijagnostička sposobnost Cu/Zn odnosa imala zavidno visoke vrednosti (senzitivnost 86% i specifičnost 87%). Šta više, u meta analizi Feng i sar. [235] su prepoznali visoke koncentracije Cu, a niske Zn, kao značajne parametre za razlikovanje karcinoma dojke od benignih promena. U prikazanim rezultatima naše studije, koncentracije Cu i Zn imale su trend viših vrednosti u krvi i tumorskom tkivu u odnosu na okolno zdravo tkivo pacijentkinja, dok je trend nižih vrednosti bio prisutan u benigno izmenjenim tkivima u odnosu na okolno zdravo tkivo kontrolne grupe. Uočene distribucije bioelementa mogu se objasniti potencijalno narušenim integritetom morfološke strukture tkiva dojke usled maligne transformacije koja rezultuje njihovim oslobađanjem u krv [234], ali i sposobnošću Cd i Pb da kao dvovalentni joni zamene Cu i Zn u raznim strukturnim i funkcionalnim biomolekulima [18,80,221,236]. Sa druge strane, osim brojnih uloga u fiziološkim procesima [17], utvrđena je i značajna uloga Cu i Zn u etiologiji karcinoma [110,235,237,238]. Naime, oba bioelementa imaju ključnu ulogu kao kofaktori brojnih enzima učesnika gotovo svih faza karcinogeneze (inicijacija, promocija, progresija), kao i proteina/enzima odgovornih u formiranju mikrosredine tumora poput vaskularnog adhezivnog proteina 1 kao i lizil oksidaze [237,238]. Takođe, cink ima važnu ulogu u normalnom funkcionisanju p53 gena, a nedostatak cinka doveden je u vezu sa inaktivacijom i supresijom gena, čineći ga nefunkcionalnim [231]. Potom, dobro je poznata i činjenica da se nedostatak cinka dovodi u vezu sa nastankom oksidativnog stresa, a posledično i sa oštećenjem proteina, lipida i DNK [231]. Šta više, oba bioelementa su konstitutivne komponente brojnih enzima učesnika antioksidativne zaštite [20]. Prikazani rezultati naše studije saglasni su sa rezultatima drugih studija, ukazujući na karakterističnu distribuciju Cu i Zn usmerenu ka tumorskom tkivu. Tako su značajno više koncentracije Zn [110,200,201,239] pokazane u tumorskim tkivima žena obolelih od karcinoma dojke, dok je kvantitativni biomonitoring (eng. *quantitative bioimaging*) sa slajdovima tumorskih tkiva dojke ukazao na 4 puta više koncentracije Cu i Zn u dobro prokrvljenim regionima ukazujući na značajnu ulogu Zn u degradaciji matriksa od strane metaloproteinaza u fazi proliferacije karcinoma, kao i značajnu ulogu Cu, jednog od glavnih nutrijenata u procesu angiogeneze tumora [238]. Međutim, niža koncentracija Zn [229], kao i različiti obrasci distribucije Cu, značajno niža [201], odnosno više koncentracije [200,229], dokumentovani u studijama sa malignim tkivima dojke, ukazuju da i histološki gradus

karcinoma kao i prisustvo same maligne bolesti, kroz biohemijske i metaboličke promene, dodatno doprinose neuniformnoj distribuciji bioelemenata.

5.2.2. Uloga kadmijuma i olova u karcinomu prostate

Godine starosti, etnička pripadnost, genetska predispozicija, ishrana, pušenje kao i izloženost toksičnim metalima, pre svega Cd i Pb, iz životne sredine, ili na radnom mestu, su poznati faktori rizika koji se dovode u vezu sa povećanom incidencom nastanka karcinoma prostate, jednim od najučestalijih maligniteta u populaciji starijih muškaraca. Karcinom prostate se obično razvija sporo, a prostatična displazija može godinama, pa i decenijama da bude prisutna pre kliničke manifestacije bolesti [101]. Prosečna starost ispitanika sa potvrđenom dijagnozom karcinoma prostate ove studije bila je značajno veća od kontrolne grupe što je u skladu sa činjenicom da je incidenca karcinoma prostate usko vezana za godine starosti, sa pikom iznad 65 godina [89]. Iako literaturni podaci povezuju gojaznost i konzumiranje alkoholnih pića sa većom incidencom obolevanja, rezultati naše studije nisu prepoznali ove dve varijable statistički značajnim u predikciji karcinoma prostate. Sa druge strane, dobro je poznata činjenica da duvanski dim sadrži brojne toksične supstance, među kojima Cd i Pb [240], kao i da pušenje predstavlja veliki zdravstveni problem savremenog društva. Pušenje, odnosno duvanski dim je prema podacima IARC prepoznato kao humani karcinogen, a sa ograničenim dokazima u humanim studijama dovodi se u vezu sa nastankom karcinoma prostate [46,241], međutim, dostupni rezultati epidemioloških studija su još uvek nekonzistentni. Tako je nakon evaluacije podataka 14 kohortnih studija pozitivna korelacija prepoznata kod devet [241]. Rezultati ove studije ukazali su na značajnu razliku između ispitanika po pitanju pušačkog statusa, međutim, prevalenca pozitivnog pušačkog statusa bila je u korist kontrolne grupe. Sa druge strane, pozitivna porodična anamneza se dovodi u vezu sa dva do tri puta povećanim rizikom od nastanka karcinoma prostate. Generalno, rizik raste sa brojem najbližih srodnika obolelih od ove bolesti, a o značaju nasledne komponente govori i podatak da se pozitivna porodična anamneza dovodi u vezu sa 40-50% većom verovatnoćom obolevanja [113] što potvrđuju i rezultati naše studije.

Prvi slučajevi koji su izloženost Cd povezali sa karcinomom prostate datiraju iz sredine XX veka kada je zabeležena veća incidenca letalnih ishoda od karcinoma prostate kod radnika zaposlenih u fabrici Ni-Cd baterija, a krajem XX veka primećena je i veća incidenca obolevanja od karcinoma prostate stanovništva iz područja sa većim koncentracijama Cd u vodi, zemljištu i hrani [41,63]. Kasnije je u *in vitro* studijama pokazano da Cd izaziva maligne transformacije epitelnih ćelija humane prostate [242] te da je karcinogeneza najverovatnije posledica negenotoksičnog mehanizma [243]. Od tada, sve više dokaza iz eksperimentalnih *in vivo* [62,63] i epidemioloških studija dovodi Cd u vezu sa nastankom karcinoma prostate, ali i dalje sa ograničenim dokazima iz humanih studija [46,58,62]. Uzevši u obzir podatak da je prosečna koncentracija Cd u krvi pacijenata bila značajno viša od zdravih ispitanika, te da je Cd prepoznat značajnom varijablom u predikciji karcinoma prostate (OR=1,183), rezultati naše studije podržavaju implikaciju Cd u etiologiji karcinoma prostate. Šta više, i nakon klasifikacije ispitanika po pušačkom statusu koncentracije Cd u krvi bile su značajno više kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, istog ali i različitog pušačkog statusa. Dobijeni rezultati ove studije u saglasnosti su sa rezultatima drugih studija u kojima su pacijenti oboleli od karcinoma prostate takođe imali značajno više koncentracije Cd u krvi od zdravih ispitanika [58,116,117]. Sa druge strane, sistematska analiza koja je analizirala dostupne podatke za nivo Cd u zdravom tkivu prostate ukazala je na značajno sniženje koncentracije Cd od perioda sredine XX veka do danas, implicirana redukovanom profesionalnom izloženosti [244]. Međutim, dostupni podaci iz humanih studija i dalje ukazuju na signifikantnu akumulaciju Cd u tumorskim tkivima prostate [204,245-247], kao i naša studija, te na značajno više koncentracije Cd u tumorskom tkivu prostate u odnosu na zdravo tkivo [58,62,63,116,248,249]. O uporedivosti dobijenih rezultata za koncentracije Cd u tumorskim tkivima prostate teško je polemizati jer su publikovani različiti rezultati posledica različitog dizajna studija, kohorte pacijenata, mesta uzorkovanja tkiva i histološkog gradusa tumora, te metodoloških postupaka

obrade i analiziranja uzoraka tkiva. Potom, pri analiziranju rezultata treba uzeti u obzir i period latencije, od početka ekspozicije do pojave karcinoma, kao i činjenicu da Cd u tkivu može reflektovati akutnu ali i hroničnu ekspoziciju [63,249].

Prilikom procene toksičnog efekta Cd, potrebno je razmotriti i potencijalni uticaj istovremene izloženosti i drugim toksičnim supstancama, kao što je olovo, jer je realni scenario da je čovek izložen smeši toksičnih supstanci, a da toksični efekti smeše mogu biti kvalitativno i kvantitativno drugačiji u odnosu na pojedinačne, zbog postojanja potencijalnih interakcija [250]. Tako je u *in vivo* studiji nakon jednomesečne *i.p.* ekspozicije mužjaka pacova Pb u dozi od 0,05 mg/kg t.m. kao i smeši Cd i Pb (0,025 mg Pb/kg t.m. i 0,025 mg Cd/kg t.m.) utvrđeno značajno sniženje relativne mase prostate nakon oba tretmana, međutim atrofija, stromalna fibroza, kalcifikacija i inflamacija prostate su uočene samo pri aplikaciji smeše. Iako tumorske formacije u prostati pacova nisu bile uočljive, zamena epitela u korist skvamoznog epitela ukazala je na progresivne prekancerogene promene nakon primene smeše, ističući sinergizam Cd i Pb na smanjenu reproduktivnu funkciju pacova [120]. Poznato je da olovo narušava reproduktivnu funkciju muškaraca [74], jer su narušena spermatogeneza, oligospermija, histohemijske i hormonske abnormalnosti zapažene kod profesionalno izloženih osoba [85,251,252], ali i kod pacijenata lečenih od infertiliteta nepoznate etiologije [68,69]. Potom, studije ukazuju i da izloženost Pb povećava rizik od nastanka karcinoma prostate [44], međutim zbog nekonzistentnosti dostupnih rezultata iz epidemioloških, te nedostatka dovoljno dokaza iz humanih studija IARC još uvek ne prepoznaje olovo kao uzročnika nastanka karcinoma prostate [46]. Naša studija nije uspela da utvrdi povezanost između povišenih koncentracija Pb u krvi i karcinoma prostate, šta više, prosečna koncentracija Pb u krvi pacijenata sa karcinomom prostate bila je značajno niža od kontrolne grupe. U potrazi za mogućim objašnjenjem za ovakav rezultat, osvrnuli smo se na procenu očuvanosti bubrežne funkcije naše grupe ispitanika, izraženu preko serumskih koncentracija uree i kreatinina, s obzirom na dobro poznat nefrotoksičan potencijal olova. Značajno niža koncentracija kreatinina karakterisala je pacijente sa karcinomom prostate, dok razlika nije pokazana za nivo uree. Uzevši u obzir podatak da koncentracija kreatinina u krvi reflektuje procenat mišićne mase organizma, i da se sa godinama starosti ona gubi, niža vrednost kreatinina uočena kod naše kohorte pacijenata je opravdana. Međutim, nesenzitivnost uree i kreatinina u krvi za početna, odnosno blaga oštećenja bubrega za vrednosti eGFR ispod 89 ml/min/1,73m³ (eng. *estimated glomerul filtration rate*, eGFR), a na osnovu publikovanih rezultata prospektivne *population-based* kohortne studije koja je ukazala na značajno smanjenje brzine glomerularne filtracije za vrednosti Pb u krvi iznad 2,9 µg/dL [253], možemo pretpostaviti da je potencijalno narušena funkcija bubrega zaslužna za dobijen rezultat. Dodatna moguća objašnjenja za ovakav rezultat potražili smo i kroz dva moguća scenarija povećane ekspozicije Pb, profesionalna izloženost i geografska distribucija prebivališta učesnika studije. Detaljnim uvidom u ankete svih ispitanika nismo pronašli podatak o profesionalnoj izloženosti obolelih, a ni u kohorti kontrolne grupe. Na taj način, profesionalna izloženost kao razlog značajne razlike u koncentraciji Pb u krvi ove dve kohorte gubi na značaju, međutim uvidom u geografsku distribuciju porekla/prebivališta pronalazimo da je većina pacijenata (>90%) pripadala okolini Beograda, a kontrolna grupa (>95%) Kosovsko-mitrovačkom regionu, bogatom izvoru rude olova. U periodu najveće proizvodnje i prerade Pb ruda, emisija gasova, pre svega olova, bila je čak 100x veća od dozvoljene količine prema aktuelnim Pravilnicima tog perioda, a kod stanovnika su zabeležene značajno visoke koncentracije Pb u krvi [254]. Uzevši u obzir podatak da se koncentracija Pb u krvi smatra ključnim parametrom za dokazivanje skorašnje ekspozicije, a da nivoi u krvi koji su izraz hronične ekspozicije mogu zamaskirati ukupno telesno opterećenje organizma, zbog dugog poluvremena eliminacije i bioakumulacije u organizmu, mogu da opravdavaju ovako dobijen rezultat. Dok razlika za nivo Pb u krvi kod obolelih od karcinoma prostate nije pokazana ni u drugim studijama [255], izvesne studije su istakle značajno više koncentracije Pb u krvi kod pacijenata sa karcinomom prostate u odnosu na

zdrave ispitanike [83,117]. Potom, određene studije nisu utvrdile ni razliku između nivoa Pb u tumorskim i zdravim tkivima prostate [256], ili je nivo Pb bio niži u tumorskom nego u okolnom zdravom tkivu [246]. Šta više, retrospektivna NHANES studija (2003-2010) nije prepoznala povezanost između Pb i porasta PSA u krvi, tumor markera specifičnog za tkivo prostate [257], te je potvrda o značajnoj ulozi Pb u hiperplaziji prostate izostala.

Visoka ekspresija enzima aromataza u epitelu karcinoma prostate, kao i pozitivan odgovor *stem* ćelija prostate na estrogene, ukazao je na značajnu ulogu estrogen receptora u transformaciji *stem* ćelija prostate u kancerogene [258]. Sposobnost Cd i Pb da aktiviraju ER, odnosno da blokiraju vezivanje estrogena za ER i ostvarivanje tzv. mimikrije potvrđena u *in vitro* i *in vivo* studijama [40,41,61], usmerila je naše istraživanje na rasvetljavanje uloge Cd i Pb na hormonski status pacijenata sa karcinomom prostate. Rezultati naše studije, značajno viša koncentracija FSH, odnosno niža estradiola, ukazuju na narušenu homeostazu polnih hormona kod pacijenata sa karcinomom prostate, a pozitivna korelacija između koncentracije Cd u krvi i estradiola, takođe utvrđena u našoj studiji, dodatno potvrđuju ulogu Cd kao metalohormona. Značajno niže koncentracije estradiola, ali i slobodnog testosterona, pokazane su i u studiji kod pacijenata sa karcinomom prostate u odnosu na pacijente sa benignom hiperplazijom prostate [259], međutim, uloga polnih hormona kao značajnih prediktora u nastanku/razvoju karcinoma prostate još uvek nisu razjašnjeni. Humane studije dodatno potvrđuju metaloestrogenu ulogu Cd i Pb determinisanu narušenom homeostazom polnih hormona kod muškaraca smanjene reproduktivne sposobnosti (smanjen broj spermatozoida, povećan broj abnormalnih formi, smanjena pokretljivost) [131,260–263]. Tako je *cross-sectional* studija sa muškarcima koji nisu profesionalno izloženi Cd istakla da je povećanje Cd u krvi udruženo sa povećanjem koncentracija FSH, estradiola i testosterona [68], odnosno ukazala je na pozitivnu korelaciju između koncentracije Pb u krvi i povećanih nivoa estradiola i testosterona, odnosno sniženog prolaktina, te sinergizam Cd i Pb na povećan nivo testosterona [69].

Novije studije ukazuju i na značajnu ulogu androgena, pre svega testosterona, u generisanju oksidativnog stresa, a oštećenje transkripcionih faktora, oštećenje DNK, mutacija mitohondrijalne DNK kao i aktivacija gena odgovornih za apoptozu [25,264], nastali usled narušene homeostaze oksidativnog statusa, prepoznati su ključnim komponentama višestepenog procesa koji se nalazi u osnovi nastanka hormon zavisnih karcinoma [116]. Tako je u *in vitro* modelu sa LNCaP ćelijama pokazana AR indukovana produkcija slobodnih radikala usko povezana sa povećanim nivoom *JunD* proteina, proteina koji pripada familiji transkripcionih faktora, inhibitora proliferacije ćelija i promotora diferencijacije ćelija [264] dok je povećana ekspresija proinflamatornih citokina u prostati pacova, odgovornih za produkciju slobodnih radikala kiseonika, potvrđena nakon hronične administracije DHT i estradiola [25]. O narušenoj homeostazi oksidativnog statusa govore i rezultati naše studije reprezentovani sniženom vrednošću TAS nivoa kod pacijenata sa karcinomom prostate, a kao posledica povećane produkcije slobodnih radikala, odnosno usled aktivacije kompenzatornih mehanizama da očuvaju stanje ravnoteže, međutim statistički značajne korelacije između Cd/Pb i ispitivanih parametara oksidativnog statusa nisu prepoznate. Povećana produkcija MDA, odnosno niži nivoi glutaciona pokazani su u studiji *Guzel* i sar. [116] kod pacijenata sa karcinomom prostate u odnosu na zdrave ispitanike, a narušena homeostaza oksidativnog statusa potvrđena je i u studiji sa muškarcima smanjene reproduktivne sposobnosti (infertilitet nepoznate etiologije) koju su pratile značajno više serumske TOS, a niže TAS vrednosti, u odnosu na ispitanike očuvane reproduktivne sposobnosti [265]. Potom, izvesne studije ukazale su i na značajnu pozitivnu korelaciju između Pb u krvi i TBARS produkata, odnosno negativnu između Pb u krvi i glutaciona kod pacijenata sa karcinomom prostate u odnosu na zdrave ispitanike [83], kao i na pozitivnu korelaciju Cd/Pb sa MDA, odnosno negativnu sa SOD kod pacijenata sa BHP [266]. Dodatno, rezultati humanih studija takođe su potvrdili generisanje oksidativnog stresa u tkivu prostate, izraženi višim MDA nivoima, odnosno nižom

koncentracijom glutationa kod pacijenata sa karcinomom prostate [116], dok je značajno niži TAS, odnosno viši TOS nivo pokazan i u uzorcima seminalne tečnosti muškaraca narušene reproduktivne sposobnosti [265].

Značajna uloga Zn u patogenezi reproduktivne toksičnosti prepoznata je krajem XX veka kada je grupa autora *Waalkes* i sar. [30,32,63] u eksperimentalnom modelu sa *Wistar* pacovima prevenirala Cd indukovani karcinom testisa, ali stimulisala razvoj karcinoma prostate, s.c. tretmanom visoke doze Zn. Uloga Zn u inhibiciji rasta tumorskih ćelijskih linija pokazana je i u *in vitro* modelu sa androgen zavisnim (LNCaP) i androgen nezavisnim (PC-3) ćelijama karcinoma prostate aktiviranjem apoptoze, korelirana akumulacijom Zn u ćelijama [267,268]. Reproductivni organi muškaraca za svoje normalno funkcionisanje zahtevaju snabdevanje dovoljnim količinama bioelemenata putem krvi [17,269], smanjena koncentracija Zn često se dovodi u vezu sa redukovanom sintezom testosterona i smanjenom transformacijom testosterona u DHT [17], međutim studije koje su ispitivale nivoe Cu i Zn u krvi pacijenata sa karcinomom prostate iznele su različite zaključke. Rezultati naše studije utvrdili su značajno više koncentracije Cu u krvi pacijenata sa karcinomom prostate u odnosu na zdrave ispitanike, dok razlika nije pokazana za nivo Zn. Dodatno, koncentracija Cu u krvi je prepoznata značajnom varijablom u predikciji karcinoma prostate (OR=1,25). Značajno više koncentracije Cu u krvi, bez razlike u koncentracijama Zn pokazane su i u drugim studijama [255,270], međutim, izvesne studije dokumentovale su i značajno niže koncentracije Zn u krvi pacijenata sa karcinomom prostate, bez promene u koncentraciji Cu [117], kao i značajno niže koncentracije i Cu i Zn u krvi [83]. Bakar i cink su strukturne komponente brojnih enzima i proteina, cink ima i važnu antikancerogenu ulogu koju ostvaruje stabilizacijom molekula DNK, RNK i ribozoma, učestvuje u proliferaciji i diferencijaciji ćelija [17,270] s obzirom da je kofaktor i enzima koji učestvuju u sintezi i popravci oštećenja DNK i RNK [21], te se narušavanje homeostaze bioelemenata dovodi u vezu sa disfunkcijom mnogih metaboličkih puteva, izmenom intra i interćelijske signalizacije, apoptozom, rezultujući raznim poremećajima u organizmu kao i nastankom karcinoma [74,271]. Potom, povećana produkcija slobodnih radikala kiseonika, te oksidativna oštećenja proteina i molekula DNK izazvana višim intracelularnim nivoima bakra, mogu da dovedu do ćelijskih oštećenja i nastanka karcinoma [271,272]. Uzevši u obzir sposobnost interakcija Cd i Pb sa bioelementima, a u cilju dodatnog rasvetljavanja njihove uloge u razvoju karcinoma prostate, deo istraživanja usmerili smo i na ispitivanje potencijalnih korelacija između koncentracije Cd i Pb u tumorskom tkivu prostate i ispitivanog profila bioelemenata. Iako obrasci distribucije bioelemenata još uvek nisu decidno rasvetljeni, rezultati naše studije utvrdili su značajne korelacije između koncentracija Cd i Pb i oba bioelementa. Naime, Cd i Pb u krvi su bili u negativnoj korelaciji sa koncentracijom Cu u tumorskom tkivu, dok je Cd u krvi bio i u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom Zn u tumorskom tkivu. Međutim, zbog nemogućnosti uzorkovanja paralelnog zdravog tkiva naše kohorte pacijenata i izostanka interne kontrole za tkivo prostate, ostajemo uskraćeni za uvid u distribuciju Cu i Zn između zdravog i tumorskog tkiva, te rasvetljavanju potencijalnog obrasca njihove raspodele. Značajno više koncentracije Cu (46%) utvrđene su u tumorskim tkivima različitih organa, u odnosu na zdrava tkiva, dok razlika nije pokazana za nivoe Zn [271]. Iako su karakteristike karcinoma prostate niži nivoi Zn u tkivu [246], odnosno izostanak distribucije Zn zbog smanjene intracelularne akumulacije (smanjena ekspresija ZIP 1 proteina i ZIP 3 transportera) [17,268], studije koje su ispitivale nivoe bioelemenata u tumorskim tkivima prostate, dobile su različita zapažanja, poput značajno nižih koncentracija Zn u tumorskim tkivima prostate u odnosu na zdrava tkiva, ukazujući na potencijalni antagonizam između Cd/Pb i Zn [248,249,256], odnosno viših koncentracija Zn u tumorskim tkivima prostate u odnosu na okolna zdrava tkiva [246], kao i u odnosu na benigna tkiva prostate [204]. Potom, studije ukazuju i na više koncentracije Cu u tumorskim tkivima u odnosu na zdrava [256] i benigna tkiva prostate [204]. Takođe, postoje podaci

koji ukazuju i na značajno niže koncentracije Zn, a više Cu u kosi i noktima pacijenata sa karcinomom prostate [273].

Dobijeni različiti obrasci distribucije Cu i Zn prikazanih studija u krvi i tkivima prostate nesumnjivo ukazuju na postojanje potencijalnih interakcija, na nivou apsorpcije, distribucije i eliminacije, kako međusobnim (cink je prepoznat kao antagonista bakra), tako i interakcijama sa Cd i Pb. Različiti dizajn studija, heterogenost populacionih grupa, mesto uzorkovanja tumorskih/zdravih tkiva (različita raspodela Zn između lateralnog i antralnog lobusa prostate pokazana je u studijama [204]), metodološki postupci obrade i analiziranje tkiva, su dodatni razlozi dobijenih različitih shema raspodela bioelemenata, i odgovorni su za izostanak jedinstvenog obrasca distribucije. Iako su rezultati epidemioloških studija raznoliki, eksperimentalne *in vitro* i *in vivo* jasno ukazuju na antikancerogenu ulogu Zn u tkivu prostate, a zbog nemogućnosti tumorskog tkiva prostate da akumulira Zn usled smanjene ekspresije transportera, koncentracije ovog bioelementa u tumorskom tkivu i pri suplementaciji su niže [268].

5.2.3. Uloga kadmijuma i olova u karcinomu testisa

Karcinomi testisa se nalaze na prvom mestu maligniteta kod mlađih osoba u populaciji muškaraca [89] sa incidencom obolevanja koja se udvostučila u poslednjih 40 godina [123]. Faktori rizika koji se dovode u vezu sa povećanom incidencom pojave/razvoja bolesti su genetika i hormonski status, a novije studije ukazuju i na značajnu ulogu toksičnih supstanci usled profesionalne izloženosti, ali i iz životne sredine, međutim obrasci njihove povezanosti još uvek nisu jasno definisani [123]. Rezultati ove studije potvrđuju pravilo distribucije bolesti kod mlađih muškaraca. Šta više, godine starosti su prepoznate i kao značajan prediktor za predviđanje bolesti (OR=0,94), dok dobijena vrednost *Negelkerke* indeksa ukazuje da se prediktoru godine starosti može pripisati oko 10,2% verovatnoće za pojavu karcinoma testisa. Rezultati naše studije prepoznali su i genetsku predispoziciju značajnim faktorom, uzevši u obzir podatak da je kod 9,6% obolelih osoba bolest bila prisutna u najbližem krugu srodnika. Kako smo i istakli prethodno, pozitivna porodična anamneza najbližih srodnika nosi sa sobom 4-10 puta veći rizik za pojavu bolesti.

Narušena reproduktivna sposobnost muškaraca se dovodi u vezu i sa toksičnim metalima, Cd i Pb, koji su prepoznati od strane SZO kao supstance koje izazivaju veliku zabrinutost po zdravlje ljudi [2,185], međutim dostupne studije koje njihovu izloženost povezuju sa reproduktivnom toksičnošću pre svega su vezane za profesionalnu izloženost [123,274–276], a daleko ređe za životnu sredinu. Dodatno, za razliku od brojnih eksperimentalnih *in vivo* modela koji su prepoznali karcinogeni potencijal Cd i Pb na tkivo testisa, broj humanih studija je ograničen, upravo iz razloga veome niske incidence karcinoma testisa u populaciji muškaraca. Potom, pri evaluaciji podataka za nivo toksičnih metala koristi se krv ili urin, kao dva najčešće korišćena materijala u biomonitoringu, a koja reflektuju aktuelnu ekspoziciju (krv), odnosno telesno opterećenje (urin), međutim uzorak tkiva kao najreprezentativniji biološki materijal koji daje najbolji uvid o ulozi Cd i Pb u karcinomu, pre svega zdravo i tumorsko tkivo, se veoma retko koriste. Rezultati naše studije istakli su značajno više koncentracije Cd u krvi, odnosno niže Pb, kod pacijenata sa karcinomom testisa u odnosu na zdrave ispitanike. Šta više, Cd je prepoznat i značajnim parametrom u predikciji karcinoma testisa (OR=1,980). Prosečne koncentracije Cd i Pb u tumorskom tkivu nisu se značajno razlikovale od koncentracija u okolnom zdravom tkivu iako rezultati eksperimentalnih studija jasno ukazuju da Cd ima sposobnost oštećenja i prolaska krv-testis barijere [277], a potvrdu pronalazimo i u humanim studijama koje su ukazale na značajnu akumulaciju Cd, ali i Pb u tkivu testisa [278]. Viša koncentracija Cd u krvi, a niža Pb, ukazuju na njihovu potencijalnu interakciju pri toksikokinetičkim procesima kao i moguću kompeticiju za transportere dvovalentih jona. Takođe, za razliku od krvi gde su poluvremena eliminacije Cd i Pb poznata, pri evaluaciji dobijenih rezultata za koncentracije u tkivima treba uzeti u obzir i period latencije, kao i činjenicu da koncentracije u tkivima ukazuju na akutnu, ali i na hroničnu ekspoziciju. Uzevši u obzir podatak da je naša kontrolna grupa bila starija od pacijenata, a sa tim u vezi i duži vremenski period izložena Pb u životnoj sredini, dobijen rezultat je opravdan, međutim potencijalna povezanost između koncentracije Pb u krvi i karcinoma testisa nije pokazana. Značajno više koncentracije Cd i Pb u krvi muškaraca sa karcinomom testisa koji nisu profesionalno izloženi toksičnim metalima u odnosu na zdrave ispitanike pokazane su u studiji *Kaba* i sar. [279], dok su pacijente obolele od *germ cell* karcinoma testisa u studiji *Tariba Lovaković* i sar. [280] pratile samo više koncentracija Pb u odnosu na kontrolnu grupu.

Uočeni obrasci distribucije Cd i Pb u tri kompartmenta ispitanika ove studije nesumnjivo idu u prilog njihovoj prepoznatoj značajnoj ulozi u etiologiji karcinoma i daju jasniju sliku o njihovom toksikološkom profilu kod obolelih od karcinoma testisa. Iako su glavni mehanizmi toksičnosti Cd i Pb zajednički, efekti koji se nalaze u osnovi njihove reproduktivne toksičnosti se ipak i razlikuju. Povećana akumulacija Cd i Pb u tkivu testisa pokazana je u našem eksperimentalnom modelu

(Poglavlje 4.1.1.), a rezultati eksperimentalnih studija istakli su da osim narušavanja krv-testis barijere, oštećenje seminiferoznih tubula i *Sertoli*-jevih ćelija testisa su dozno zavisni efekti reproduktivne toksičnosti Cd [127,185,186,277,281]. Sa druge strane, oštećenje seminiferoznih tubula sa potpunim odsustvom spermatogeneze, hipocelularnost germinativnog epitela sa aktiviranom apoptozom i direktno oštećenje *Leydig*-ovih ćelija su prepoznati efekti reproduktivne toksičnosti Pb [127,282–284].

Kadmijum i olovo su poznati endokrini ometači koji narušavaju normalnu sintezu hormona i/ili njihovu funkciju. Rezultati *cross-sectional* studija sa profesionalno izloženim radnicima Cd ukazali su na značajno niže koncentracije humanih gonadotropina i na pozitivnu korelaciju između koncentracije Cd i FSH u krvi [285], odnosno sa muškarcima koji nisu profesionalno izloženi Cd i Pb istakla je da su smanjenje relativne mase testisa, porast koncentracija estradiola, FSH i testosterona u krvi značajno korelirali sa porastom koncentracija Cd u krvi, ali ne i Pb [68]. Potom, evaluacija podataka NHANES studije ukazala je na jasnu korelaciju između koncentracija Cd/Pb i SHBG, te Pb i testosterona [263]. Jedan od glavnih faktora rizika koji se dovodi u vezu sa nastankom karcinoma testisa je hormonski status individue, a kako su brojne studije potvrdile endokrinu ulogu Cd i Pb, deo istraživanja smo usmerili na ispitivanje hormonskog statusa, kao i na rasvetljavanje eventualne uloge metalohormona Cd i Pb na hormonski status pacijenata sa karcinomom testisa. Značajno niže koncentracije estradiola i testosterona uočene kod pacijenata sa karcinomom testisa naše studije ukazuju na narušenu homeostazu polnih hormona, a dodatnu potvrdu dobili smo primenom regresione analize koja je FSH prepoznala značajnim prediktorom karcinoma testisa (OR=1,04). Može se pretpostaviti da je nedovoljan broj ispitanika bio limitirajuća strana naše studije koja nije uspela da prepozna značajnu razliku između koncentracija humanih gonadotropina, te da je regresiona analiza uspela da je prevaziđe i dodatno potvrdi disbalans polnih hormona kod pacijenata sa karcinomom testisa. Sa druge strane, naša studija nije uspela da utvrdi direktnu uključenost Cd i Pb u narušenu homeostazu polnih hormona, s obzirom da nije bilo značajnih korelacija između koncentracija Cd i Pb i ispitivanih hormona. Suprotno našim rezultatima, pacijente sa *germ cell* karcinomom testisa pratile su značajno više koncentracije FSH, odnosno niže LH, bez promena u nivoima estradiola i testosterona u odnosu na zdrave ispitanike u studiji *Petersen* i sar. [286]. Dok se većina studija koje ispituju reproduktivnu toksičnost Cd i Pb, a koja se dovodi u vezu sa infertilitetom muškaraca, oslanja na smanjen broj, narušenu morfologiju i funkciju spermatozoida [68,69,131,260,262,287–291], mali je broj studija koje dovode u vezu narušenu homeostazu polnih hormona sa karcinomom testisa [286]. Tako je u studiji sa radnicima koji su profesionalno izloženi Pb pokazan smanjen broj i pokretljivost, a povećan udeo abnormalnih formi spermatozoida, koji je pratio i viši nivo estradiola u serumu, međutim nivoi FSH, LH, prolaktina i testosterona su bili u granicama referentnih vrednosti za odabranu populacionu grupu ispitanika [131]. Sa druge strane, pozitivna korelacija pokazana je između koncentracije Pb u krvi sa smanjenim brojem, izmenjenom morfologijom i funkcijom spermatozoida, višim koncentracijama estradiola i testosterona, a nižom prolaktina, kod muškaraca koji nisu profesionalno izloženi Cd i Pb, ističući sinergizam Cd i Pb na povećan nivo testosterona u krvi [69].

Za razliku od nekonzistentnosti prikazanih rezultata humanih studija, eksperimentalne studije potvrđuju značajan endokrini potencijal Cd i Pb, i ojačavaju njihov doprinos narušenoj homeostazi polnih hormona [47,127,185,190,277,281,292–295]. Tako je dozno zavisna smanjena sekrecija testosterona pokazana u *in vitro* modelu sa kulturom ćelija izolovanih iz pacova [296], a značajno niža aktivnost 3β i 17β -hidroksisteroid dehidrogenaze (17β -HSD) u kulturi ćelija testisa [297]. Takođe, rezultati naše studije ukazali su na nižu koncentraciju testosterona u krvi pacova nakon akutne oralne izloženosti Cd, sa izraženijim efektom redukcije pri primeni veće doze Cd.

Utemeljeno saznanje o značajnoj ulozi oksidativnog stresa u raznim patološkim stanjima dobilo je potvrdu i u našoj studiji. Značajno niža PAB vrednost uočena kod pacijenata sa karcinomom testisa,

reprezentovana kroz odnos svih oksidanasa i antioksidanasa, ukazuje na povećanu produkciju slobodnih radikala sa jedne strane, odnosno povećanu potrošnju antioksidanasa sa druge strane. Šta više, PAB je prepoznat i značajnim parametrom u predviđanju karcinoma testisa (OR=0,98). Takođe, obolele od karcinoma testisa karakterisao je trend nižih TAS vrednosti koji dodatno ukazuje o smanjenoj antioksidativnoj zaštiti ove populacione grupe, a visoka frekvenca IMA pozitivnih rezultata (84,6%) u kohorti pacijenata ukazuju da su stanja hipoksije i oksidativnog stresa značajno izmenila strukturu njegovog N-terminalnog regiona i time dodatno opravdala dobijen rezultat. Visoka IMA vrednost pokazana je u kod drugih vrsta karcinoma, ukazujući na značajnu senzitivnost ovog parametra (>80%) kao sekundarnog biomarkera pri postavljanju dijagnoze karcinoma [298]. Potom, korelaciona analiza je prepoznala značajnu pozitivnu korelaciju između TOS i koncentracije Cd u tumorskom tkivu pacijenata, kao i OSI indeksa, i time ukazala na značajan doprinos Cd oksidativnom stresu. Narušena homeostaza oksidativnog statusa, izražena kroz značajno višu aktivnost Cu-ZnSOD u serumu, odnosno niži nivo glutaciona, u odnosu na zdrave ispitanike, pokazana je kod pacijenata sa karcinomom testisa u studiji *Tariba Lovaković i sar.* [280].

Prva saznanja o protektivnoj ulozi Zn na oštećenje tkiva testisa uzrokovano Cd, kada je *s.c.* primena cinka neposredno pre, istovremeno ili 19h nakon aplikacije Cd u potpunosti zaštitila tkivo testisa [64], kao i da deficit cinka stimuliše progresiju proliferativnih lezija [30,32,63], usmerili su naše istraživanje i na ispitavanje profila Zn u tri kompartmenta pacijenata sa karcinomom testisa. Potom, kako se povećane koncentracije bakra dovode u vezu sa izvesnim vrstama karcinoma, s obzirom da je bakar esencijalan kofaktor u procesu angiogeneze tumora, u studiji smo pokušali da objasnimo i njegovu uloga kod karcinoma testisa. Prethodne *in vivo* studije nakon akutne oralne i *i.p.* ekspozicije Cd (30 mg/kg i 1,5 mg/kg) ukazale su na značajno niže koncentracije Cu u tkivu testisa *Swiss* miševa [186], a značajno redukovanje nivoa Cu u tkivu testisa pokazano je i u našem eksperimentalnom modelu nakon akutne oralne izloženosti pacova dvema različitim dozama Cd.

Rezultati naše studije ukazali su na značajno niže koncentracije Cu u krvi pacijenata, dok razlika nije bila statistički značajna za nivo Zn, u odnosu na kontrolnu grupu. Šta više, Cu je prepoznat i značajnim parametrom za predviđanje karcinoma testisa (OR=0,75). Potom, cink je imao karakterističan obrazac distribucije između tumorskog i okolnog zdravog tkiva testisa, koji je išao u prilog tumorskog tkiva, dok redistribucija Cu unutar ispitivanih tkiva testisa nije uočena u ovoj studiji. Suprotno našim rezultatima značajno više koncentracije Cu u tumorskim tkivima u odnosu na zdrava tkiva, pokazane u studiji sa malignitetima više organa, dok razlika nije pokazana za nivo Zn [271]. Potom, u studiji sa pacijentima obolelim od *germ cell* karcinoma testisa pokazana je značajno viša koncentracija Cu u krvi, a niža Zn, u odnosu na zdrave ispitanike [279], dok su ispitanike obolele od karcinoma testisa u studiji *Tariba Lovaković i sar.* [280] pratile više koncentracije i Cu i Zn u krvi.

Uzevši u obzir da su interakcije toksičnih metala sa bioelementima jedan od važnih mehanizama toksičnosti metala [12] i da se toksični metali upliću u kinetiku bioelemenata, korelacije prepoznate u našoj studiji između Cd/Pb i bioelemenata su ih potvrdile. Međutim, iako su promene u koncentracijama Cu i Zn potvrđene kod različitih patologija i u različitim biološkim materijalima [231], što potvrđuju i rezultati naše studije, jedinstveni obrasci distribucije još uvek nisu utemeljeni.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja u sklopu doktorske disertacije, mogu se izneti sledeći zaključci:

- Akutna oralna ekspozicija Cd i/ili Pb *Wistar* pacova ispoljava toksičan efekat na krv i krvotvorne organe, jetru i bubrege sa izraženijim efektom nakon primene smeše.
- Akutna oralna ekspozicija Cd i/ili Pb *Wistar* pacova dovela je do narušene homeostaze testosterona i redistribucije Cu i Zn u prostati i testisima potvrđujući sposobnost Cd i Pb da prolaze krv-testis barijeru.
- Oksidativno oštećenje proteina i lipida kao i značajno snižen antioksidativan potencijal krvi, jetre i bubrega *Wistar* pacova potvrđeni su nakon svih tretmana akutne izloženosti Cd i/ili Pb.
- *Case control* studija sa pacijentkinjama obolelim od karcinoma dojke ukazala je na značajno više koncentracije Cd, odnosno niže Pb u tumorskom u odnosu na okolno zdravo tkivo iste dojke. Značajan *odds ratio* pokazan je za Cd u tkivu izmenjene strukture (1,02). Značajno više koncentracije Cd i Pb potvrđene u tumorskom tkivu ER+ u odnosu na ER negativan karcinom dojke svedoče o metaloestrogenom potencijalu oba metala, odnosno o njihovoj sposobnosti vezivanja za ER. O značajnoj ulozi polnih hormona kod pacijentkinja sa karcinomom dojke svedoče i značajno više koncentracije humanih gonadotropina, kao i niže estradiola koje su potvrđene u ovoj studiji. Oksidativno oštećenje proteina i povišen antioksidativni potencijal krvi pacijentkinja ukazao je na značajnu ulogu oksidativnog stresa kod obolelih od karcinoma dojke. Redistribucija bioelemenata, u prilog tumorskog tkiva dojke, potvrđena je u ovoj studiji.
- *Case control* studija sa pacijentima obolelim od karcinoma prostate ukazala je na značajno više koncentracije Cd u krvi kao i na akumulaciju Cd i Pb u tumorskom tkivu prostate. Značajan *odds ratio* za Cd u krvi iznosio je 1,18. Pacijente sa karcinomom prostate karakterisale su više koncentracije FSH, odnosno niže estradiola. Značajno viša koncentracija Cu, kao i veći Cu/Zn odnos u krvi pratili su pacijente sa karcinomom prostate, a Cu je prepoznat i kao značajan parametar u predikciji karcinoma prostate (OR=1,25).
- *Case control* studija sa pacijentima obolelim od karcinoma testisa ukazala je na značajno više koncentracije Cd u krvi kao i na akumulaciju Cd i Pb u tumorskom tkivu testisa. Značajan *odds ratio* za Cd u krvi iznosio je 1,98, dok dijagnostički značaj Pb u predikciji karcinoma testisa nije prepoznat u ovoj studiji. Pacijente sa karcinomom testisa karakterisale su značajno niže koncentracije estradiola i testosterona. Oksidativno oštećenje albumina kao i niži oksidativni status krvi ukazao je na značajnu ulogu oksidativnog stresa kod obolelih od karcinoma testisa. Niža koncentracija Cu, kao i niži Cu/Zn odnos u krvi karakterisali su pacijente sa karcinomom testisa, a značajan *odds ratio* za Cu u krvi iznosio je 0,75. Uprkos izostanku značajne razlike u nivou Zn u krvi, studija je ukazala na distribuciju Zn ka tumorskom tkivu testisa.

Rezultati sprovedene studije doprinose boljem sagledavanju uloge Cd i Pb u etiologiji karcinoma dojke, prostate i testisa kao i razjašnjavanju mehanizama toksičnog dejstva u ispitivanim organima. Narušena homeostaza oksidativnog statusa, redistribucija bioelemenata kao i promena nivoa polnih hormona, važni mehanizmi toksičnosti koji se nalaze u osnovi toksičnih efekata Cd i Pb, potvrđeni su kod sva tri hormon zavisna karcinoma ove studije.

7. LITERATURA

- [1] L. Järup, Hazards of heavy metal contamination, *Br. Med. Bull.* 68 (2003) 167–182. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>.
- [2] WHO, Action Is Needed on Chemicals of Major Public Health Concern, *Public Heal. Environ.* (2022) 1–4. <https://www.who.int/news-room/photo-story/photo-story-detail/10-chemicals-of-public-health-concern>.
- [3] Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Substance Priority List | ATSDR, Agency Toxic Subst. Dis. Regist. (2019) 1. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/#2019spl> (accessed April 28, 2022).
- [4] G.F. Nordberg, Historical perspectives on cadmium toxicology, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (2009) 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.015>.
- [5] IARC, IARC Monographs A review of Human Carcinogens Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts, 100 (2012) 527.
- [6] S. Janković, D. Nikolić, S. Stefanović, T. Radičević, D. Spirić, Z. Petrović, Procena unosa kadmijuma hranom u Srbiji / Estimated intake of cadmium through food consumption in Serbia, *Tehnol. Mesa / Meat Technol.* 54 (2013) 123–129. <http://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/0494-9846/2013/0494-98461302123J.pdf>.
- [7] FAO, Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Cadmium, *WHO Food Addit. Ser.* 64 (2011) 305–380.
- [8] FAO, JOINT FAO / WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES Ninety-first meeting (Safety evaluation of certain food additives and contaminants) Virtual meeting , 1 – 12 February 2021 SUMMARY AND CONCLUSIONS Issued on 5 March 2021, (2021) 1–17.
- [9] ATSDR, Toxicological Profile for Cadmium, U.S Public Heal. Serv. Agency Toxic Subst. Dis. Regist. (2012) 1–487.
- [10] R. Świergosz-Kowalewska, Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents, *Microsc. Res. Tech.* 55 (2001) 208–222. <https://doi.org/10.1002/jemt.1171>.
- [11] Y. Li, Y. shun Huang, B. He, R. Liu, G. Qu, Y. Yin, J. Shi, L. Hu, G. Jiang, Cadmium-binding proteins in human blood plasma, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 188 (2020) 109896. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109896>.
- [12] G.F. Nordberg, B.A. Fowler, L. Friberg, Factors influencing metabolism and toxicity of metals: A consensus report by the task group on metal interaction, *Environ. Health Perspect.* VOL. 25 (1978) 3–41.
- [13] E. Nieboer, D.H.S. Richardson, The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions, *Environ. Pollut.* 1 (1980) 3–26.
- [14] D. Djukić-Ćosić, M. Ninković, Ž. Maličević, Z. Plamenac-Bulat, V. Matović, Effect of supplemental magnesium on the kidney levels of cadmium, zinc, and copper of mice exposed to toxic levels of cadmium, *Biol. Trace Elem. Res.* 114 (2006) 281–292. <https://doi.org/10.1385/BTER:114:1:281>.
- [15] Z.P. Bulat, D. Djukić-Ćosić, Ž. Maličević, P. Bulat, V. Matović, Zinc or magnesium supplementation modulates Cd intoxication in blood, kidney, spleen, and bone of rabbits, *Biol. Trace Elem. Res.* 124 (2008) 110–117. <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8128-5>.

- [16] Z. Bulat, D. Đukić-Ćosić, B. Antonijević, A. Buha, P. Bulat, Z. Pavlović, V. Matović, Can zinc supplementation ameliorate cadmium-induced alterations in the bioelement content in rabbits?, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 68 (2017) 38–45. <https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-2919>.
- [17] C. Burtis, A. R. Edwrd, D. Bruns, E. Tietz: *Fundamentals of Clinical Chemistry, Sixth*, Saunders-Elsevier, St. Louis, 2008. <https://doi.org/9780721638652>.
- [18] G. Flora, D. Gupta, A. Tiwari, Toxicity of lead: A review with recent updates, *Interdiscip. Toxicol.* 5 (2012) 47–58. <https://doi.org/10.2478/v10102-012-0009-2>.
- [19] S.J.S. Flora, S. Agrawal, *Arsenic, Cadmium, and Lead*, Academic Press, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00031-7>.
- [20] V. Matović, A. Buha, D. Đukić-Ćosić, Z. Bulat, Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys, *Food Chem. Toxicol.* 78 (2015) 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.011>.
- [21] V. Matović, A. Buha, Z. Bulat, D. Đukić-Ćosić, D. Đukić-Ćosić, Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium., *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 62 (2011) 65–76. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-62-2011-2075>.
- [22] H. Gurer-Orhan, E. Ince, D. Konyar, L. Saso, S. Suzen, The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer, *Curr. Med. Chem.* 25 (2017) 4084–4101. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170711114336>.
- [23] J.D. Lee, Q. Cai, X. Shu Ou, S. Nechuta J, The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis : A Systematic Review of the Epidemiologic Literature, *J. Women’s Heal.* 26 (2017). <https://doi.org/10.1089/jwh.2016.5973>.
- [24] G.M. Calaf, U. Urzua, L. Termini, F. Aguayo, Oxidative stress in female cancers, *Oncotarget.* 9 (2018) 23824–23842. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25323>.
- [25] L. Khandrika, B. Kumar, S. Koul, P. Maroni, H.K. Koul, Oxidative stress in prostate cancer, *Cancer Lett.* 282 (2009) 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.12.011>.
- [26] M. Waisberg, P. Joseph, B. Hale, D. Beyersmann, Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicology.* 192 (2003) 95–117. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00305-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00305-6).
- [27] P. Joseph, Mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (2009) 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.011>.
- [28] Y.F. Ahmed, H.A.A. Eldebaky, K.G.M. Mahmoud, M. Nawito, Effects of lead exposure on DNA damage and apoptosis in reproductive and vital organs in female rabbits, *Glob. Vet.* 9 (2012) 401–408. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2012.9.4.6585>.
- [29] A. Rani, A. Kumar, A. Lal, M. Pant, Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: A review, *Int. J. Environ. Health Res.* 24 (2014) 378–399. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.835032>.
- [30] M.P. Waalkes, Cadmium carcinogenesis, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 533 (2003) 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.011>.
- [31] National Toxicology Program, Cadmium and cadmium compounds., *Rep. Carcinog.* 12 (2011) 80–83. <https://doi.org/10.1002/14356007.a04>.
- [32] M.P. Waalkes, Cadmium carcinogenesis in review, *J Inorg. Biochem.* 79 (2000) 241–244.

- [33] T. Zhou, G. Zhou, W. Song, N. Eguchi, W. Lu, E. Lundin, T. Jin, G. Nordberg, Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of p53, c-jun and MT-I genes in testes and ventral prostate of rats, *Toxicology*. 142 (1999) 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00115-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00115-8).
- [34] L. Järup, A. Åkesson, Current status of cadmium as an environmental health problem, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (2009) 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.04.020>.
- [35] S. Satarug, S.H. Garrett, M.A. Sens, D.A. Sens, Cadmium, environmental exposure, and health outcomes, *Environ. Health Perspect.* 118 (2010) 182–190. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901234>.
- [36] A. Buha, D. Wallace, V. Matovic, A. Schweitzer, B. Oluic, D. Micic, V. Djordjevic, Cadmium exposure as a putative risk factor for the development of pancreatic cancer: Three different lines of evidence, *Biomed Res. Int.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/1981837>.
- [37] A. Buha, V. Matovic, B. Antonijevic, Z. Bulat, M. Curcic, E.A.E.A. Renieri, A.M.A.M. Tsatsakis, A. Schweitzer, D. Wallace, Overview of cadmium thyroid disrupting effects and mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19051501>.
- [38] M. Mezynska, M.M. Brzóska, Environmental exposure to cadmium—a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (2018) 3211–3232. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0827-z>.
- [39] WHO/UNEP, WHO | Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, WHO. (2013) 296. https://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/ (accessed April 22, 2019).
- [40] I. Iavicoli, L. Fontana, A. Bergamaschi, The effects of metals as endocrine disruptors, *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.* (2009) 206–223. <https://doi.org/10.1080/10937400902902062>.
- [41] C. Byrne, S.D. Divekar, G.B. Storch, D.A. Parodi, M.B. Martin, Cadmium - A metalloestrogen?, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (2009) 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.025>.
- [42] P.D. Darbre, Metalloestrogens: An emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast, *J. Appl. Toxicol.* 26 (2006) 191–197. <https://doi.org/10.1002/jat.1135>.
- [43] C. Byrne, S.D. Divekar, G.B. Storch, D.A. Parodi, M.B. Martin, Metals and breast cancer, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 18 (2013) 63–73. <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9273-9>.
- [44] IARC, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Inorganic and Organic Lead Compounds, 87 (2006) 529 pp.
- [45] IARC, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the glass manufacturing industry, 58 (1993) 453.
- [46] IARC, Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–130 – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans, Who. (2021) 1–1. <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/> (accessed March 26, 2022).
- [47] A. Lafuente, The hypothalamic-pituitary-gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches, *Food Chem. Toxicol.* 59 (2013) 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.024>.
- [48] S.S. Abadin H, Ashizawa A, Stevens YW, Lladós F, Diamond G, Sage G, Citra M, Quinones A, Bosch SJ, Toxicological Profile for Lead, Agency Toxic Subst. Dis. Regist. (2007) 582. https://doi.org/10.1201/9781420061888_ch106.

- [49] J. Huff, R. Lunn, M.P. Waalkes, L. Tomatis, P. Infante, Cadmium-induced cancers in animals and in humans, *Int J Occup Env. Heal.* 13 (2007) 202–212. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20594>.Use.
- [50] P. Garcia-Morale, N. Kenneyq, N. Kim, D.S. Salomonq, M.M. Gottardisnll, H.B. Solomonn, P.F. Shollern, V.C. Jordan, M.B. Martin, Effect of Cadmium on Estrogen Receptor Levels and Estrogen-induced Responses in Human Breast Cancer Cells, *Biol. Chem.* 269 (1994) 16896–16901. <https://doi.org/10.1577/M07-063.1>.
- [51] M. Mohammadi, A. Riyahi Bakhtiari, S. Khodabandeh, Concentration of Cd, Pb, Hg, and Se in different parts of human breast cancer tissues, *J. Toxicol.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/413870>.
- [52] R. Hilal, A. Ismail, K. Akhtar, R.K. Sherwani, Role of Heavy Metals (Lead and Cadmium) in Malignant Breast Tumors, *J. Pharm. Sci. Innov.* 2 (2013) 6–8. <https://doi.org/10.7897/2277-4572.02565>.
- [53] E. Antila, H. Mussalo-Rauhamaa, M. Kantola, F. Atroshi, T. Westermarck, Association of cadmium with human breast cancer, *Sci. Total Environ.* 186 (1996) 251–256. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05119-4](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05119-4).
- [54] M.M. Gaudet, E.L. Deubler, R.S. Kelly, W. Ryan Diver, L.R. Teras, J.M. Hodge, K.E. Levine, L.G. Haines, T. Lundh, P. Lenner, D. Palli, P. Vineis, I.A. Bergdahl, S.M. Gapstur, S.A. Kyrtpoulos, Blood levels of cadmium and lead in relation to breast cancer risk in three prospective cohorts, *Int. J. Cancer.* 144 (2018) 1010–1016. <https://doi.org/10.1002/ijc.31805>.
- [55] I. Ali, A. Engström, M. Vahter, S. Skerfving, T. Lundh, J. Lidfeldt, G. Samsioe, K. Halldin, A. Åkesson, Associations between cadmium exposure and circulating levels of sex hormones in postmenopausal women, *Environ. Res.* 134 (2014) 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.009>.
- [56] M.D. Kipling, J.A.H. Waterhouse, Cadmium and prostatic carcinoma, *Lancet.* (1967) 730–731.
- [57] R.A. Lemen, J.S. Lee, J.K. Wagoner, H.P. Blejer, Cancer Mortality Among Cadmium Production Workers, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 271 (1976) 273–279. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1976.tb23122.x>.
- [58] L. Zhang, Y. Zhu, R. Hao, M. Shao, Y. Luo, Cadmium Levels in Tissue and Plasma as a Risk Factor for Prostate Carcinoma: a Meta-Analysis, *Biol. Trace Elem. Res.* 172 (2016) 86–92. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0576-0>.
- [59] T. Ye, G.F. Nordberg, X. Jiang, X. Zeng, T. Jin, Q. Kong, Effects on the prostate of environmental cadmium exposure – A cross-sectional population study in China, *BioMetals.* 17 (2004) 559–566. <https://doi.org/10.1023/b:biom.0000045739.89653.67>.
- [60] IARC, Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-121, *IARC Monogr.* (2018) 1–25. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.
- [61] A. Prajapati, A. Rao, J. Patel, S. Gupta, S. Gupta, A single low dose of cadmium exposure induces benign prostate hyperplasia like condition in rat: A novel benign prostate hyperplasia rodent model, *Exp. Biol. Med.* 239 (2014) 829–841. <https://doi.org/10.1177/1535370214536118>.
- [62] A.E. Sahnoun, L.D. Case, S.A. Jackson, G.G. Schwartz, G.G. Schwartz, Cadmium and prostate cancer: A critical epidemiologic analysis, *Cancer Invest.* 23 (2005) 256–263. <https://doi.org/10.1081/CNV-200055968>.
- [63] M.P. Waalkes, S. Rehm, Cadmium and prostate cancer, *J. Toxicol. Environ. Health.* 43 (1994) 251–269. <https://doi.org/10.1080/15287399409531920>.
- [64] J. Parizek, The destructive effect of cadmium ion on testicular tissues and its prevention by zinc,

J.Endocrin. 15 (1957) 56–63.

- [65] M.P. Waalkes, S. Rehm, R.M. Bare, L.A. Poirier, C.W. Riggs, D.E. Devor, M.L. Wenk, J.R. Henneman, Cadmium Carcinogenesis in Male Wistar [CrI:(WI)BR] Rats: Dose-Response Analysis of Effects of Zinc on Tumor Induction in the Prostate, in the Testes, and at the Injection Site, *Cancer Res.* 49 (1989) 4282–4288.
- [66] S. Rehm, M.P. Waalkes, Mixed Sertoli-Leydig Cell Tumor and Rete Testis Adenocarcinoma in Rats Treated with CdCl₂, *Vet. Pathol.* 25 (1988) 163–166. <https://doi.org/10.1177/030098588802500210>.
- [67] R. Krichah, K. Ben Rhouma, D. Hallègue, O. Tébourbi, V. Joulin, D. Couton, M. Sakly, Acute cadmium administration induces apoptosis in rat thymus and testicle, but not liver, *Polish J. Environ. Stud.* 12 (2003) 589–594.
- [68] J. Jurasović, P. Cvitković, A. Pizent, B. Čolak, S. Telišman, Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects, *BioMetals.* 17 (2004) 735–743. <https://doi.org/10.1007/s10534-004-1689-7>.
- [69] S. Telišman, B. Čolak, A. Pizent, J. Jurasović, P. Cvitković, Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men, *Environ. Res.* 105 (2007) 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.05.011>.
- [70] A. Repić, P. Bulat, B. Antonijević, M. Antunović, J. Džudović, A. Buha, Z. Bulat, The influence of smoking habits on cadmium and lead blood levels in the Serbian adult people, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (2020) 751–760. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06840-1>.
- [71] Z.P. Bulat, D. Dukic-Cosic, M. Dokic, P. Bulat, V. Matovic, Blood and urine cadmium and bioelements profile in nickel-cadmium battery workers in Serbia, *Toxicol. Ind. Health.* 25 (2009) 129–135. <https://doi.org/10.1177/0748233709104488>.
- [72] S. Hernberg, Lead Poisoning in a Historical Perspective, *Am. J. Ind. Med.* 38 (2000) 244–254.
- [73] M.A. Riva, A. Lafranconi, M.I.D. Orso, G. Cesana, Lead Poisoning : Historical Aspects of a Paradigmatic “ Occupational and Environmental Disease ,” *Saf. Health Work.* 3 (2012) 11–16.
- [74] M.A. Assi, M.N.M. Hezmee, A.W. Haron, M.Y.M. Sabri, M.A. Rajion, The detrimental effects of lead on human and animal health, *Vet. World.* 9 (2016) 660–671. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.660-671>.
- [75] H. Abadin, J. Klotzbach, J. Taylor, L.G. Diamond, M. Buser, M. Citra, F. Scinicariello, L.L. Chappell, J. Przybyla, L. McIlroy, Toxicological profile for Lead, *Agency Toxic Subst. Dis. Regist.* (2020) 583.
- [76] S. Janković D., Procena rizika pri ekspoziciji organohalogenim kantaminantima i teškim metalima putem hrane, Univerzitet u Beogradu, 2015.
- [77] WHO, Preventing disease through healthy environments Exposure to lead A major public health concern Second edition, Geneva, 2021. <https://www.who.int/teams/environment-climate-change-and-health/chemical-safety-and-health/health-impacts/chemicals/lead>.
- [78] C. Timchalk, Y. Lin, K.K. Weitz, H. Wu, R.A. Gies, D.A. Moore, W. Yantasee, Disposition of lead (Pb) in saliva and blood of Sprague-Dawley rats following a single or repeated oral exposure to Pb-acetate, *Toxicology.* 222 (2006) 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.01.030>.
- [79] S.J. Casas, J. Sordo, Lead Chemistry, Analytical aspects, Environmental Impact and Health Effects, Elsevier, 2006. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52945-9.X5000-3>.
- [80] A. Carocci, A. Catalano, G. Lauria, M.S. Sinicropi, G. Genchi, Lead toxicity, antioxidant defense and

environment, in: *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2016: pp. 45–67.
https://doi.org/10.1007/398_2015_5003.

- [81] A.B. Ishaque, C.K. Klutse, K. MacK, K. Squibb, Differential toxicological interaction among arsenic, cadmium, lead, and mercury on MCF 7 cell line, *Sch. Res. Exch.* 2009 (2009).
<https://doi.org/10.3814/2009/789636>.
- [82] M.B. Martin, R. Reiter, T. Pham, Y.R. Avellanet, J. Camara, M. Lahm, E. Pentecost, K. Pratap, B.A. Gilmore, S. Divekar, R.S. Dagata, J.L. Bull, D. Biochemistry, M.B.M.B. M, Estrogen-Like Activity of Metals in MCF-7 Breast, *Endocrinology*. 144 (2003) 2425–2436. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221054>.
- [83] M.K.J. Siddiqui, S. Srivastava, P.K. Mehrotra, Environmental exposure to lead as a risk for prostate cancer., *Biomed. Environ. Sci.* 15 (2002) 298–305. <https://europepmc.org/article/med/12642986> (accessed June 11, 2018).
- [84] T.P. Ng, H.H. Goh, Y.L. Ng, H.Y. Ong, C.N. Ong, K.S. Chia, S.E. Chia, J. Jeyaratnam, Male endocrine functions in workers with moderate exposure to lead, *Br. J. Ind. Med.* 48 (1991) 485–491.
<https://doi.org/10.1136/oem.48.7.485>.
- [85] M. Sallmén, Exposure to lead and male fertility, *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*. 14 (2001) 219–222.
- [86] M. Vigeš, D.R. Smith, P.C. Hsu, How does lead induce male infertility?, *Iran. J. Reprod. Med.* 9 (2011) 1–8.
- [87] CDC, Blood Lead Reference Value - Lead, Centers Dis. Control. (2021).
<https://www.cdc.gov/ncch/lead/data/blood-lead-reference-value.htm> (accessed April 19, 2022).
- [88] A.L. Wani, A. Ara, J.A. Usmani, Lead toxicity: A review, *Interdiscip. Toxicol.* 8 (2015) 55–64.
<https://doi.org/10.1515/intox-2015-0009>.
- [89] IARC and WHO, Cancer Today, *Int. Agency Res. Cancer World Heal. Organ.* (n.d.).
https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group (accessed November 2, 2021).
- [90] Institut za javno zdravlje Dr Milan Jovanovic Batut, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2015, *Regist. Za Rak u Cent. Srb.* 17 (2017) 1–46. <http://www.batut.org.rs/index.php?content=185>.
- [91] World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, Diet, nutrition, physical activity and breast cancer, *Contin. Updat. Proj. Expert Rep.* 2017. (2017) 120. <https://doi.org/10.1007/s12082-007-0105-4>.
- [92] National Breast Cancer Foundation, BRCA: The Breast Cancer Gene - National Breast Cancer Foundation, (2016). <http://www.nationalbreastcancer.org/what-is-brca> (accessed November 24, 2019).
- [93] B. Stewart, C. Wild, World Cancer Report 2014. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, IARC. (2014) 632. https://www.who.int/cancer/publications/WRC_2014/en/.
- [94] L. Beketić-Orešković, F. Šantek, Karcinom dojke multidisciplinarno liječenje, *Medicinska naklada*, Zagreb, 2018.
- [95] Republička stručna komisija, Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i liječenje raka dojke, (n.d.) 1–50.
- [96] J. Horn, L.J. Vatten, Reproductive and hormonal risk factors of breast cancer : a historical perspective, *Int*

J Women's Heal. 9 (2017) 265–272.

- [97] Collaborative Group of Hormonal factors in Breast Cancer, Menarche, menopause, and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies, *Lancet Oncol.* 13 (2012) 1141–1151. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70425-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70425-4).
- [98] H. Samavat, M. Kurzer S, Estrogen metabolism and breast cancer, *Cancer Lett.* 356 (2015) 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.018>.
- [99] S. Ando, L. Gelsomino, S. Panza, C. Giordano, D. Bonofiglio, I. Barone, S. Catalino, Obesity, Leptin and Breast Cancer: Epidemiological Evidence and Proposed Mechanisms, *Cancers (Basel)*. 11 (2019) 1–27. <https://doi.org/10.3390/cancers11010062>.
- [100] P. Rawla, Epidemiology of prostate cancer. Review, *World J Oncol.* 10 (2019) 63–89. <https://doi.org/doi:https://doi.org/10.14740/wjon1191>.
- [101] M.F. Leitzmann, S. Rohrmann, Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates, *Clin. Epidemiol.* 4 (2012) 1–11. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S16747>.
- [102] G. Cserni, Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time, *Pathologica.* 112 (2020) 25–41. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-1-20>.
- [103] Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women : a collaborative reanalysis of individual participant, *Lancet Oncol.* 14 (2013) 1009–1019. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70301-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70301-2).
- [104] P.M.R. Cruz, H. Mo, W.J. McConathy, N. Sabnis, A.G. Lacko, The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: A review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics, *Front. Pharmacol.* 4 SEP (2013). <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00119>.
- [105] A.M. Abdel-Moneim, M.Y. El-Toweissy, A.M. Ali, A.A.M. Awad Allah, H.S. Darwish, I.A. Sadek, Curcumin Ameliorates Lead (Pb²⁺)-Induced Hemato-Biochemical Alterations and Renal Oxidative Damage in a Rat Model, *Biol. Trace Elem. Res.* 168 (2015) 206–220. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0360-1>.
- [106] L. Cedó, S.T. Reddy, E. Mato, F. Blanco-Vaca, J.C. Escolà-Gil, HDL and LDL: Potential New Players in Breast Cancer Development, *J. Clin. Med.* 8 (2019) 853. <https://doi.org/10.3390/jcm8060853>.
- [107] E. Kristal-Boneh, D. Coller, P. Froom, G. Harari, J. Ribak, The association between occupational lead exposure and serum cholesterol and lipoprotein levels, *Am. J. Public Health.* 89 (1999) 1083–1087. <https://doi.org/10.2105/AJPH.89.7.1083>.
- [108] H. Xu, Y. Mao, B. Xu, Y. Hu, Low-level environmental lead and cadmium exposures and dyslipidemia in adults: Findings from the NHANES 2005–2016, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 63 (2021) 126651. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126651>.
- [109] M.M. Gaudet, E.L. Deubler, R.S. Kelly, W. Ryan Diver, L.R. Teras, J.M. Hodge, K.E. Levine, L.G. Haines, T. Lundh, P. Lenner, D. Palli, P. Vineis, I.A. Bergdahl, S.M. Gapstur, S.A. Kyrtpoulos, Blood levels of cadmium and lead in relation to breast cancer risk in three prospective cohorts, *Int. J. Cancer.* 144 (2019) 1010–1016. <https://doi.org/10.1002/ijc.31805>.
- [110] M.K.J. Siddiqui, Jyoti, S. Singh, P.K. Mehrotra, K. Singh, R. Sarangi, Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: An Indian study, *Environ. Int.* 32 (2006) 630–637. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.02.002>.

- [111] D.G. Bostwick, H.B. Burke, D. Djakiew, S. Euling, S.M. Ho, J. Landolph, H. Morrison, B. Sonawane, T. Shifflett, D.J. Waters, B. Timms, Human prostate cancer risk factors, *Cancer*. 101 (2004) 2371–2490. <https://doi.org/10.1002/cncr.20408>.
- [112] P. Pilie, V. Giri, K. Cooney, HOXB13 and other high penetrant genes for prostate cancer, *Asian J. Androl.* 18 (2016) 530–532. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.175785>.
- [113] V.N. Giri, J.L. Beebe-Dimmer, Familial prostate cancer, *Semin. Oncol.* 43 (2016) 560–565. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.08.001>.
- [114] L.Q. Qin, P.Y. Wang, T. Kaneko, K. Hoshi, A. Sato, Estrogen: One of the risk factors in milk for prostate cancer, *Med. Hypotheses*. 62 (2004) 133–142. [https://doi.org/10.1016/S0306-9877\(03\)00295-0](https://doi.org/10.1016/S0306-9877(03)00295-0).
- [115] M. Ilić, H. Vlajinac, J. Marinković, Case-control study of risk factors for prostate cancer, *Br. J. Cancer*. 74 (1996) 1682–1686. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.610>.
- [116] S. Guzel, L. Kiziler, B. Aydemir, B. Alici, S. Ataus, A. Aksu, H. Durak, Association of Pb, Cd, and Se concentrations and oxidative damage-related markers in different grades of prostate carcinoma, *Biol. Trace Elem. Res.* 145 (2012) 23–32. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9162-2>.
- [117] M.A. Qayyum, M.H. Shah, Comparative Study of Trace Elements in Blood , Scalp Hair and Nails of Prostate Cancer Patients in Relation to Healthy Donors, *Biol. Trace Elem. Res.* 162 (2014) 46–57. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0123-4>.
- [118] S. Ju-Kun, D.B. Yuan, H.F. Rao, T.F. Chen, B.S. Luan, X.M. Xu, F.N. Jiang, W. De Zhong, J.G. Zhu, Association between Cd Exposure and Risk of Prostate Cancer, *Med. (United States)*. 95 (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002708>.
- [119] G. Doolan, G. Benke, G. Giles, An update on occupation and prostate cancer, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 15 (2014) 501–516. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.2.501>.
- [120] M.S. Fahim, N.K. Khare, Effects of Subtoxic Levels of Lead and Cadmium on Urogenital Organs of Male Rats, *Arch. Androl.* 4 (1980) 357–362. <https://doi.org/10.3109/01485018008986982>.
- [121] American Cancer Society, Testicular Cancer What is testicular cancer ?, 2014. <https://www.cancer.org/>.
- [122] B. Jakovljević, Tumori testisa, Alvogen Pharma doo, Banja Luka, 2019.
- [123] L. De Toni, I. Šabovic, I. Cosci, M. Ghezzi, C. Foresta, A. Garolla, Testicular cancer: Genes, environment, hormones, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 10 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00408>.
- [124] A. Vega, M. Baptissart, F. Caira, F. Brugnon, J.M.A. Lobaccaro, D.H. Volle, Epigenetic: A molecular link between testicular cancer and environmental exposures, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 3 (2012) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00150>.
- [125] S. Shojaeepour, S. Dabiri, B. Dabiri, M. Imani, M.F.S. Abadi, F. Hashemi, Histopathological findings of testicular tissue following cadmium toxicity in rats, Iran. *J. Pathol.* 16 (2021) 348–353. <https://doi.org/10.30699/ijp.2021.130581.2443>.
- [126] R.A.R. Elgawish, M.E. Ghanem, Effect of long term cadmium chloride exposure on testicular functions in Male Albino rats, *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 9 (2014) 182–188. <https://doi.org/10.3844/ajavssp.2014.182.188>.
- [127] N. Mathur, G. Pandey, G.C. Jain, Male reproductive toxicity of some selected metals: A review, (2010) 396–404.

- [128] A.M. Taiwo, S.O. Ige, O.O. Babalola, Assessments of possible gonadotoxic effect of lead on experimental male rabbits, *Glob. Vet.* 5 (2010) 282–286.
- [129] N. Biswas, P. Ghosh, Effect of lead on male gonadal activity in Albino rats, *Kathmandu Univ. Med. J.* 2 (2004) 43–46. <https://doi.org/10.1111/anae.13332>.
- [130] N. Pant, G. Kumar, A.D. Upadhyay, Y.K. Gupta, P.K. Chaturvedi, Correlation between lead and cadmium concentration and semen quality, *Andrologia.* 47 (2015) 887–891. <https://doi.org/10.1111/and.12342>.
- [131] S. Tališman, P. Cvitković, J. Jurasović, A. Pizent, M. Gavella, B. Ročić, Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men, *Environ. Health Perspect.* 108 (2000) 45–53. <https://doi.org/10.1289/ehp.0010845>.
- [132] S. Pawa, S. Ali, Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: Protection by oxyanionic form of tungsten, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1688 (2004) 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2003.12.004>.
- [133] M.J. Girotti, N. Khan, B.A. McLellan, Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients., *J. Trauma.* 31 (1991) 32–5.
- [134] C. David, M. Gornall, A. Bardawill, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, *J.Biol.Chem.* 177 (1949) 751–766.
- [135] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [136] O. Erel, A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clin. Biochem.* 37 (2004) 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>.
- [137] O. Erel, A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>.
- [138] V. Witko-Sarsat, M. Friedlander, C. Capeillère-Blandin, T. Nguyen-Khoa, A.T. Nguyen, J. Zingraff, P. Jungers, B. Descamps-Latscha, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney Int.* 49 (1996) 1304–1313. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>.
- [139] I. Misra, H.P., Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175.
- [140] R.J. Richter, C.E. Furlong, Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping, *Pharmacogenet. Genomics.* 9 (1999) 745–754. <https://doi.org/10.1097/01213011-199912000-00009>.
- [141] D.H. Alamdari, K. Paletas, T. Pegiou, M. Sarigianni, C. Befani, G. Koliakos, A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.10.017>.
- [142] C. Auclair, E. Voisen, R.A. Greenwald, Nitroblue tetrazolium reduction. *Handbook of methods for oxygen radical research*, Greenwald, CRC Press, Boca Raton, FL :, 1985.
- [143] F. Veglia, G. Cighetti, M. De Franceschi, L. Zingaro, L. Boccotti, E. Tremoli, V. Cavalca, Age- and gender-related oxidative status determined in healthy subjects by means of OXY-SCORE, a potential new comprehensive index, *Biomarkers.* 11 (2006) 562–573.

<https://doi.org/10.1080/13547500600898623>.

- [144] A. Heidenreich, J. Bellmunt, M. Bolla, S. Joniau, M. Mason, V. Matveev, N. Mottet, H.-P. Schmid, T. van der Kwast, T. Wiegel, F. Zattoni, EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Treatment of Clinically Localised Disease, *Eur. Urol.* 59 (2011) 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.10.039>.
- [145] Prostate Cancer Foundation, What is a Gleason Score?, (n.d.). <https://www.pcf.org/about-prostate-cancer/diagnosis-staging-prostate-cancer/gleason-score-isup-grade/> (accessed January 14, 2022).
- [146] B. Wu, Z. Liu, Y. Xu, D. Li, M. Li, Combined toxicity of cadmium and lead on the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 81 (2012) 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.05.003>.
- [147] X. Wu, S.J. Cobbina, G. Mao, H. Xu, Z. Zhang, L. Yang, A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2016) 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>.
- [148] E.L. Massó, L. Corredor, M.T. Antonio, Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/or cadmium, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 21 (2007) 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.03.002>.
- [149] S. Yildirim, F.C. Celikezen, G. Oto, E. Sengul, M. Bulduk, M. Tasdemir, D. Ali Cinar, An investigation of protective effects of lithium borate on blood and histopathological parameters in acute cadmium-induced rats, *Biol. Trace Elem. Res.* 182 (2018) 287–294. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1089-9>.
- [150] J. Mladenović, B. Ognjanović, N. Dordević, M. Matić, V. Knežević, A. Štajn, Z. Saičić, Protective effects of oestradiol against cadmium-induced changes in blood parameters and oxidative damage in rats, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 65 (2014) 37–46. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-65-2014-2405>.
- [151] R. Karmakar, R. Bhattacharya, M. Chatterjee, Biochemical, haematological and histopathological study in relation to time-related cadmium-induced hepatotoxicity in mice, *BioMetals.* 13 (2000) 231–239. <https://doi.org/10.1023/A:1009279803842>.
- [152] M. El-Boshy, A. Ashshi, M. Gaith, N. Qusty, T. Bokhary, N. AlTaweel, M. Abdelhady, Studies on the protective effect of the artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against cadmium toxicity-induced oxidative stress, hepatorenal damage, and immunosuppressive and hematological disorders in rats, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 12372–12383. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8876-x>.
- [153] M.E. El-Boshy, E.F. Risha, F.M. Abdelhamid, M.S. Mubarak, T. Ben Hadda, Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29 (2015) 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.05.009>.
- [154] A. Lafuente, A. González-Carracedo, A. Romero, A.I. Esquifino, Effect of cadmium on lymphocyte subsets distribution in thymus and spleen, *J. Physiol. Biochem.* 59 (2003) 43–48. <https://doi.org/10.1007/BF03179867>.
- [155] M. Ćurčić, Subakutna toksičnost smeše dekabromovanog difeniletra i kadmijuma kod pacova, Univerzitet u Beogradu, 2015.
- [156] S.J. Cobbina, Y. Chen, Z. Zhou, X. Wu, T. Zhao, Z. Zhang, W. Feng, W. Wang, Q. Li, X. Wu, L. Yang, Toxicity assessment due to sub-chronic exposure to individual and mixtures of four toxic heavy metals, *J. Hazard. Mater.* 294 (2015) 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.03.057>.
- [157] T.O. Omobowale, A.A. Oyagbemi, A.S. Akinrinde, A.B. Saba, O.T. Daramola, B.S. Ogunpolu, J.O.

Olopade, Failure of recovery from lead induced hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defence system in Wistar rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37 (2014) 1202–1211. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.03.002>.

- [158] H.M. Abdou, M.A. Hassan, Protective role of omega-3 polyunsaturated fatty acid against lead acetate-induced toxicity in liver and kidney of female rats, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/435857>.
- [159] V. Sharma, A. Sharma, L. Kansal, The effect of oral administration of *Allium sativum* extracts on lead nitrate induced toxicity in male mice, *Food Chem. Toxicol.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.002>.
- [160] J. Djokic, M. Ninkov, I. Mirkov, A. Popov Aleksandrov, L. Zolotarevski, D. Kataranovski, M. Kataranovski, Differential effects of cadmium administration on peripheral blood granulocytes in rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37 (2014) 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.11.026>.
- [161] M. Kataranovski, S. Janković, D. Kataranovski, J. Stošić, D. Bogojević, Gender differences in acute cadmium-induced systemic inflammation in rats, *Biomed. Environ. Sci.* 22 (2009) 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(09\)60014-3](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(09)60014-3).
- [162] A. Sharma, V. Sharma, L. Kansal, Amelioration of lead-induced hepatotoxicity by *Allium sativum* extracts in Swiss albino mice, *Libyan J. Med.* (2010). <https://doi.org/10.3402/ljm.v5i0.4621>.
- [163] R.C. Patra, A.K. Rautray, D. Swarup, Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration, *Vet. Med. Int.* 2011 (2011). <https://doi.org/10.4061/2011/457327>.
- [164] a Buha, Z. Bulat, D. Dukic-Cosic, V. Matovic, Effects of oral and intraperitoneal magnesium treatment against cadmium-induced oxidative stress in plasma of rats, *Arh Hig Rada Toksikol.* 63 (2012) 247–254. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2217>.
- [165] M.J. Olisekodiaka, C.A. Igbeneghu, A.J. Onuegbu, R. Oduru, A.O. Lawal, Lipid, lipoproteins, total antioxidant status and organ changes in rats administered high doses of cadmium chloride, *Med. Princ. Pract.* 21 (2012) 156–159. <https://doi.org/10.1159/000333385>.
- [166] M. Curcic, A. Buha, S. Stankovic, V. Milovanovic, Z. Bulat, D. Đukić-Ćosić, E. Antonijević, S. Vučinić, V. Matović, B. Antonijevic, Interactions between cadmium and decabrominated diphenyl ether on blood cells count in rats—Multiple factorial regression analysis, *Toxicology.* 376 (2017) 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.05.011>.
- [167] G. Yuan, S. Dai, Z. Yin, H. Lu, R. Jia, J. Xu, X. Song, L. Li, Y. Shu, X. Zhao, Toxicological assessment of combined lead and cadmium: Acute and sub-chronic toxicity study in rats, *Food Chem. Toxicol.* 65 (2014) 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.041>.
- [168] M. Vašák, Advances in metallothionein structure and functions, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19 (2005) 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.03.003>.
- [169] N. Ballatori, Transport of toxic metals by molecular mimicry, *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 689–694. <https://doi.org/10.1016/j.knosys.2013.06.001>.
- [170] J.D. Park, Y. Liu, C.D. Klaassen, Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals, *Toxicology.* 163 (2001) 93–100. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00375-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00375-4).
- [171] A. Pillai, S. Gupta, Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver of female rats co-exposed to lead and cadmium: Effects of vitamin E and Mn²⁺, *Free Radic. Res.* 39 (2005) 707–712. <https://doi.org/10.1080/10715760500092444>.

- [172] D. Djukić-Ćosić, M. Ćurčić Jovanović, Z. Plamenac Bulat, M. Ninković, Ž. Maličević, V. Matović, Relation between lipid peroxidation and iron concentration in mouse liver after acute and subacute cadmium intoxication, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 22 (2008) 66–72. <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2007.09.024>.
- [173] M. Pande, A. Mehta, B.P. Pant, S.J.S. Flora, Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9 (2001) 173–184. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(01\)00064-3](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(01)00064-3).
- [174] R. Sivaprasad, M. Nagaraj, P. Varalakshmi, Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver, *J. Nutr. Biochem.* 15 (2004) 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2003.09.001>.
- [175] H. Zhu, Y. Jia, H. Cao, F. Meng, X. Liu, Biochemical and histopathological effects of subchronic oral exposure of rats to a mixture of five toxic elements, *Food Chem. Toxicol.* 71 (2014) 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.005>.
- [176] Z. Bulat, D. Đukić-Ćosić, B. Antonijević, P. Bulat, D. Vujanović, A. Buha, V. Matović, D. Đukić-Osić, B. Antonijević, P. Bulat, D. Vujanović, A. Buha, V. Matović, Effect of magnesium supplementation on the distribution patterns of zinc, copper, and magnesium in rabbits exposed to prolonged cadmium intoxication, *Sci. World J.* 2012 (2012) 1–9. <https://doi.org/10.1100/2012/572514>.
- [177] V. Matović, Z.P. Bulat, D. Djukić-Ćosić, D. Soldatović, Antagonism between cadmium and magnesium: A possible role of magnesium in therapy of cadmium intoxication, *Magnes. Res.* 23 (2010) 19–26. <https://doi.org/10.1684/mrh.2010.0196>.
- [178] V. Matović, A. Buha, Z. Bulat, D. Đukić-Ćosić, M. Miljković, J. Ivanišević, J. Kotur-Stevuljević, Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 552–557. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.035>.
- [179] H.C. Gonick, Nephrotoxicity of cadmium & lead, *Indian J. Med. Res.* 128 (2008) 335–352.
- [180] I. Silins, J. Högberg, Combined toxic exposures and human health: Biomarkers of exposure and effect, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 8 (2011) 629–647. <https://doi.org/10.3390/ijerph8030629>.
- [181] G.F. Nordberg, Cadmium and health in the 21st Century - Historical remarks and trends for the future, *BioMetals.* 17 (2004) 485–489. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000045726.75367.85>.
- [182] S. Yalin, U. Comelekoglu, S. Bagis, N.O. Sahin, O. Ogenler, R. Hatungil, Acute effect of single-dose cadmium treatment on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in ovariectomized rats, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65 (2006) 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.06.006>.
- [183] A.I. Othman, M.A. El Missiry, Role of selenium against lead toxicity in male rats, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 12 (1998) 345–349. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0461\(1998\)12:6<345::AID-JBT4>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0461(1998)12:6<345::AID-JBT4>3.0.CO;2-V).
- [184] C.J. Borgert, B. Price, C.S. Wells, G.S. Simon, Evaluating chemical interaction studies for mixture risk assessment, *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* (2001). <https://doi.org/10.1080/20018091094376>.
- [185] P. Massanyi, M. Massanyi, R. Madeddu, R. Stawarz, N. Lukač, Effects of Cadmium, Lead, and Mercury on the Structure and Function of Reproductive Organs, *Toxics.* 8 (2020) 31. <https://doi.org/10.3390/toxics8040094>.
- [186] V.G.S. Mouro, A.L.P. Martins, J. Silva, T.P. Menezes, M.L.M. Gomes, J.A. Oliveira, F.C.S.A. Melo, S.L.P. Matta, Subacute testicular toxicity to cadmium exposure intraperitoneally and orally, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/3429635>.

- [187] B.I. Ognjanović, S.D. Marković, N.Z. Dordević, I.S. Trbojević, A.Š. Štajn, Z.S. Saičić, Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E, *Reprod. Toxicol.* 29 (2010) 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.11.009>.
- [188] S.M. Alvarez, N.N. Gómez, L. Scardapane, F. Zirulnik, D. Martínez, M.S. Giménez, Morphological changes and oxidative stress in rat prostate exposed to a non-carcinogenic dose of cadmium, *Toxicol. Lett.* 153 (2004) 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.06.004>.
- [189] W.. El-Tohamy, M.M., and El-Nattat, Effect of Antioxidant on Lead-Induced Oxidative Damage and Reproductive Dysfunction in Male Rabbits, *J. Am. Sci.* 6 (2010) 613–622.
- [190] Y. Ren, W. Shao, L. Zuo, W. Zhao, H. Qin, Y. Hua, D. Lu, C. Mi, S. Zeng, L. Zu, Mechanism of cadmium poisoning on testicular injury in mice, *Oncol. Lett.* 18 (2019) 1035–1042. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10418>.
- [191] K.P. Cantor, P.A. Stewart, L.A. Brinton, M. Dosemeci, Occupational exposures and female breast cancer mortality in the United States, *J. Occup. Environ. Med.* 37 (1995) 336–348. <https://doi.org/10.1097/00043764-199503000-00011>.
- [192] C. Fenga, Occupational exposure and risk of breast cancer (Review), *Biomed. Reports.* 4 (2016) 282–292. <https://doi.org/10.3892/br.2016.575>.
- [193] L. Garcia-Estevez, G. Moreno-Bueno, Updating the role of obesity and cholesterol in breast cancer, *Breast Cancer Res.* 21 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1124-1>.
- [194] IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Alcohol Consumption and Ethyl Carbamate, *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Humans.* 96 (2010). <https://doi.org/10.1136/jcp.48.7.691-a>.
- [195] A. Stojsavljević, S. Borković-Mitić, L. Vujotić, D. Grujičić, M. Gavrović-Jankulović, D. Manojlović, The human biomonitoring study in Serbia: Background levels for arsenic, cadmium, lead, thorium and uranium in the whole blood of adult Serbian population, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169 (2019) 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.043>.
- [196] S. Satarug, Cadmium sources and toxicity, *Toxics.* 7 (2019) 7–9. <https://doi.org/10.3390/TOXICS7020025>.
- [197] R. V. Caruso, R.J. O'Connor, W.E. Stephens, K.M. Cummings, G.T. Fong, Toxic metal concentrations in cigarettes obtained from U.S. smokers in 2009: Results from the International Tobacco Control (ITC) United States survey cohort, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 11 (2013) 202–217. <https://doi.org/10.3390/ijerph110100202>.
- [198] J.J. Piadé, G. Jaccard, C. Dolka, M. Belushkin, S. Wajrock, Differences in cadmium transfer from tobacco to cigarette smoke, compared to arsenic or lead, *Toxicol. Reports.* 2 (2015) 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.11.005>.
- [199] H. Romanowicz-Makowska, E. Forma, M. Bryś, W. Małgorzata Krajewska, B. Smolarz, Concentration of cadmium, nickel and aluminium in female breast cancer, *Polish J. Pathol.* 62 (2011) 257–261.
- [200] Q. Pasha, S.A. Malik, J. Iqbal, N. Shaheen, M.H. Shah, Comparative evaluation of trace metal distribution and correlation in human malignant and benign breast tissues, *Biol. Trace Elem. Res.* 125 (2008) 30–40. <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8158-z>.
- [201] J.G. Ionescu, J. Novotny, V. Stejskal, A. Lätsch, E. Blaurock-Busch, M. Eisenmann-Klein, Increased levels of transition metals in breast cancer tissue, *Neuroendocrinol. Lett.* 27 (2006) 36–39.

- [202] L. Strumylaite, A. Bogusevicius, O. Abdrachmanovas, D. Baranauskiene, R. Kregzdyte, D. Pranys, L. Poskiene, Cadmium concentration in biological media of breast cancer patients, *Breast Cancer Res. Treat.* 125 (2011) 511–517. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1007-8>.
- [203] V.R. Djordjevic, D.R. Wallace, A. Schweitzer, N. Boricic, D. Knezevic, S. Matic, N. Grubor, M. Kerkez, D. Radenkovic, Z. Bulat, B. Antonijevic, V. Matovic, A. Buha, Environmental cadmium exposure and pancreatic cancer: Evidence from case control, animal and in vitro studies, *Environ. Int.* 128 (2019) 353–361. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.048>.
- [204] M. Yaman, D. Atici, S. Bakirdere, I. Akdeniz, Comparison of trace metal concentrations in malign and benign human prostate, *J Med Chem.* 48 (2005) 630–634.
- [205] A. Stojsavljević, B. Rovčanin, Đ. Krstić, J. Jagodić, S. Borković-Mitić, I. Paunović, V. Živaljević, B. Mitić, M. Gavrović-Jankulović, D. Manojlović, Cadmium as main endocrine disruptor in papillary thyroid carcinoma and the significance of Cd/Se ratio for thyroid tissue pathophysiology, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 55 (2019) 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.06.009>.
- [206] D. Il'yasova, G.G. Schwartz, Cadmium and renal cancer, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 (2005) 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.12.005>.
- [207] J. Millos, M. Costas-Rodríguez, I. Lavilla, C. Bendicho, Multielemental determination in breast cancerous and non-cancerous biopsies by inductively coupled plasma-mass spectrometry following small volume microwave-assisted digestion, *Anal. Chim. Acta.* 622 (2008) 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.066>.
- [208] N.B. Aquino, M.B. Seigny, J. Sabangan, M.C. Louie, The role of cadmium and nickel in estrogen receptor signaling and breast cancer: Metalloestrogens or not?, *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 30 (2012) 189–224. <https://doi.org/10.1080/10590501.2012.705159>.
- [209] B. Bier, A. Douglas-Jones, M. Tötsch, B. Dockhorn-Dworniczak, W. Böcker, B. Jasani, K.W. Schmid, Immunohistochemical demonstration of metallothionein in normal human breast tissue and benign and malignant breast lesions, *Breast Cancer Res. Treat.* 30 (1994) 213–221. <https://doi.org/10.1007/BF00665963>.
- [210] B. Wierzowiecka, A. Gomulkiewicz, L. Cwynar-Zajac, M. Olbromski, J. Grzegorzolka, C. Kobierzycki, M. Podhorska-Okolow, P. Dziegiel, Expression of Metallothionein and Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms in Breast Cancer Cells, *In Vivo.* 30 (2016) 271–278.
- [211] F.A. Sampaio, L.M. Martins, C.S. de M.E. Dourado, C.M.S. Revoredo, D.R. Costa-Silva, V.A. de Oliveira, F.A. Alves-Ribeiro, B.B. da Silva, A case-control study of Metallothionein-1 expression in breast cancer and breast fibroadenoma, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–5. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43565-0>.
- [212] R. Blamey, J. Collins, P.G. Crosignani, E. Diczfalusy, L.A.J. Heinemann, C. La Vecchia, G. Reeves, I.E. Smith, D. Trichopoulos, E. Arisi, D.T. Baird, G. Benagiano, G.C. Frigerio, A. Glasier, K. Schmidt-Gollwitzer, S.O. Skouby, A. Volpe, Hormones and breast cancer, *Hum. Reprod. Update.* 10 (2004) 281–293. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh025>.
- [213] L. Strumylaite, K. Mechnosina, S. Tamasauskas, Environmental factors and breast cancer, *Med. Kaunas.* 46 (2010) 867–73.
- [214] N.B. Aquino, M.B. Seigny, J. Sabangan, M.C. Louie, Breast Cancer : Metalloestrogens or Not ?, *J. Env. Sci Heal.* 30(3) (2013) 189–224. <https://doi.org/10.1080/10590501.2012.705159>.Role.
- [215] J.D. Yager, N.E. Davidson, Estrogen carcinogenesis in breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006).

<https://doi.org/10.1056/NEJMra050776>.

- [216] M.D. Johnson, N. Kenney, A. Stoica, L. Hilakivi-Clarke, B. Singh, G. Chepko, R. Clarke, P.F. Sholler, A.A. Lirio, C. Foss, R. Reiter, B. Trock, S. Paik, M.B. Martin, Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland, *Nat. Med.* 9 (2003) 1081–1084. <https://doi.org/10.1038/nm902>.
- [217] M. Nasiadek, M. Danilewicz, K. Sitarek, E. Świątkowska, A. Daragó, J. Stragierowicz, A. Kilanowicz, The effect of repeated cadmium oral exposure on the level of sex hormones, estrous cyclicity, and endometrium morphometry in female rats, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (2018) 28025–28038. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2821-5>.
- [218] P.E. Lønning, H. Helle, N.K. Duong, D. Ekse, T. Aas, J. Geisler, Tissue estradiol is selectively elevated in receptor positive breast cancers while tumour estrone is reduced independent of receptor status, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 117 (2009) 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.06.005>.
- [219] S.E. Hankinson, A.H. Eliassen, Circulating sex steroids and breast cancer risk in premenopausal women, *Horm. Cancer.* 1 (2010) 2–10. <https://doi.org/10.1007/s12672-009-0003-0>.
- [220] E. Egiebor, A. Tulu, N. Abou-Zeid, I.T. Aighewi, A. Ishaque, The kinetic signature of toxicity of four heavy metals and their mixtures on mcf7 breast cancer cell line, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 10 (2013) 5209–5220. <https://doi.org/10.3390/ijerph10105209>.
- [221] D. Javorac, B. Antonijević, M. Anđelković, A. Repić, P. Bulat, A.B. Djordjevic, K. Baralić, D. Đukić-Ćosić, T. AntoniĆ, Z. Bulat, Oxidative stress, metallomics and blood toxicity after subacute low-level lead exposure in Wistar rats: Benchmark dose analyses, *Environ. Pollut.* (2021) 118103. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.118103>.
- [222] M. Anđelković, A.B. Djordjevic, E.A. Miljaković, D. Javorac, N. Čolaković, S. Oprić, S. Petričević, M. Granić, J. Kotur-Stevuljević, B. Antonijević, Z. Bulat, Cadmium tissue level in women diagnosed with breast cancer – A case control study, *Environ. Res.* 199 (2021) 111300. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111300>.
- [223] F.C. Eraldemir, N. Üren, T. Kum, B. Erbay, D. Sahin, E. Ergül, E. Acar, D. Özsoy, M. Çekmen, H. Klr, Z. Utkan, Association of serum paraoxonase 1 activities, polymorphisms and oxidative stress in breast cancer patients with type 2 diabetes mellitus, *J. Med. Biochem.* 38 (2019) 368–375. <https://doi.org/10.2478/jomb-2018-0043>.
- [224] N. Badid, F.Z. Baba Ahmed, H. Merzouk, S. Belbraouet, N. Mokhtari, S.A. Merzouk, R. Benhabib, D. Hamzaoui, M. Narce, Oxidant/antioxidant status, lipids and hormonal profile in overweight women with breast cancer, *Pathol. Oncol. Res.* 16 (2010) 159–167. <https://doi.org/10.1007/s12253-009-9199-0>.
- [225] R.K. Gupta, A.K. Patel, R. Kumari, S. Chugh, C. Shrivastav, S. Mehra, A.N. Sharma, Interactions between Oxidative Stress, Lipid Profile and Antioxidants in Breast Cancer: A Case Control Study, 13 (2012) 6295–6298.
- [226] A. Gönenç, D. Erten, S. Aslan, M. Akinci, B. Şimşek, M. Torun, Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease, *Cell Biol. Int.* 30 (2006) 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.02.005>.
- [227] X. Gào, T. Wilsgaard, E.H.J.M. Jansen, Y. Xuan, A. Anusriti, H. Brenner, B. Schöttker, Serum total thiol levels and the risk of lung, colorectal, breast and prostate cancer: A prospective case–cohort study, *Int. J. Cancer.* 146 (2020) 1261–1267. <https://doi.org/10.1002/ijc.32428>.
- [228] J. Kasapović, S. Pejić, A. Todorović, V. Stojiljković, S. Pajović, Antioxidant status and lipid peroxidation

in the blood of breast cancer patients of different ages, *Cell Biochem. Funct.* 26 (2008) 320–328.
<https://doi.org/10.1002/cbf>.

- [229] J.F. Feng, L. Lu, P. Zeng, Y.H. Yang, J. Luo, Y.W. Yang, D. Wang, Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients, *Int. J. Clin. Oncol.* 17 (2012) 575–583.
<https://doi.org/10.1007/s10147-011-0327-y>.
- [230] S. Radenkovic, Z. Milosevic, G. Konjevic, K. Karadzic, B. Rovcanin, M. Buta, K. Gopcevic, V. Jurisic, Lactate dehydrogenase, Catalase, and Superoxide dismutase in Tumor Tissue of Breast Cancer Patients in Respect to Mammographic Findings, *Cell Biochem. Biophys.* 66 (2013) 287–295.
<https://doi.org/10.1007/s12013-012-9482-7>.
- [231] B.X. Hoang, B. Han, D.G. Shaw, M. Nimni, Zinc as a possible preventive and therapeutic agent in pancreatic, prostate, and breast cancer, *Eur. J. Cancer Prev.* 25 (2016) 457–461.
<https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000194>.
- [232] N. Cabre, F. Luciano-Mateo, M. Erenas, M. Nadal, G. Baiges-Gaya, A. Hernandez-Aquilera, I. Fort-Gallifa, E. Rodriguez, F. Riu, J. Camps, J. Joven, J. Luis Domingo, Trace element concentration in breast cancer patient, *The Breast.* (2018).
- [233] Y.L. Huang, J.Y. Sheu, T.H. Lin, Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer, *Clin. Biochem.* 32 (1999) 131–136. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(98\)00096-4](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(98)00096-4).
- [234] S.K. Gupta, V.K. Shukla, M.P. Vaidya, S.K. Roy, S. Gupta, Serum trace elements and Cu/Zn ratio in breast cancer patients, *J. Surg. Oncol.* 46 (1991) 178–181. <https://doi.org/10.1002/jso.2930460311>.
- [235] Y. Feng, J.W. Zeng, Q. Ma, S. Zhang, J. Tang, J.F. Feng, Serum copper and zinc levels in breast cancer: A meta-analysis, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 62 (2020) 126629.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126629>.
- [236] C. Bridges C, Ru. Zalups K, Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals, *Toxic Appl Pharmacol.* 204 (2005) 274–308.
- [237] S. Blockhuys, P. Wittung-Stafshede, Roles of copper-binding proteins in breast cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms18040871>.
- [238] R. González De Vega, M.L. Fernández-Sánchez, J. Pisonero, N. Eiró, F.J. Vizoso, A. Sanz-Medel, Quantitative bioimaging of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer tissues by LA-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 671–677. <https://doi.org/10.1039/c6ja00390g>.
- [239] H.W. Kuo, S.F. Chen, C.C. Wu, D.R. Chen, J.H. Lee, Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan, *Biol. Trace Elem. Res.* 89 (2002) 1–11. <https://doi.org/10.1385/BTER:89:1:1>.
- [240] FDA, Health Effects of Tobacco Use | FDA, (n.d.). <https://www.fda.gov/tobacco-products/public-health-education/health-effects-tobacco-use> (accessed March 29, 2022).
- [241] IARC Working group, Cigarettes Smoking, *Monographs.* 2002 (2010) 43–211.
- [242] V. Rapisarda, E. Miozzi, C. Loreto, S. Matera, C. Fenga, R. Avola, C. Ledda, Cadmium exposure and prostate cancer: Insights, mechanisms and perspectives, *Front. Biosci. - Landmark.* 23 (2018) 1687–1700.
<https://doi.org/10.2741/4667>.
- [243] R.A. Goyer, J. Liu, M.P. Waalkes, Cadmium and cancer of prostate and testies, *BioMetals.* 17 (2004) 555–558.

- [244] V. Zaichick, A Systematic Review of the Zinc Content of the Normal Human Prostate Gland, *Biol. Trace Elem. Res.* 199 (2021) 3593–3607. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02495-z>.
- [245] A.G. Sarafanov, T.I. Todorov, J.A. Centeno, V. MacIas, W. Gao, W.M. Liang, C. Beam, M.A. Gray, A.A. Kajdacsy-Balla, Prostate cancer outcome and tissue levels of metal ions, *Prostate.* 71 (2011) 1231–1238. <https://doi.org/10.1002/pros.21339>.
- [246] C. Neslund-Dudas, A. Kandegedara, O. Kryvenko N, N. Gupta, C. Rogers, B. Rybicki A, Q. Ping Dou, B. Mitra, Prostate tissue metal levels and prostate cancer recurrence in smokers, *Biol. Chem.* 157 (2015) 107–112. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9874-6>.Prostate.
- [247] J.D. Lee, S.M. Wu, L.Y. Lu, Y.T. Yang, S.Y. Jeng, Cadmium Concentration and Metallothionein Expression in Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia of Humans, *J. Formos. Med. Assoc.* 108 (2009) 554–559. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(09\)60373-9](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(09)60373-9).
- [248] M. Bryś, A.D. Nawrocka, E. Miekoś, C. Zydek, M. Foksiński, A. Barecki, W.M. Krajewska, Zinc and cadmium analysis in human prostate neoplasms, *Biol. Trace Elem. Res.* 59 (1997) 145–152. <https://doi.org/10.1007/BF02783239>.
- [249] A. Feustel, R. Wennrich, D. Steiniger, P. Klauss, Zinc and cadmium concentration in prostatic carcinoma of different histological grading in comparison to normal prostate tissue and adenofibromyomatosis (BPH), *Urol. Res.* 10 (1982) 301–303. <https://doi.org/10.1007/BF00255877>.
- [250] A. Buha, V. Matovi, Osnovni principi izučavanja toksikologije smeša, *Arh. Farm. (Belgr).* 65 (2015) 304–315.
- [251] J.P. Gennart, J.P. Buchet, H. Roels, P. Ghyselen, E. Ceulemans, R. Lauwerys, Fertility of male workers exposed to cadmium, lead, or manganese, *Am. J. Epidemiol.* 135 (1992) 1208–1219. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a116227>.
- [252] H.A. Jeng, Y.L. Huang, C.H. Pan, N. Diawara, Role of low exposure to metals as male reproductive toxicants, *Int. J. Environ. Health Res.* 25 (2015) 405–417. <https://doi.org/10.1080/09603123.2014.958137>.
- [253] F. Harari, G. Sallsten, A. Christensson, M. Petkovic, B. Hedblad, N. Forsgard, O. Melander, P.M. Nilsson, Y. Borné, G. Engström, L. Barregard, Blood Lead Levels and Decreased Kidney Function in a Population-Based Cohort, *Am. J. Kidney Dis.* 72 (2018) 381–389. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.02.358>.
- [254] D. Popovac, J. Grazlano, C. Seaman, B. Kaul, B. Colakovic, R. Popovac, I. Osmani, M. Haxhiu, M. Begraca, Z. Bozovic, M. Mikic, Elevated blood lead in a population near a lead smelter in kosovo, yugoslavia, *Arch. Environ. Health.* 37 (1982) 19–23. <https://doi.org/10.1080/00039896.1982.10667527>.
- [255] H. Yari, M. Mohseni, R. Vardi, A.M. Alizadeh, S. Mazloomzadeh, Copper, Lead, Zinc and Cadmium levels in serum of prostate cancer patients by polarography in Iran, Available Online [Www.Jocpr.Com](http://www.jocpr.com) *J. Chem. Pharm. Res.* 7 (2015) 403–408. www.jocpr.com.
- [256] V. Zaichick, Difference between 66 chemical element contents in normal and cancerous prostate, *J. Anal. Oncol.* 6 (2017) 37–56.
- [257] X. Chen, C. Chen, J. Song, H. Liu, L. An, D. Yuan, G. Zhu, Exposure to Heavy Metal Elements May Significantly Increase Serum Prostate-Specific Antigen Levels With Overdosed Dietary Zinc, (2021) 1–27. <https://www.researchsquare.com/article/rs-437706/latest.pdf>.
- [258] D.-P. Hu, W.-Y. Hu, L. Xie, Y. Li, L. Birch, G.S. Prins, Actions of Estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals on Human Prostate Stem/Progenitor Cells and Prostate Carcinogenesis, *Open Biotechnol. J.*

10 (2016) 76–97. <https://doi.org/10.2174/1874070701610010076>.

- [259] S. Rannikko, H. Adlercreutz, Plasma estradiol, free testosterone, sex hormone binding globulin binding capacity, and prolactin in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer, *Prostate*. 4 (1983) 223–229. <https://doi.org/10.1002/pros.2990040302>.
- [260] P. Sengupta, Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions, *Drug Chem. Toxicol.* 36 (2013) 353–368. <https://doi.org/10.3109/01480545.2012.710631>.
- [261] P. Apostoli, P. Kiss, S. Porru, J.P. Bonde, M. Vanhoorne, Male reproductive toxicity of lead in animals and humans, *Occup. Environ. Med.* 55 (1998) 364–374. <https://doi.org/10.1136/oem.55.6.364>.
- [262] A. Pizent, B. Tariba, T. Živković, Reproductive toxicity of metals in men, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 63 (2012) 35–46. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2151>.
- [263] J.K. Kresovich, M. Argos, M.E. Turyk, Associations of lead and cadmium with sex hormones in adult males, *Environ. Res.* 142 (2015) 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.05.026>.
- [264] G. Gupta-Elera, A.R. Garrett, R.A. Robison, K.L. O'Neill, The role of oxidative stress in prostate cancer, *Eur. J. Cancer Prev.* 21 (2012) 155–162. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e32834a8002>.
- [265] M. Riaz, Z. Mahmood, M. Shahid, M.U.Q. Saeed, I.M. Tahir, S.M.A. Shah, N. Munir, A. El-Ghorab, Impact of reactive oxygen species on antioxidant capacity of male reproductive system, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 29 (2016) 421–425. <https://doi.org/10.1177/0394632015608994>.
- [266] C. Pandya, S. Gupta, P. Pillai, A. Bhandarkar, A. Khan, A. Bhan, A. Prajapati, S. Gupta, Association of cadmium and lead with antioxidant status and incidence of benign prostatic hyperplasia in patients of western India, *Biol. Trace Elem. Res.* 152 (2013) 316–326. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9630-y>.
- [267] J.-Y. Liang, Y.-Y. Liu, J. Zou, R. Frankiln, C.L. Costello, P. Feng, Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell growth, *Prostate*. 40 (1999) 200–207.
- [268] V. Kolenko, E. Teper, A. Kutikov, R. Uzzo, Zinc and zinc transporters in prostate carcinogenesis, *Nat. Rev. Urol.* 10 (2013) 219–226. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2013.43>.
- [269] A. Milostić-Srb, A. Včev, M. Tandara, S. Marić, V. Kuić-Vadlja, N. Srb, D. Holik, Importance of Zinc Concentration in Seminal Fluid of Men Diagnosed With Infertility, *Acta Clin. Croat.* 59 (2020) 154–160. <https://doi.org/10.20471/acc.2020.59.01.19>.
- [270] S.A.K. Saleh, H.M. Adly, A.A. Abdelkhalik, A.M. Nassir, Serum levels of selenium, zinc, copper, manganese, and iron in prostate cancer patients, *Curr. Urol.* 14 (2020) 44–49. <https://doi.org/10.1159/000499261>.
- [271] E.J. Margalioth, J.G. Schenker, M. Chevion, Copper and Zinc levels in normal and malignant tissues, *Cancer*. 52 (1983) 868–872. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19830901\)52:5<868::AID-CNCR2820520521>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19830901)52:5<868::AID-CNCR2820520521>3.0.CO;2-K).
- [272] T. Theophanides, J. Anastassopoulou, Copper and carcinogenesis, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 57–64. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(02\)00007-0](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(02)00007-0).
- [273] G. Karimi, S. Shahar, N. Homayouni, R. Rajikan, N.F.A. Bakar, M.S. Othman, Association between trace element and heavy metal levels in hair and nail with prostate cancer, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 13 (2012) 4249–4253. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.9.4249>.
- [274] K. Togawa, C. Le Cornet, M. Feychting, T. Tynes, E. Pukkala, J. Hansen, A. Olsson, S.O. Dalton, K.C. Nordby, S. Uuksulainen, P. Wiebert, T. Woldbæk, N.E. Skakkebaek, B. Fervers, J. Schüz, Parental

occupational exposure to heavy metals and welding fumes and risk of testicular germ cell tumors in offspring: A registry-based case-control study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 25 (2016) 1426–1434. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0328>.

- [275] A. Olsson, K. Togawa, J. Schüz, C. Le Cornet, B. Fervers, S. Oksbjerg Dalton, E. Pukkala, M. Feychting, N.E. Skakkebaek, J. Hansen, Parental occupational exposure to solvents and heavy metals and risk of developing testicular germ cell tumors in sons (NORD-TEST Denmark), *Scand. J. Work. Environ. Heal.* 44 (2018) 658–669. <https://doi.org/10.5271/sjweh.3732>.
- [276] M. Walschaerts, A. Muller, J. Auger, L. Bujan, J.F. Guérin, D. Le Lannou, A. Clavert, A. Spira, P. Jouannet, P. Thonneau, Environmental, occupational and familial risks for testicular cancer: A hospital-based case-control study, *Int. J. Androl.* 30 (2007) 222–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00805.x>.
- [277] E.R. Siu, D.D. Mruk, C.S. Porto, C.Y. Cheng, Cadmium-induced testicular injury, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (2009) 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.028>.
- [278] N.B. Oldereid, Y. Thomassen, A. Attramadal, B. Olaisen, K. Purvis, Concentration of lead, cadmium and zinc in the tissue of reproductive organs of men, *J. Reprod. Fertil.* (1993) 421–425.
- [279] M. Kaba, N. Pirinççi, M.B. Yüksel, I. Geçit, M. Güneş, M. Demir, H.T. Akkoyun, H. Demir, Serum levels of trace elements in patients with testicular cancers, *Int. Braz J Urol.* 41 (2015) 1101–1107. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.0460>.
- [280] B. Tariba Lovaković, T. Živković Semren, T. Safner, M. Gamulin, M. Soče, A. Pizent, Is low-level metal exposure related to testicular cancer?, *J. Environ. Sci. Heal. Part C Toxicol. Carcinog.* 39 (2021) 87–107. <https://doi.org/10.1080/26896583.2021.1874234>.
- [281] J.K. Bhardwaj, H. Panchal, P. Saraf, Cadmium as a testicular toxicant: A Review, *J. Appl. Toxicol.* 41 (2021) 105–117. <https://doi.org/10.1002/jat.4055>.
- [282] P. Massanyi, N. Lukac, M. Massanyi, P. Massanyi, R. Stawarz, G. Formicki, J. Danko, Effects of Xenobiotics on Animal Reproduction in Vivo : Microscopical Examination , *Microsc. Microanal.* 26 (2020) 63–63. <https://doi.org/10.1017/s1431927620000550>.
- [283] N.A.H. Elsheikh, N.A. Omer, W. Yi-Ru, K. Mei-Qian, A. Ilyas, Y. Abdurahim, G.L. Wang, Protective effect of betaine against lead-induced testicular toxicity in male mice, *Andrologia.* 52 (2020) 1–8. <https://doi.org/10.1111/and.13600>.
- [284] E. Hassan, M. El-Neweshy, M. Hassan, A. Noreldin, Thymoquinone attenuates testicular and spermotoxicity following subchronic lead exposure in male rats: Possible mechanisms are involved, *Life Sci.* 230 (2019) 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.067>.
- [285] M. Ciarrocca, A. Capozzella, F. Tomei, G. Tomei, T. Caciari, Exposure to cadmium in male urban and rural workers and effects on FSH, LH and testosterone, *Chemosphere.* 90 (2013) 2077–2084. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.060>.
- [286] P. Petersen Meidahl, N.E. Skakkebaek, K. Vistisen, M. Rørth, A. Giwercman, Semen Quality and Reproductive Hormones Before Orchiectomy in Men with Testicular Cancer, *J Clin Oncol.* 17 (1999) 941–947.
- [287] C.J. Li, C.Y. Yeh, R.Y. Chen, C.R. Tzeng, B.C. Han, L.C. Chien, Biomonitoring of blood heavy metals and reproductive hormone level related to low semen quality, *J. Hazard. Mater.* 300 (2015) 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.027>.
- [288] S. Benoff, R. Hauser, J.L. Marmar, I.R. Hurley, B. Napolitano, G.M. Centola, Cadmium concentrations

in blood and seminal plasma: Correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers), *Mol. Med.* 15 (2009) 248–262. <https://doi.org/10.2119/molmed.2008.00104>.

- [289] S. Benoff, A. Jacob, I.R. Hurley, Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium, *Hum. Reprod. Update.* 6 (2000) 107–121. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.2.107>.
- [290] J. Mendiola, J.M. Moreno, M. Roca, N. Vergara-Jurez, M.J. Martínez-García, A. García-Sánchez, B. Elvira-Rendueles, S. Moreno-Grau, J.J. López-Espín, J. Ten, R. Bernabeu, A.M. Torres-Cantero, Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: A pilot study, *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source.* 10 (2011) 6. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-10-6>.
- [291] J.J. Wirth, R.S. Mijal, Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function, *Syst. Biol. Reprod. Med.* 56 (2010) 147–167. <https://doi.org/10.3109/19396360903582216>.
- [292] I. Iavicoli, L. Fontana, A. Bergamaschi, The effects of metals as endocrine disruptors, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 16732–16801. <https://doi.org/10.3390/ijms140816732>.
- [293] A. Lafuente, P. Cano, A.I. Esquifino, Are cadmium effects on plasma gonadotropins, prolactin, ACTH, GH and TSH levels, dose-dependent?, *BioMetals.* 16 (2003) 243–250. <https://doi.org/10.1023/A:1020658128413>.
- [294] A. Lafuente, N. Márquez, M. Pérez-Lorenzo, D. Pazo, A.I. Esquifino, Cadmium effects on hypothalamic-pituitary-testicular axis in male rats, *Exp. Biol. Med.* 226 (2001) 605–611. <https://doi.org/10.1177/153537020122600615>.
- [295] M. Al-Azemi, F.E. Omu, E.O. Kehinde, J.T. Anim, M.A. Oriowo, A.E. Omu, Lithium protects against toxic effects of cadmium in the rat testes, *J. Assist. Reprod. Genet.* 27 (2010) 469–476. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9426-3>.
- [296] J.M. Yang, M. Arnush, Q.Y. Chen, X.D. Wu, B. Pang, X.Z. Jiang, Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells, *Reprod. Toxicol.* 17 (2003) 553–560. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(03\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(03)00100-X).
- [297] C. Pandya, P. Pillai, L.P. Nampoothiri, N. Bhatt, S. Gupta, S. Gupta, Effect of lead and cadmium co-exposure on testicular steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats, *Andrologia.* 44 (2012) 813–822. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01137.x>.
- [298] B.P. Kundaktepe, V. Sozer, S. Durmus, P.C. Kocael, F.O. Kundaktepe, C. Papila, R. Gelisgen, H. Uzun, The evaluation of oxidative stress parameters in breast and colon cancer, *Medicine (Baltimore).* 100 (2021) e25104. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025104>.

8. PRILOZI

BIOGRAFIJA AUTORA

Milena Anđelković je rođena 1986. godine u Kosovskoj Mitrovici. Osnovnu školu „Vuk Stefanović Karadžić“ završila je u Zvečanu, a srednju medicinsku školu, smer farmaceutski tehničar, u Kosovskoj Mitrovici. Na Univerzitetu u Beogradu - Farmaceutskom fakultetu, smer medicinski biohemičar, diplomirala je 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,22. U toku studiranja bila je stipendista Ministarstva prosvete R. Srbije u periodu 2006-2008 godine, kao i dobitnik nagrade i priznanja za najboljeg studenta - studenta generacije, smer medicinski biohemičar, Naučnog fonda *Profesor Ivan Berkeš*. Po završenom pripravničkom stažu položila je stručni ispit 2012. godine pri Ministarstvu zdravlja R. Srbije. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu - Farmaceutskom fakultetu, modul Toksikologija, upisala je školske 2011/2012. godine. U toku dve školske godine (2011/12 i 2012/13) radila je kao asistent saradnik u realizaciji dodiplomske praktične nastave iz predmeta Toksikologija sa analitikom za oba smera integrisanih akademskih studija, Kliničko-toksikološke analize i Procena rizika po zdravlje ljudi, a od 2019. godine ima zvanje istraživača saradnika na Katedri za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet. Specijalističke strukovne studije, studijski program Medicinska biohemija na Univerzitetu u Beogradu - Farmaceutskom fakultetu završila je školske 2020/21 godine. Od 2013. godine je zaposlena u kliničko-biohemijskoj laboratoriji ZC Kosovska Mitrovica.

Pohađala je nekoliko kurseva edukacije iz oblasti toksikologije i medicinske biohemije. Dobitnica je Nagrade autorima sa Farmaceutskog fakulteta za rezultate publikovane u časopisima izuzetnih vrednosti (kategorija M21) u 2021. godini.

Član je Udruženja toksikologa Srbije i Komore biohemičara Srbije.

Objavila je do sada 3 rada u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a), 7 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), dva rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), 8 saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34), dva rada u nacionalnom časopisu (M53), 3 saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64). Koautor je jednog poglavlja u knjizi *The Role of ROS in Chemical Carcinogenesis Induced by Lead, Nickel, and Chromium*. In: Chakraborti S., Ray B.K., Roychowdhury S. (eds) *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects*. 2021.

OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi u međunarodnim časopisima (M20)

M. Andjelkovic, A. Buha Djordjevic, E. Antonijevic, B. Antonijevic, M. Stanic, J. Kotur-Stevuljevic, V. Spasojevic-Kalimanovska, M. Jovanovic, N. Boricic, D. Wallace, Z. Bulat. *Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood, Liver and Kidney*. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2019;**16**(2):274.

M. Anđelković, A. Buha Djordjevic, E.A. Miljaković, D. Javorac, N. Čolaković, S. Oprić, S. Petričević, M. Granić, J. Kotur-Stevuljević, B. Antonijević, Z. Bulat. *Cadmium tissue level in women diagnosed with breast cancer – A case control study*. Environ. Res. 2021;**199**(May):111300.

Anđelković M, A. Buha Djordjevic, D. Javorac, K. Baralić, D. Đukić-Ćosić, A. Repić, A. Zeljković, J. Vekić, N. Čolaković, Z. Bulat. *Possible role of lead in breast cancer - a case control study*. Environ. Sci. Pollut. Res.(2022).

Radovi saopšteni u izvodu na međunarodnim naučnim skupovima (M34)

Anđelković M, Javorac D, Baralić K, Antonijević E, Đorđević Buha A, Matović V, Bulat Z. Evidence of Immunomodulatory Properties of Cadmium; is Oxidative stress involved. 10th Congress of Toxicology in Developing Countries and 12th Congress of the Serbian Society of Toxicology, Belgrade, Serbia, April 18-21, 2018. Abstract book: 141.

Anđelković M, Tatović S, Đukić-Ćosić D, Đorđević Buha A, Matović V, Bulat Z. Cadmium Levels in Rats Blood and Testes after Acute Oral Treatment with Two Doses. 10th Congress of Toxicology in Developing Countries and 12th Congress of the Serbian Society of Toxicology, Belgrade, Serbia, April 18-21, 2018. Abstract book: 162.

Anđelković M, Javorac D, Antonijević E, Tatović S, Buha Đorđević A, Kotur-Stevuljević J, Đukić-Ćosić D, Bulat Z. Did Cd and Pb mixture cause a stronger effect on oxidative stress parameters in rats compared to single chemicals? Abstract book of the Fourth Congress Challenges in redox biology, Belgrade, Serbia, September 28-30, 2018; (P56)

Buha A, Matovic V, Andjelkovic M, Wallace D, Schweitzer A, Boricic N, Kmezic S, Radenkovic D, Djordjevic V. Exposure to cadmium is a risk factor for pancreatic cancer development: three line of evidence. Abstract book of the 50th jubilee meeting of the European Pancreatic Club 2018; vol.18 No 4S: S1-S188 (O14.)

Buha A, Andjelkovic M, Javorac D, Baralic K, Kacavenda E, Antonijevic E, Mandic-Rajcevic S, Granic M, Djukic-Cosic D, Bulat Z. Cadmium levels in human breast tissue and estradiol serum levels: Dose-response data analyses. Abstract book of the 23rd European Congress of Endocrinology May 22-26, 2021; vol.23: (P258)

Rad u nacionalnom časopisu (M53)

Buha Djordjevic A, Anđelković M, Kačavenda E, Javorac D, Antonijević-Miljaković E, Marić Đ, Baralić K, Đukić-Ćosić D, Čurčić M, Antonijević B, Bulat Z. Cadmium levels in human breast tissue and estradiol serum levels: Is there a connection? *Arhiv za Farmaciju*, 2021. 71, pp.581-595.

Prilog 1.

Информације о пацијенту

<i>Бр. историје болести</i> <i>Шифра</i>			
Име и презиме	Старост	Висина	Тежина
	Професија/занимања		
	Пребивалиште		
Остале дијагнозе			
Позитивна породична анамнеза	<input type="checkbox"/> Не <input type="checkbox"/> Да Дијагноза и сродство _____		

Социјално-епидемиолошки статус

Ниво образовања	Посао	Менопауза статус	Конзумирање алкохола? <input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Не Количина _____ Учесталост (у последње 2 године) _____ Врста _____
<input type="checkbox"/> Без школе <input type="checkbox"/> Основна школа <input type="checkbox"/> Средња школа <input type="checkbox"/> Факултет	<input type="checkbox"/> Ван куће <input type="checkbox"/> Пензија <input type="checkbox"/> Незапослен <input type="checkbox"/> У кући	<input type="checkbox"/> Пре <input type="checkbox"/> Пери <input type="checkbox"/> Пост	Пушење? <input type="checkbox"/> Не <input type="checkbox"/> Да Број цигарета дневно _____ Број година пушења _____

Дијета?	
Да ли се пацијент придржава одређене дијете?	<input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Не
Ако је одговор ДА, укратко опишите!	

Информације о терапији

Пацијент користи следеће <u>декове/хормоне/дијететске</u> суплементе:	
Лек	Режим дозирања

Информације о додатним тестовима/процедурама

1. Биопсија?	1. <input type="checkbox"/> Да	<input type="checkbox"/> Не	<input type="checkbox"/> Није познато		
2. Естрадиол рецептор	2. <input type="checkbox"/> Позитиван	<input type="checkbox"/> Негативан	<input type="checkbox"/> Није одређиван		
3. Прогестерон рецептор	3. <input type="checkbox"/> Позитиван	<input type="checkbox"/> Негативан	<input type="checkbox"/> Није одређиван		
4. Хер-2	4. <input type="checkbox"/> Позитиван	<input type="checkbox"/> Негативан	<input type="checkbox"/> Медијана		
5. Ки-67	5. <input type="checkbox"/> Позитиван	<input type="checkbox"/> Негативан	<input type="checkbox"/> Медијана		
6. ТНМ класификација	6. <input type="checkbox"/> Т	1	2	3	4
	7. <input type="checkbox"/> Н	Н0	Н1	Н2	Н3
	8. <input type="checkbox"/> М	М0	М1		
ДИЈАГНОЗА					

ИНФОРМИСАНИ ПРИСТАНАК

Име и презиме _____

Датум рођења _____

Адреса _____

Телефон _____

Молимо Вас да пажљиво прочитате формулар – можете се посаветовати са породицом, пријатељима, адвокатом, пре него што пристанете да учествујете у истраживању.

Изјављујем да пристајем да учествујем у истраживању „Улога токсичних метала, кадмијума и олова, у настанку карцинома дојке“.

Дозвољавам узимање одређене количине биолошког материјала (крв) узете у складу са протоколом Клинике као и узимање дела туморског ткива након завршене хирушке интервенције. Пристајем да чланови истраживачког тима имају увид у моју медицинску документацију за потребе студије.

Упозната сам са протоколом студије и са медицинским и токсиколошким значајем истраживања. Добила сам одговоре на сва питања у вези са истраживањем постављена руководиоцу истраживања. Не очекујем никакву материјалну надокнаду.

Упозната сам са чињеницом да је ово истраживање одобрено од стране Етичког одбора који ће водити рачуна о мом здрављу и правима. Упозната сам са чињеницом да се могу обратити Етичком одбору уколико имам питања и/или примедбе у вези са истраживањем.

Прочитала сам са разумевањем цео текст и прихватам наведене услове, те добровољно пристајем да учествујем у истраживању.

Потпис: _____

Руководилац истраживања:
Проф. др сц. мед. Мирослав Гранић

Датум: _____

Prilog 3.

Информације о пацијенту

<i>Бр. историје болести</i>			
<i>Шифра</i>			
Име и презиме	Старост	Висина	Тежина
	Професија		
	Пребивалиште		
Остале дијагнозе			
Позитивна породична анамнеза	<input type="checkbox"/> Не <input type="checkbox"/> Да Дијагноза и сродство _____		

Социјално-епидемиолошки статус

Ниво образовања	Посао	Конзумирање алкохола? <input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Не Количина _____ Учесталост (у последње 2 године) _____ Врста _____
<input type="checkbox"/> Без школе <input type="checkbox"/> Основна школа <input type="checkbox"/> Средња школа <input type="checkbox"/> Факултет	<input type="checkbox"/> Ван куће <input type="checkbox"/> Пензија (старосна) <input type="checkbox"/> Пензија (инвалидска) <input type="checkbox"/> Незапослен <input type="checkbox"/> У кући	
		Пушење? <input type="checkbox"/> Не <input type="checkbox"/> Да Број цигарета дневно _____ Број година пушења _____

Дијета?	
Да ли се пацијент придржава одређене дијете?	<input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Не
Ако је одговор ДА, укратко опишите!	

Информације о терапији

Пацијент користи следеће лекове/хормоне/дијететске суплементе:	
Лек	Режим дозирања

Информације о додатним тестовима/процедурама

Биопсија тестиса?	<input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Не <input type="checkbox"/> Није познато
Биопсија простате?	<input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Не <input type="checkbox"/> Није познато
Дијагноза	

ИНФОРМИСАНИ ПРИСТАНАК

Име и презиме

Датум рођења

Адреса

Телефон

Молимо вас да пажљиво прочитате формулар – можете се посаветовати са породицом, пријатељима, адвокатом, пре него што пристанете да учествујете у истраживању.

Изјављујем да пристајем да учествујем у истраживању „Улога токсичних метала, кадмијума и олова, у настанку карцинома простате и тестиса“.

Дозвољавам коришћење преостале количине биолошког материјала (крв) након завршеног поступка анализирања узете у преоперативном поступку у складу са протоколом Клинике као и узимање дела туморског ткива након завршене хирушке интервенције уклањања органа. Пристајем да чланови истраживачког тима имају увид у моју медицинску документацију за потребе студије.

Упознат сам са протоколом студије и са медицинским и токсиколошким значајем истраживања. Добио сам одговоре на сва питања у вези са истраживањем постављена руководиоцу истраживања. Не очекујем никакву материјалну надокнаду.

Упознат сам са чињеницом да је ово истраживање одобрено од стране Етичког одбора који ће водити рачуна о мом здрављу и правима. Упознат сам са чињеницом да се могу обратити Етичком одбору уколико имам питања и/или примедбе у вези са истраживањем.

Прочитао сам са разумевањем цео текст и прихватам наведене услове, те добровољно пристајем да учествујем у истраживању.

Потпис: _____

Руководилац истраживања:
Проф. др Миодраг Аћимовић

Датум: _____

Prilog 5.

Упитник за потребе избора испитаника у истраживању
Контролна група - мушкарци

Информације о испитанику

Име и презиме		Старост	Висина	Тежина
		Професија		
		Пребивалиште		
Подаци о болестима (хипертензија, ДМ, хепатитис, карцином простате или тестиса, бенигна хиперплазија простате)				
Позитивна породична анамнеза		<input type="checkbox"/> Не <input type="checkbox"/> Да Дијагноза и сродство _____		

Социјално-епидемиолошки статус

Ниво образовања
<input type="checkbox"/> Без школе <input type="checkbox"/> Основна школа <input type="checkbox"/> Средња школа <input type="checkbox"/> Факултет

Конзумирање алкохола? <input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Не Количина _____ Учесталост (у последње 2 године) _____ Врста _____
Пушење? <input type="checkbox"/> Не <input type="checkbox"/> Да Број цигарета дневно _____ Број година пушења _____

Дијета?	
Да ли се испитаник придржава одређене дијете?	<input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Не
Ако је одговор ДА, укратко опишите!	

Информације о терапији

Испитаник користи следеће лекове /дијететске суплементе:	
Лек	Режим дозирања

SAGLASNOST ZA UČEŠĆE U ISTRAŽIVANJU

Naziv istraživanja: *Određivanje nivoa toksičnih metala (kadmijuma i olova), bioelemenata (bakar, cink, magnezijum, gvožđe, mangan) i parametra oksidativnog stresa u krvi ispitanika*

Dobio sam kopiju i pročitao sam Informacije za ispitanika u istraživanju i razumem sledeće:

1. Mogu da se povučem iz istraživanja u bilo kom trenutku.
2. Sa svim podacima dobijenim od mene postupaće se kao sa poverljivim i zaštićenim podacima.
3. Saglasan sam da istraživači mogu da me kontaktiraju tokom istraživanja.
4. Saglasan sam da istraživači mogu da obrađuju i koriste podatke dobijene od mene u svrhe koje su u vezi sa navedenim istraživanjem.

Ime i prezime ispitanika.....

Godina rođenja.....

Broj telefona.....

E-mail adresa.....

Potpis.....

Datum.....

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____

Број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Prilog 8.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада _____

Ментор _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.