

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Dragana M. Javorac

**TOKSIČNI EFEKTI NISKIH DOZA OLOVA NA MODELU  
SUBAKUTNE IZLOŽENOSTI PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Dragana M. Javorac

**TOXIC EFFECTS OF LOW DOSES OF LEAD IN SUBACUTE  
EXPOSURE RAT MODEL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Doktorska disertacija pod nazivom „Toksični efekti niskih doza olova na modelu subakutne izloženosti pacova“ urađena je na Katedri za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet. Istraživanje u okviru disertacije delom je finansirano od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

**Mentor:**

---

Dr sc. Zorica Bulat, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

**Članovi Komisije:**

---

Dr sc. Biljana Antonijević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, predsednik

---

Dr sc. Petar Bulat, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

---

Dr sc. Aleksandra Buha Đorđević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

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

*Neizmerno se zahvaljujem mentorki prof. dr Zorici Bulat na vremenu, strpljenju, beskrajno korisnim savetima i velikoj podršci u izradi ove disertacije. Hvala za mentorstvo i što ste me uveli u svet nauke. Iskreno se radujem našim daljim naučnim uspesima.*

*Veliku zahvalnost dugujem svim članovima Katedre za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“ Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.*

*Zahvaljujem se prof. dr Biljani Antonijević na izdvojenom vremenu, prenetom znanju i mnogobrojnim diskusijama na temu modelovanja odnosa doza-odgovor, koje su urodile plodom.*

*Zahvaljujem se prof. dr Aleksandri Buhi Đorđević na savetima, zalaganju, prenetom znanju i mogućnosti da budem deo njenog tima na brojnim projektima.*

*Zahvaljujem se prof. dr Marijani Ćurčić, prof. dr Danijeli Đukić Ćosić i dr Evici Antonijević Miljaković na neizmernoj podršci.*

*Veliko hvala Katarini Baralić sa kojom sam provela mesece u laboratoriji analizirajući rezultate i stičući veštine rada sa eksperimentalnim životinjama na našim prvim pacovima Momom i Danetom.*

*Neizmerno hvala dr Mileni Anđelković na prijateljstvu i podršci u animalnoj studiji i analizama biohemijskih parametara.*

*Hvala Nenadu Petroviću iz Zavoda za javno zdravlje Ćuprija, na vremenu i prenetim praktičnim znanjima iz atomske apsorpcione spektrofotometrije.*

*Veliko hvala tehničarkama Radici i Ljiljani, spremačicama Gordani i Danijeli na prijateljstvu i tehničkoj podršci u izradi ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem porodici, majci Ljiljani, ocu Miodragu, sestrama Mariji i Slađani koja mi je davala ljubav i neizmernu podršku.*

*Zahvaljujem se Branku Vukeliću na ljubavi, neizmernoj podršci i veri da ću uspeti.*

*Veliko hvala Zadužbini Dragoljuba Marinkovića i Zadužbini Đoke Vlajkovića na finansijskoj podršci u toku školovanja.*

*Na kraju, zahvaljujem se Bogu što mi je podario da u ovom životu imam priliku da pomerim granice naučnih saznanja.*

*“ Znanje, to su zlatne lestvice preko kojih se ide u nebesa. “*

*Mihajlo Pupin*

# TOKSIČNI EFEKTI NISKIH DOZA OLOVA NA MODELU SUBAKUTNE IZLOŽENOSTI PACOVA

## Sažetak

Novija istraživanja ukazuju da svaka izloženost olovu, pa čak i veoma niskim dozama može biti štetna. Podaci o toksičnim mehanizmima i efektima olova iz dosadašnjih animalnih i humanih studija se uglavnom zasnivaju na izloženosti visokim dozama, te stoga postoji potreba da se ispituju mehanizmi toksičnog dejstva i da se utvrde toksični efekti u uslovima produžene izloženosti niskim dozama olova. Imajući navedeno u vidu, cilj ove disertacije bio je da se na modelu subakutne izloženosti pacova ispita uticaj niskih doza olova na različite organe i sisteme organa.

Studija je sprovedena na animalnom modelu *Wistar* pacova koji su podeljeni u 7 grupa po 6 jedinki od kojih je jedna grupa bila kontrolna a 6 ostalih grupa je tretirano tokom 28 dana rastućim dozama olova 0,1; 0,5; 1; 3; 7; 15 mg Pb/kg t.m./dan. Nakon 24 h od poslednje doze, pacovi su žrtvovani na human način a krv i organi su uzeti na dalju analizu. U krvi su određivani hematološki parametri, biohemijski parametri, hormoni, parametri oksidativnog statusa, bioelementi i olovo, dok su organi podvrgnuti patohistološkoj analizi i u njima su određivani parametri oksidativnog statusa, bioelementi, olovo i aktivnost enzima acetilholinesteraze. Primena olova u šest niskih rastućih doza omogućila je modelovanje odnosa doza-odgovor i dobijanje *Benchmark* doza za ispitivane toksične efekte.

Rezultati su pokazali da olovo pri niskim dozama, može ispoljiti toksične efekte skoro na svim ispitivanim organima. Dobijeni rezultati daju uvid u distribuciju olova između krvi i tkiva kao i internim dozama olova koje dovode do štetnih efekata. Izmenjeni profil hematoloških i biohemijskih parametara, zajedno sa izmenjenim nivoima bioelemenata, nastalim oksidativnim stresom, izmenjenom aktivnošću acetilholinesteraze i patohistološkom analizom ispitivanih tkiva, ukazuju na toksične efekte nakon subakutne oralne ekspozicije olovu. Najveći naučni doprinos ove doktorske disertacije je ispitivanje zavisnosti doza-odgovor za svaki pojedinačni parametar kao i određivanje *Benchmark* doze, koja će dalje doprineti sigurnijoj proceni rizika po zdravlje ljudi pri izloženosti niskim dozama olova. Najniža *Benchmark* doza dobijena u studiji je za efekat smanjenja nivoa testosterona u serumu pacova što predstavlja kritični toksični efekat studije. Sledeći efekti jesu inhibicija SOD u bubrezima, povećanje nivoa Cu u femuru, sniženje Cu u krvi i povećanje MDA u srcu, a zatim, povećanje TOS u mozgu, povećanje Zn u pankreasu i sniženje Cu u jetri.

**Ključne reči:** olovo, niske doze, subakutna izloženost, *Wistar* pacovi, bioelementi, oksidativni stres, testosteron, tiroidni hormoni, *Benchmark* modelovanje

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Toksikologija

# TOXIC EFFECTS OF LOW DOSES OF LEAD IN SUBACUTE EXPOSURE RAT MODEL

## Abstract

Recent research indicates that exposure to very low lead doses can be harmful. Data on the toxic mechanisms and effects of lead from previous animal and human studies are mainly based on exposure to high doses, and therefore there is a need to investigate the toxic mechanism and to determine toxic effects under conditions of prolonged exposure to low lead doses. Having this in mind, the aim of this dissertation was to examine the effects of low lead doses on various organs and organ systems in a subacute exposure rat model.

The study was conducted on an animal model of Wistar rat. The rats were divided into 7 groups, with 6 rats in each, where one of the them was a control group. The rats from 6 other groups were treated for 28 days with increasing doses of 0.1; 0.5; 1; 3; 7; 15 mg Pb /kg b.w./day. After 24 hours from the last dose, rats were sacrificed and blood and organs were taken away for further analysis. Haematological parameters, biochemical parameters, hormones, oxidative status parameters, bioelements, and lead were determined in the blood, while the organs were subjected to pathohistological analysis and determination of oxidative status parameters, bioelements, lead and acetylcholinesterase enzyme activity. The use of lead in six low-increasing doses enable the modelling of the dose-response relationship and the obtaining of the Benchmark dose for the tested toxic effects.

The results showed that lead at low doses can have toxic effects on almost all examined organs. The obtained results provide insight into the distribution of the lead between blood and tissues as well as the internal doses of lead that lead to harmful effects. Altered profiles of hematological and biochemical parameters, together with altered levels of bioelements, oxidative stress, altered acetylcholinesterase activity, and pathohistological analysis of examined tissues, indicate adverse effects after subacute lead exposure. The greatest scientific contribution of this doctoral dissertation is the examination of dose-response relationships for each individual parameter as well as the determination of the Benchmark dose, which will further contribute to a safer assessment of human health risk of low lead dose exposure. The lowest Benchmark dose obtained in the study was for the effect of reducing testosterone levels in rat serum, which is a critical toxic effect of the study. The next determined effects are inhibition of SOD in the kidneys, increased levels of Cu in the femur, decreased Cu in the blood and increased MDA levels in the heart, then, an increase in TOS in the brain, an increase in Zn in the pancreas and a decrease in Cu in the liver.

**Key words:** lead, low doses, subacute exposure, Wistar rats, bioelements, oxidative stress, testosterone, thyroid hormones, Benchmark modelling

**Scientific field:** Pharmacy

**Scientific subfield:** Toxicology

## SKRAĆENICE I AKRONIMI

ALA	aminolevulinska kiseline
ALB	albumin
ALP	alkalna fosfataza
ALT	alanin aminotransferaza
AMY	amilaza
ANOVA	jednofaktorska analiza varijanse
AOPP	uznapredovali produkti oksidacije proteina
AST	aspartat aminotransferaza
ATP	adenozin 5'-trifosfat
ATSDR	Agencija za registar toksičnih supstanci i bolesti
BAL	dimerkaprol
BMD	<i>Benchmark</i> doza
BMDI	<i>Benchmark</i> interval
BMDL	donji nivo pouzdanosti <i>Benchmark</i> doze
BMDU	gornji nivo pouzdanosti <i>Benchmark</i> doze
BMR	<i>Benchmark</i> efekat
BUN	azot poreklom iz uree
CDC	Centar za kontrolu i prevenciju bolesti
CNS	centralni nervni sistem
CRE	kreatinin
CRP	c-reaktivni protein
DB	direktni bilirubin
DMSA	2,3-dimerkapto sukcinilna kiselina
DMT-1	transporter dvovalentnih metala I
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EFSA	Evropska agencija za bezbednost hrane
G6PD	glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
GGT	gama glutamiltransferaza
H&E	hematoksilin i eozin
HCT	hematokrit
HDL	lipoproteini visoke gustine
HGB	hemoglobin
<i>i.p</i>	intra peritonealno
IARC	Internacionalna agencije za istraživanje karcinoma
LDL	lipoproteina niske gustine
MCH	prosečna količina hemoglobina u eritrocitima
MCHC	prosečna koncentracija hemoglobina na litar eritrocita
MCV	prosečni volumen eritrocita
MDA	malondialdehid
miRNK	mikro ribonukleinska kiseline
MOE	granica izloženosti
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NOAEL	najviša doza koja ne izaziva štetan efekat
PLT	broj trombocita
RBC	eritrociti
SHG	sulfihidrilne grupe
SOD	superoksid dismutaza
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
t.m.	telesna masa
TB	ukupan bilirubin

TG	trigliceridi
TOS	totalni oksidativni status
TP	ukupni serumski proteini
UA	mokraćna kiselina
WBC	leukociti
δ-ALAD	dehidrataza delta aminolevulinske kiseline
δ-ALAS	sinтетetaza delta aminolevulinske kiseline



# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. OLOVO .....	1
1.1.1. <i>Fizičko-hemijske karakteristike</i> .....	2
1.1.2. <i>Izloženost</i> .....	2
1.1.3. <i>Toksikokinetika</i> .....	3
1.1.4. <i>Mehanizmi toksičnosti</i> .....	4
1.1.4.1. <i>Vezivanje za funkcionalne grupe proteina</i> .....	4
1.1.4.2. <i>Interakcije sa bioelementima</i> .....	5
1.1.4.3. <i>Oksidativni stress</i> .....	5
1.1.4.4. <i>Ostali mehanizmi toksičnosti</i> .....	6
1.1.5. <i>Toksični efekti</i> .....	6
1.1.5.1. <i>Hematotoksičnost</i> .....	6
1.1.5.2. <i>Hepatotoksičnost</i> .....	7
1.1.5.3. <i>Nefrotoksičnost</i> .....	8
1.1.5.4. <i>Neurotoksičnost</i> .....	8
1.1.5.5. <i>Toksičnost na kardio-vaskularni sistem</i> .....	9
1.1.5.6. <i>Toksičnost na reproduktivni i endokrini sistem</i> .....	9
1.1.5.7. <i>Karcinogenost</i> .....	10
1.1.6. <i>Biomonitoring i procena ekspozicije olovu</i> .....	10
1.1.7. <i>Terapija trovanja olovom</i> .....	11
1.2. <i>BENCHMARK</i> MODELOVANJE ODNOSA DOZA-ODGOVOR.....	13
<b>2. OSNOVNE HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1. <i>HEMIKALIJE</i> .....	17
3.2. <i>EKSPERIMENTALNI DIZAJN</i> .....	17
3.3. <i>PRIPREMA KRVI I ORGANA ZA ANALIZE</i> .....	18
3.4. <i>ODREĐIVANJE HEMATOLOŠKIH PARAMETARA</i> .....	18
3.5. <i>ODREĐIVANJE BIOHEMIJSKIH PARAMETARA</i> .....	18
3.6. <i>ODREĐIVANJE METALA</i> .....	19
3.7. <i>ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STATUSA</i> .....	20
3.7.1. <i>Određivanje proteina</i> .....	21
3.7.2. <i>Superoksid anjon radikal, O<sub>2</sub><sup>-</sup></i> .....	21
3.7.3. <i>Totalni oksidativni status, TOS</i> .....	21
3.7.4. <i>Sulfhidrilne grupe, SHG</i> .....	21
3.7.5. <i>Malondialdehid, MDA</i> .....	21
3.7.6. <i>Aktivnost enzima superoksid dismutase, SOD</i> .....	22
3.7.7. <i>Uznepredovali produkti oksidacije proteina, AOPP</i> .....	22
3.8. <i>ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA ACETILHOLINESTERAZE U MOZGU PACOVA</i> .....	22
3.9. <i>ODREĐIVANJE HORMONA U SERUMU</i> .....	22
3.10. <i>PATOHISTOLOŠKA ANALIZA ORGANA</i> .....	23
3.10. <i>STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA</i> .....	23
3.11. <i>MODELOVANJE ODNOSA DOZA-ODGOVOR</i> .....	23

<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>24</b>
4.1. PRIRAST TELESNE MASE I RELATIVNA MASA ORGANA.....	24
4.2. NIVO OLOVA U KRV I ORGANIMA .....	25
4.3. EFEKTI NA KRV .....	27
4.3.1. <i>Hematološki parametri</i> .....	27
4.3.2. <i>Biohemijski parametri</i> .....	27
4.3.3. <i>Parametri oksidativnog statusa u serumu</i> .....	30
4.3.4. <i>Nivoi bioelemenata</i> .....	30
4.3.5. <i>Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u krvi</i> .....	31
4.4. EFEKTI NA HORMONSKI STATUS.....	37
4.4.1. <i>Nivoi tiroidnih hormona i testosterona</i> .....	37
4.4.2. <i>Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova na nivoe tiroidnih hormona i testosterona u serumu</i> .....	37
4.5. EFEKTI NA JETRU .....	40
4.5.1. <i>Parametri oksidativnog statusa</i> .....	40
4.5.2. <i>Nivoi bioelemenata</i> .....	40
4.5.3. <i>Patohistološke promene</i> .....	42
4.5.4. <i>Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u jetri</i> .....	42
4.6. EFEKTI NA BUBREGE.....	45
4.6.1. <i>Parametri oksidativnog statusa</i> .....	45
4.6.2. <i>Nivoi bioelemenata</i> .....	45
4.6.3. <i>Patohistološke promene</i> .....	46
4.6.4. <i>Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u bubrezima</i> .....	46
4.7. EFEKTI NA MOZAK.....	48
4.7.1. <i>Aktivnost enzima acetilholinesteraze</i> .....	48
4.7.2. <i>Parametri oksidativnog statusa</i> .....	48
4.7.3. <i>Nivoi bioelemenata</i> .....	49
4.7.4. <i>Patohistološke promene</i> .....	50
4.7.5. <i>Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u mozgu</i> .....	51
4.8. EFEKTI NA SRCE.....	54
4.8.1. <i>Parametri oksidativnog statusa</i> .....	54
4.8.2. <i>Nivoi bioelemenata</i> .....	54
4.8.3. <i>Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u srcu</i> .....	55
4.9. EFEKTI NA TESTISE .....	58
4.9.1. <i>Nivoi bioelemenata</i> .....	58
4.9.2. <i>Patohistološke promene</i> .....	59
4.9.3. <i>Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u testistima</i> .....	60
4.10. EFEKTI NA SLEZINU .....	61
4.10.1. <i>Nivoi bioelemenata</i> .....	61
4.10.2. <i>Patohistološke promene</i> .....	62
4.10.3. <i>Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u slezini</i> .....	62
4.11. EFEKTI NA FEMUR.....	63
4.11.1. <i>Nivoi bioelemenata</i> .....	63
4.11.2. <i>Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u femuru</i> .....	63
4.12. EFEKTI NA PANKREAS .....	67

4.12.1. Nivoi bioeleminata .....	67
4.12.2. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u pankreasu .....	67
4.13. EFEKTI NA TIMUS .....	69
4.13.1. Nivoi bioeleminata .....	69
4.13.2. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u timusu .....	69
4.14. KRITIČNI TOKSIČNI EFEKTI .....	70
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>72</b>
5.1. TOKSIČNI EFEKTI OLOVA NA KRV .....	72
5.2. TOKSIČNI EFEKTI OLOVA NA JETRU .....	73
5.3. TOKSIČNI EFEKTI OLOVA NA BUBREGE .....	75
5.4. TOKSIČNI EFEKTI OLOVA NA CENTRALNI NERVENI SISTEM .....	76
5.5. TOKSIČNI EFEKTI OLOVA NA SRCE .....	77
5.6. TOKSIČNI EFEKTI OLOVA NA MUŠKI REPRODUKTIVNI SISTEM .....	78
5.7. TOKSIČNI EFEKTI OLOVA NA TIROIDNE HORMONE .....	79
5.8. TOKSIČNI EFEKTI OLOVA NA SLEZINU .....	80
5.9. TOKSIČNI EFEKTI OLOVA NA STATUS BIOELEMINATA U FEMURU .....	81
5.10. TOKSIČNI EFEKTI OLOVA NA STATUS BIOELEMINATA U PANKREASU .....	81
5.11. TOKSIČNI EFEKTI OLOVA NA STATUS BIOELEMINATA U TIMUSU .....	81
5.12. KRITIČNI TOKSIČNI EFEKAT .....	82
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>84</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>86</b>
<b>PRILOZI .....</b>	<b>106</b>
PRILOG 1. SVEOBHVATAN PRIKAZ REZULTATA DOBIJENIH <i>BENCHMARK</i> MODELOVANJEM .....	106
PRILOG 2. REZULTATI ISTRAŽIVANJA IZ DOKTORSKE DISERTACIJE PUBLIKOVANI I ŠTAMPANI U CELINI U ČASOPISIMA KATEGORIJE M20 .....	118
<b>BIOGRAFIJA AUTORA .....</b>	<b>119</b>
<b>IZJAVE AUTORA DOKTORSKE DISERTACIJE .....</b>	<b>120</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Olovo

Sagledavajući toksične metale, za olovo se sa sigurnošću može reći da je najopsežnije izučavan metal, što zapravo i nije neočekivano imajući u vidu da se za olovo znalo još u razdoblju 6000-7000. godine pre nove ere (p. n. e.) gde je olovo usled svojih dobrih mehaničkih osobina našlo primenu u izradi statua i kovanog novca (1). Olovo je jedan od prvih metala koji su ljudi upotrebljavali godinama, a najstarija dokumenta koja to potvrđuju potiču iz Male Azije i datiraju davne 6000 do 4000 godina p. n. e. (2). Postoje podaci da su drevni Egipćani i Feničani takođe upotrebljavali olovo, dok najviše podataka o upotrebi olova datira iz doba antičke Grčke i Rimskog carstva, gde se olovo široko koristilo u izradi različitih proizvoda kao što su cevi, posuđe za pripremanje hrane i proizvodi grnčarije. U predelu Azije, olovo je nalazilo primenu u proizvodnji kozmetike i biljnih lekova, dok se ruda olova minimum koristila kao crveni pigment (3,4). Sa razvojem civilizacije olovo je nalazilo primenu u proizvodnji posuđa za pripremu hrane, bokala za vino, a ujedno se i jedinjenje olovo-acetat, zbog slatkog ukusa, dodavalo vinu kao zaslađivač u vidu sirupa zvanog „sapa“ (5). Olovo se dalje upotrebljavalo i kao materijal pogodan za izradu vodovodnih cevi, s tim da se, nakon spoznaje o toksičnim dejstvima olova, kao materijal za izradu vodovodnih cevi primarno koriste alternativni materijali, a pre svega plastika. Međutim, olovne vodovodne cevi se mogu i dalje naći u starijim građevinama, kućama i zgradama izgrađenim pre 1970. godine (6).

Najpoznatija upotreba olova u savremenom dobu je primena organskog jedinjenja olova (tetraetil-olovo) kao aditiva olovnom benzinu, koje je godinama upotrebljavano kao antidetonator i bilo ključni faktor zagađenja životne sredine olovom koje se u periodu 1960-1980 merilo sa 400 000,00 tona oslobođenog olova u životnu sredinu (7). Zabrana široke upotrebe olovnog benzina koja je otpočela 1980-tih godina, predstavlja jedan od najznačajnijih i najvećih trijumfa dvadesetog veka (8,9). U avgustu 2021. godine Program Ujedinjenih nacija za životnu sredinu (engl. *United Nations Environment Programme, UNEP*) donosi vest da je nakon 19-godišnje kampanje obustavljena upotreba olovnog benzina u svetu. U Alžiru u julu 2021. godine prestala je isporuka poslednjih litara olovnog benzina. Smatra se da će prestanak upotrebe olovnog benzina sprečiti više od 1,2 miliona prevremenih smrti i uštedeti 2,45 triliona dolara godišnje na globalnom nivou (10). U Srbiji je zabrana upotrebe olovnog benzina stupila na snagu 2010. godine (11).

Prvi zapisi o trovanju olovom potiče iz 370. godine p. n. e. gde su opisane olovne kolike po prvi put od strane antičkog lekara Hipokrata (2). U 16. veku Paracelzus je opisao „bolest rudara“, a početkom 18. veka Ramacini je opisao toksičnost olova kod grnčara koji su radili sa olovom tokom glaziranja. Zatim je Laenec utvrdio vezu između izlaganja olovu i posledičnog nastanka anemije 1831. godine, a Thackrah opisao „plumbizam“ kao klinički entitet godinu dana kasnije (4,12,13). Slučajevi profesionalnog trovanja olovom bivaju zapaženi 1800-ih i 1900-ih gde je trovanja radnika olovom prepoznato kao značajan zdravstveni problem koji je rezultirao razvojem strategija za prevenciju izloženosti radnika u rudnicima, primarno tamo gde se eksploatiše olovna ruda cerusit (4).

Iako se teži smanjenju upotrebe olova, ono ipak danas nalazi primenu u industriji u proizvodnji baterija, akumulatora, zatim jedinjenja olova se upotrebljavaju kao pigmenti i stabilizatori u polivinil hloridu, a zadržala su i primenu u proizvodnji kablova i municije (14,15). Stoga, olovo nalazi svoj put do životne sredine te izloženost olovu i potencijalno predstavlja rizik po zdravlje ljudi posebno imajući u vidu da jednom oslobođeno u životnu sredinu olovo ostaje godinama i da novija saznanja ukazuju da čak i niski nivoi izloženosti, koji se u današnje vreme sreću, mogu biti štetni (16,17). Svetska zdravstvena organizacija (SZO) procenjuje da je izloženost olovu na globalnom nivou u toku 2004. godine uzrokovalo 143000 smrtnih slučajeva i dovelo do oko 9 miliona izgubljenih godina zdravog života na globalnom nivou (18). O značaju olova za savremeno društvo najbolje govore podaci da Agencija za registar toksičnih supstanci i bolesti (engl. *Agency for Toxic*

*Substances and Disease Registry, ATSDR*) svrstava olovo na drugo mesto, posle arsena, na „Listi prioriternih supstanci“ uzimajući za kriterijume toksičnost same supstance, učestalost izloženosti populacije i prisutnost u životnoj sredini (19), dok SZO 2019. godine ističe izloženost olovu kao jedan od vodećih zdravstvenih problema na globalnom nivou, naročito u zemljama u razvoju gde postoje finansijska a i druga ograničenja u sprovođenju mera i edukaciji stanovništva o upotrebi i potencijalnim štetnim efektima, nakon izloženosti olovu (20).

### 1.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike

Olovo je hemijski element koji se nalazi u 6. periodi i tzv. ugljenikovo 14. grupi periodnog sistema elemenata sa atomskim brojem 82 i molekulskom masom 207,8. Na latinskom olovo se naziva *plumbum* te otuda dolazi hemijska oznaka olova, Pb. U prirodi olovo se nalazi u zemljinoj kori (0,0016%) u vidu smeše četiri izotopa:  $^{204}\text{Pb}$  (1,48%),  $^{207}\text{Pb}$  (22,6%),  $^{206}\text{Pb}$  (23,6%) i  $^{208}\text{Pb}$  (52,3%). Izotopi  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  i  $^{208}\text{Pb}$  predstavljaju produkte raspada uranijuma, aktinijuma i torijuma. Olovo je mek, slabo reaktivan metal, otporan na koroziju, na preseku sjajan sa velikom gustinom od  $11,34\text{ g/cm}^3$ . Tačka topljenja olova iznosi  $327,5\text{ }^\circ\text{C}$  a tačka ključanja  $1740\text{ }^\circ\text{C}$ . Ne rastvara se u vodi i alkalijama, dok se dobro rastvara u koncentrovanim kiselinama (npr.  $\text{HNO}_3$ ). Sa drugim elementima, olovo gradi jedinjenja pri čemu oksidaciono stanje olova iznosi +2, ili nešto ređe +4. Olovo (+2) ima sposobnost vezivanja za različite atome donora (npr. N, S i P). Najrasprostranjenije jedinjenje olova u prirodi je olovna ruda galenit koja hemijski predstavlja olovo-sulfid ( $\text{PbS}$ ). Pored galenita, industrijski značaj imaju i olovne rude ceruzit i anglesit, koji hemijski predstavljaju olovo-karbonat ( $\text{PbCO}_3$ ) i olovo-sulfat ( $\text{PbSO}_4$ ). Sa kiseonikom olovo gradi okside: olovo(II)-oksid ( $\text{PbO}$ ), olovo(IV)-oksid ( $\text{PbO}_2$ ) i olovo(II, IV)-oksid ( $\text{Pb}_3\text{O}_4$ ). Preradom ruda olova, primarno galenita, dobija se čisto olovo. Od organskih jedinjenja olova najveći značaj ima tetraetil-olovo gde je olovo četvorovalentno. Olovo(II)-karbonat-di-hidroksid ( $2\text{PbCO}_3\cdot\text{Pb}(\text{OH})_2$ ) predstavlja jedinjenje olova koje se godinama koristilo kao beli pigment u bojama za farbanje zidova i bojenje različitih predmeta. (6).

### 1.1.2. Izloženost

Jednom oslobođeno u životnu sredinu, olovo se zadržava godinama i ne može se niti razgraditi niti uništiti. Uprkos značajnim naporima da se ekspozicija olovu u životnoj sredini smanji, ona i dalje predstavlja rizik po zdravlje ljudi, posebno u nisko razvijenim ekonomskim zemljama tzv. zemljama u razvoju (21–24). Sedamdesetih godina prošlog veka, izloženost stanovništva olovu je dosegla svoj maksimum a koncentracije olova u krvi su premašivale vrednost od  $100\text{ }\mu\text{g/dL}$  kod opšte populacije primarno usled udisanja vazduha kontaminiranog olovom koje se oslobađalo sagorevanjem olovnog benzina. Smatra se da je navedena izloženost čoveka bila 1000 puta viša nego kod praistorijskih ljudi (25). Danas su vrednosti olova u krvi znatno niže, usled niza regulatornih mera sprovedenih sa ciljem smanjenja upotrebe i izloženosti olovu. Međutim, iako je u današnje vreme nivo olova drastično smanjen u životnoj sredini, najnovija saznanja ukazuju da izloženost i niskim dozama olova može delovati štetno po zdravlje ljudi (4).

Radno mesto i zagađena životna sredina predstavljaju moguća mesta ekspozicije olovu. Vezano za profesionalnu izloženost veliki značaj ima donošenje olova na radnoj odeći i ekspozicija drugih članova domaćinstva putem transfera sa odeće te se ova dva vida izloženosti olovu prepliću (11,26,27). Industrijska proizvodnja olovnih akumulatora i baterija uzima oko 2/3 ukupnog udela upotrebe olova u industriji. Razvoj električnih vozila uticao je na tržište olovnih baterija koje je 2019. godine iznosilo 58,95 billiona dolara sa procenjenim trendom rasta (28). Radnici u postrojenjima reciklaže olovnih baterija i akumulatora potencijalno mogu biti izloženi olovu. Imajući u vidu da se ovakva postrojenjima uglavnom nalaze u određenim geografskim područjima i da se zaposleni i poslodavci moraju pridržavati propisa vezanih za bezbednost na radu, trovanja olovom su u navedenim slučajevima retka. Opasnost postoji ako su postrojenja nelegalna i ako se i pored

postojećih propisa ne vrši ambijentalni monitoring koji obuhvata merenje koncentracije olova u vazduhu i biološki monitoring olova koji se sprovodi na redovnom zdravstvenom pregledu i obavezan je za sve zaposlene (11).

Najznačajniji izvori izloženosti olovu kod opšte populacije su zagađena voda, vazduh i hrana, zatim predmeti opšte upotrebe, prašina, kao i duvanski dim, dok u pojedinim područjima kao što su Sjedinjene Američke Države i Australija, upotreba olovnih boja i dalje predstavlja značajan izvor izloženosti (9,29). Voda u domaćinstvima može sadržati više koncentracije olova od propisanih. U većini Evropskih zemalja dozvoljena koncentracija olova u vodi iznosi do 10 µg/L. Međutim, velike su varijacije u koncentraciji olova u vodi za piće te se preporučuje upotreba flaširane vode za pripremu dečijih formula i hrane sa ciljem smanjenja izloženosti dece olovu (30). Blizina industrijskih postrojenja koja emituju čestice olova predstavlja najčešći uzrok zagađenja vazduha olovom. Stanovništvo u naseljenim područjima u kojima postoji ili je u blizini industrijskog postrojenja koje emituje čestice olova, može biti izloženo hronično niskim dozama olova putem zagađenog vazduha. Proizvodnja uglja, prerada kao i sagorevanje, predstavljaju potencijalan izvor izloženosti olovu. Dodatno, olovo se iz vazduha taloži na površinu zemlje, pri čemu kontaminira vodu i kopnene površine i ovim putem dospeva u lanac ishrane. Inhalacioni put unosa olova je bitan sa aspekta profesionalne izloženosti, dok je kod opšte populacije unos inhalacionim putem manje značajan usled smanjenja koncentracije olova u vazduhu koje je zabeleženo nakon zabrane upotrebe olovnog benzina (31). Značajan izvor izloženosti olovu kod opšte odrasle populacije takođe predstavlja i duvanski dim čijim udisanjem se može uneti i do 2% ukupnog sadržaja olova u duvanu koji iznosi oko 3-12 µg po cigareti (32). Istraživanja su pokazala da su nivoi olova u krvi značajno viši u populaciji pušača u poređenju sa nepušačima (24). Kada je u pitanju hrana pojedine namirnice (povrće i žitarice) sadrže veće količine olova od drugih usled aktivnijeg preuzimanja olova iz zagađene zemlje i vazduha. Rezultati studije koja je sprovedena 2009. godine, a obuhvatila je 19 evropskih zemalja, ukazuju da je prosečna količina olova koja se unese putem hrane 0,51 µg/kg/danu (33).

Bavljenje određenim hobijima može predstavljati povećan rizik od izloženosti olovu jer se ono može naći u bojama različitih predmeta i industrijskim proizvodima/materijalima korišćenim pri bavljenju hobijima. Lov i ribolov predstavljaju aktivnosti koje potencijalno imaju povećan rizik od izloženosti olovu osoba koje se njime bave, imajući u vidu da se u današnje vreme i dalje upotrebljava olovna municija kao i olovni tegovi za pecanje. Upotreba olovne municije pri lovu može posledično kontaminirati i meso divljači ako je namenjeno za upotrebu u ishrani, dok olovni tegovi za pecanje često mogu završiti na dnu reka i jezera. Drugi hobiji koji takođe predstavljaju potencijalni izvor izloženosti jesu renoviranje starih objekata izgrađenih pre 1978. godine jer se smatra da se u farbi zidova može naći olovo, zatim izrada keramičkih predmeta, nakita i izrada vitraža (34–36).

Igračke napravljene od plastičnih masa mogu sadržati toksične hemikalije kao što je olovo te kod dece predstavlja značajan izvor izloženosti usled karakterističnog ponašanja stavljanja predmeta i ruku u usta (37). Iako postoje određena razmatranja, zabrana upotrebe olova kao stabilizatora u plastičnim masama još uvek nije doneta. Tokom stajanja na suncu, vazduhu i u kontaktu sa deterdžentima olovo se može osloboditi iz plastike u vidu olovne prašine koja se može uneti udisanjem. Olovna prašina može nastati i na radnom mestu pri recikliranju plastike koja sadrži olovo kao pigment ili stabilizator (38).

### **1.1.3. Toksikokinetika**

Toksikokinetika olova zavisi od mnogobrojnih faktora: starosti, stanja organizma, ishrane, nutritivnog statusa, kao i karakteristika unetog jedinjenja olova. Olovo se u organizam može uneti inhalaciono, gastrointestinalnim putem (organska i neorganska jedinjenja) i putem kože (organska jedinjenja). Unos olova putem pluća značajan je sa aspekta profesionalne izloženosti. Olovo dospeva u pluća udisanjem mikro-čestica iz zagađenog vazduha koje sadrže olovo i druge toksične materije.

Deo čestica olova koje se nalaze u vazduhu, promera većeg od 5  $\mu\text{m}$ , u najvećem procentu se vraća putem muko-cilijarnog transporta do usne duplje i sa salivom biva progutano. Čestice promera manjeg od 5  $\mu\text{m}$  dospevaju do alveola gde se olovo apsorbuje a procenat apsorpcije iznosi 10-60% i zavisi od hemijskog oblika olova, rastvorljivosti jedinjenja u telesnim tečnostima, kao i fiziološkog stanja organizma (39).

Glavni put unosa olova kod opšte populacije je putem gastrointestinalnog trakta gde se olovo apsorbuje u duodenumu a procenat apsorpcije u mnogome zavisi od interindividualnih karakteristika i u proseku iznosi 5-15% unete doze. Različiti fiziološki faktori mogu uticati na procenat apsorpcije olova u gastrointestinalnom traktu a neki od njih su: starost, unos kalcijuma, status gvožđa i trudnoća. U poređenju sa odraslima, deca apsorbuju veći procenat olova iz digestivnog trakta u odnosu na odrasle (oko 50% unete količine) (40,41). Istraživanja su pokazala da osobe sa deficitom gvožđa apsorbuju veći procenat olova usled povišene ekspresije transportera dvovalentnih metala-tipa 1 (DMT-1) za koji se olovo kompetitivno vezuje. Prisustvo hrane smanjuje apsorpciju olova usled prisustva primarno kalcijumovih i fosfatnih jona koji se kompetitivno apsorbuju u gastrointestinalnom traktu. Pored navedenog, određena stanja organizma mogu uticati na apsorpciju olova, te se smatra da je u trudnoći procenat apsorpcije olova nešto viši što rezultuje višim nivoima olova u krvi trudnica. Ovom povećanju koncentracije olova u krvi dodatno doprinosi i mobilizacija olova iz kostiju koja se dešava tokom trudnoće (17). Putem kože se mogu apsorbovati organska jedinjenja olova koja dalje podležu metabolizmu u jetri u procesu dealkilacije do neorganskog olova, dok se neorganska jedinjenja prolaskom kroz jetru ne metabolišu.

Nakon apsorpcije olovo dospeva u krv gde se u najvećem procentu nalazi u eritrocitima (94-99%) i to vezano za hemoglobin (80%), a mali deo, oko 5%, nalazi se u plazmi slobodno ili vezano za proteine plazme. Iz krvi, olovo se široko distribuira u organizmu do svih organskih sistema. Najveći deo olova se deponuje u kostima (80-90%) dok se preostali deo olova deponuje u zubima, kosi i mekim tkivima, poput mozga i bubrega (17,42). Olovo prolazi krvno-moždanu i placentarnu barijeru, dosežući nivo u krvi fetusa jednak onom u majčinoj krvi (42).

Primarni put eliminacije olova je putem fecesa kojim se eliminiše oko 90% olova, a ostatak se eliminiše putem urinarnog trakta (7-17%), dok eliminacija putem majčinog mleka, znoja, kose i noktiju čini neznatan udeo u eliminaciji olova. Olovo ima višefaznu kinetiku eliminacije iz organizma zbog različitih svojstava skladištenja u različitim tkivima. Poluvreme eliminacije olova iz krvi iznosi od jedne nedelje do 2 godine i zavisi od stanja organizma, puta i dužine izloženosti dok iz kostiju premašuje ovu vrednost mnogostruko i iznosi 10-15 godina (17).

#### **1.1.4. Mehanizmi toksičnosti**

Poznato je da olovo u organizmu deluje toksično brojnim mehanizmima od kojih su primarni vezivanje za funkcionalne grupe proteina i interakcija sa bioelementima, zatim oksidativni stres, epigenetski mehanizmi, indukcija inflamacije i apoptoze (17,43). Premda su ovi mehanizmi godinama unazad proučavani još uvek nije dovoljno jasno koji su najznačajniji mehanizmi kojima olovo deluje toksično pri produženoj izloženosti niskim dozama.

##### **1.1.4.1. Vezivanje za funkcionalne grupe proteina**

Olovo i drugi metali kao što su živa i kadmijum imaju visok afinitet prema funkcionalnim grupama proteina (sa sulfhidrilnim grupama (SHG) cisteina olovo gradi merkaptide) a od posebnog značaja su biološki aktivni proteini, enzimi, za koje se metali dodatno mogu vezati za aktivna mesta inhibirajući njihovu biološku funkciju. Na primer, olovo se vezuje za enzim glukoza-6-fosfat dehidrogenazu (G6PD) inhibirajući njegovu funkciju u snabdevanju ćelije ekstramitohondrijalnim nikotinamid adenin dinukleotid fosfatom (NADPH) kroz oksidaciju glukoza-6-fosfata u 6-fosfoglukonat (44). Vezivanjem za enzime koji učestvuju u biosintezi prekursora hemoglobina -

hema, olovo dovodi do njihove inhibicije i posledično nastanka anemije. U ovom procesu, tri ključna enzima koje olovo inhibira su: dehidrataza delta aminolevulinske kiseline ( $\delta$ -ALAD), koproporfirinogen oksidaza i ferohelataza. Inhibicija sinteze hema dovodi do nagomilavanja aminolevulinske kiseline (ALA), koja se može detektovati u plazmi i urinu. Pored anemije, inhibicijom enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-aze na površini eritrocita, olovo indukuje njihovu hemolizu (45,46). Jedan od značajnijih mehanizama neurotoksičnosti izazvane olovom jeste interakcija sa neurotransmiterima čime dolazi do oštećenja funkcije centralnog nervnog sistema (CNS), a od posebnog interesa je dejstvo olova na holinergički sistem koje može rezultirati funkcionalnim oštećenjem CNS, uključujući i poremećaj kognicije (47–49). Olovo deluje na transmisiju acetilholina smanjujući njegovo oslobađanje u sinapse i inhibirajući aktivnost enzima acetilholinesterazu. Potencijalni mehanizam kojim se objašnjava inhibicija acetilholinesteraze je vezivanje olova za aktivno mesto ovog enzima (50). Poznato je da je transmisija acetilholina u CNS-u odgovorna za usvajanje novih podataka i njihovo memorisanje, a da je poremećaj ove transmisije jedan od glavnih odlika Alchajmerove bolesti (51).

#### **1.1.4.2. Interakcije sa bioelementima**

Zahvaljujući hemijskim koordinacionim osobinama, olovo ima dosta sličnosti sa esencijalnim katjonima (52), te upravo ova osobina olova je ključna u ponašanju olova u fiziološkim sistemima gde ono oponaša biološke katjone i ispoljava mnoge štetne efekte dovodeći do poremećaja jonske homeostaze. Do disbalansa jona dolazi kada olovo kompetitivno istiskuje bioelemente, kao što su gvožđe (Fe), kalcijum (Ca), cink (Zn), magnezijum (Mg), selen (Se) i mangan (Mn), iz biološki aktivnih molekula ometajući biološke procese posredovane samim jonima ili enzimima i proteinima koji zahtevaju ove bioelemente za svoje normalno funkcionisanje (53). Budući da navedeni bioelementi imaju esencijalne funkcije u organizmu, njihov disbalans može dovesti do različitih fizioloških poremećaja (54). Na primer, kompeticijom sa Ca jonima olovo dovodi do poremećaja mnogobrojnih Ca zavisnih ćelijskih funkcija: Ca zavisnog transporta signala, ćelijskog energetskog procesa i apoptoze. Istiskivanjem Ca iz Ca zavisnih proteina (kalmodulina, protein kinaze C, osteokalcina i drugih) olovo remeti njihovu fiziološku funkciju. Pored ovoga, olovo utiče na ćelijski transport inhibirajući adenzin 5'-trifosfat (ATP) zavisne ćelijske transportere i voltažno zavisne kanale esencijalnih katjona i anjona (55).

#### **1.1.4.3. Oksidativni stress**

Iako nije Fentonov metal, olovo dovodi do nastanka oksidativnog stresa i posledičnog oksidativnog oštećenja proteina, lipida i dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) u ćelijama. Oksidativni stres indukovano olovom nastaje usled indukcije stvaranja slobodnih kiseoničnih i azotovih radikala i supresije antioksidativne zaštite usled inhibicije enzima antioksidativne zaštite (56–58). Olovo dovodi do oksidativnog oštećenja lipida membrana ćelija utičući na procese vezane za membranu, kao što su aktivnost membranskih enzima, endocitoza, transport materija i transdukciju signala. U ćelijama olovo izaziva oksidativno oštećenje DNK što se manifestuje povećanim nivoima DNK produkata: 8-okso-7,8-dihidro-2-deoksiguanozina i 5-hidroksil-2-deoksicitidina (44). Uticaj olova na homeostazu bioelemenata usko je povezana sa aktivnošću antioksidativnih enzima, a samim tim i na odbranu od oksidativnog stresa uzrokovanog olovom. Olovo može istisnuti bioelemente koji ulaze u sastav antioksidativnih enzima indirektno narušavajući antioksidativnu zaštitu organizma od slobodnih radikala. Selen, kao selenocistein, ulazi u sastav aktivnog mesta glutation-peroksidaze, čija je glavna funkcija neutralizacija vodonik-peroksida i organskog peroksida. Dodatno, Se je strukturalni deo velike grupe selenoproteina koji su neophodni za pravilno funkcionisanje organizma. Olovo može istisnuti Mn, Cu i Zn, koji ulaze u sastav enzima superoksid dismutaze (MnSOD, Cu/ZnSOD), čija je funkcija prevođenje superoksidnog anjona u vodonik-peroksid i kiseonik. Nastali vodonik-peroksid se razlaže na vodu i kiseonik posredstvom katalaze (CAT) ili glutation peroksidaze.



Istiskujući jone gvožđa iz katalaze olovo može narušiti njenu funkciju razlaganja vodonik-peroksida (59,60).

#### **1.1.4.4. Ostali mehanizmi toksičnosti**

Pored prethodno navedenih mehanizama toksičnog dejstva olova od naučnog značaja su i epigenetski mehanizmi, indukcija inflamacije i indukcija nastanka programirane ćelijske smrti, apoptoze. Sa razvojem molekularne genetike identifikovani su epigenetski mehanizmi toksičnog dejstva olova od kojih su najznačajniji indukcija stvaranja metilovane DNK i promena ekspresije mikro ribonukleinske kiseline (miRNK) (43). Broj istraživanja epigenetskih mehanizama toksičnog dejstva olova je u porastu. U studijama je pokazano da olovo intereaguje sa Zn zavisnim delovima DNK ometajući njihovu transkripciju (61). Olovo indukuje otvaranja mitohondrijalnih transmembranskih pora što posledično aktivira proces apoptoze. Smatra se da istiskivanje jona Ca stoji iza mehanizma kojim olovo dovodi do otvaranja mitohondrijalnih transmembranskih pora. Pojedine studije ukazuju da ekspozicija olovu vodi do indukcije inflamacije u različitim tkivima što se ispoljava povišenim koncentracijama proinflamatornih citokina poput IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  (62,63).

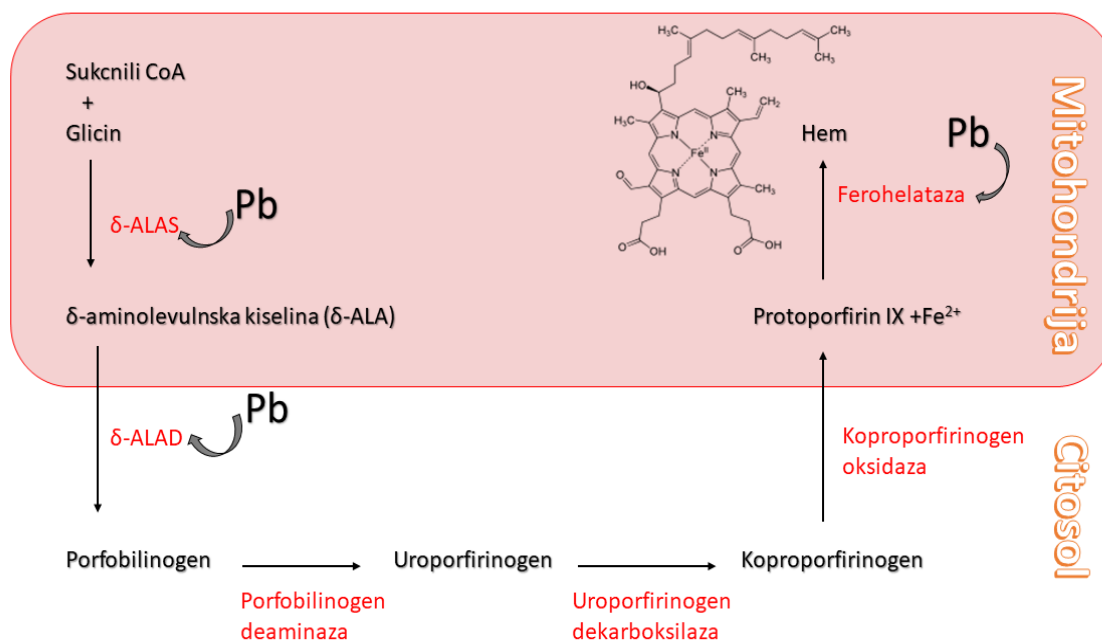
#### **1.1.5. Toksični efekti**

Olovo može biti uzročnik akutnih i hroničnih trovanja. U današnje vreme, usled niza sprovedenih mera za smanjenje upotrebe olova u različitim sferama života, akutna trovanja olovom su veoma retka i najčešće se dešavaju kod dece usled slučajnog gutanja predmeta (nakita ili tegova za pecanje) izgrađenog od olova. Akutna trovanja izazvana olovom karakterišu sledeći klinički simptomi: jaki stomahni kolici, somnolencija, muka, dijareja a može doći i do razvoja encefalopatije pri koncentracijama u krvi višim od 80  $\mu\text{g/dL}$  kod dece i 100  $\mu\text{g/dL}$  kod odraslih. Hronična trovanja olovom su češća i u današnje vreme imaju veći toksikološki značaj imajući u vidu da novija istraživanja ukazuju da i veoma niska izloženost olovu može dovesti do toksičnih efekata. U epidemiološkim studijama je pokazano da olovo izaziva niz štetnih efekata po zdravlje ljudi ispoljavajući negativno dejstvo na sve organe i sisteme organa što zapravo nije neočekivano imajući u vidu da se olovo široko raspodeljuje u organizmu do svih organa i da mehanizmi kojima deluje jesu opšti mehanizmi kojima može biti pogođena svaka ćelija. Brojne epidemiološke studije o toksičnim efektima olova pokazuju da ono deluje štetno na jetru, renalni, hematopoetski, nervni, reproduktivni i kardio-vaskularni sistem (41,48,64,65). Pored ovih sistema izloženost olovu se povezuje sa štetnim dejstvima na respiratorni, imuni, endokrini, skeletni, gastrointestinalni sistem, zatim oči i razvojem karcinoma (17,66). Treba imati u vidu da u određenim studijama postoji mogućnost uticaja različitih ko-faktora koji mogu uticati na konačan ishod. Na primer, sa starošću se narušava funkcija bubrega što posledično može imati uticaj na sintezu eritropoetina. Nutritivni status ispitanika kao i navike u ishrani mogu biti bitan faktor, te na primer deficit gvožđa u ishrani, kao i trovanje olovom, može doprineti razvoju mikrocitne hipohromne anemije (17). U epidemiološkim studijama ne treba ni zanemariti uticaj drugih zagađivača na zdravlje ljudi imajući u vidu da savremena toksikologija ima za cilj otkrivanje uloge ekspozoma (svi faktori životne sredine) i njihov uticaj na zdravlje ljudi (67). U animalnim studijama olovo je opsežno izučavano godinama unazad. U najvećem broju studija su korišćeni visoki dozni nivoi olova, irelevantni za današnji nivo izloženosti opšte populacije (55).

##### **1.1.5.1. Hematotoksičnost**

Uticaj na krv je jedan od najbolje opisanih toksičnih efekata olova. Dobro je poznato da vrednosti olova u krvi veće od 10  $\mu\text{g/dL}$ , dovode do dozno-zavisne inhibicije enzima uključenih u sintezu hema kod odraslih i dece (Slika 1). Izloženost olovu dovodi do smanjenja koncentracije hemoglobina vodeći do mikrocitne hipohromne anemije (17,26,68,69). Sintaza hema je visoko regulisan biološki proces koji započinje u mitohondrijama reakcijom između sukcinil koenzima A i glicina pri čemu nastaje  $\delta$ -ALA. Proces se nastavlja nizom reakcija od kojih se deo odvija u citosolu,

a krajnja reakcija ugradnje gvožđe (2+) jona u hem odvija se u mitohondrijama. Tri ključna enzima uključena u sintezu hema na koje olovo utiče su mitohondrijski enzim sintetaza aminolevulinske kiseline ( $\delta$ -ALAS), koji katalizuje formiranje ALA, citosolni  $\delta$ -ALAD, koji katalizuje formiranje porfobilinogena iz ALA, i mitohondrijski enzim ferohelataza koji katalizuje ugradnju gvožđa u protoporfirin da bi se formirao hem (Slika 1) (21,70). Potom, poznati efekat olova na hematološki sistem je inhibicija i drugih enzima u crvenim krvnim zrnima, pirimidin 5'-nukleotidaze i  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPaze (71). Inhibicija navedenih enzima je zapažena kod radnika izloženih olovu koji su imali vrednosti olova u krvi  $\geq 29 \mu\text{g/dL}$  za inhibiciju  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPaze, i vrednosti  $\geq 50 \mu\text{g/dL}$  za inhibiciju pirimidin 5'-nukleotidaze (72,73). Pored navedenog, inhibirajući jonski transport na membrani eritrocita olovo indukuje njihovu hemolizu. Pojedine epidemiološke studije ukazuju da olovo može dovesti i do redukovanja ukupnog broja trombocita (74). Ekspozicija olovu u humanim studijama se povezuje i sa izmenjenim vrednostima eritropoetina u serumu, pre svega sniženim (17,75). Od navedenih toksičnih efekata, oni koji se mogu javiti pri niskim koncentracijama olova u krvi  $\leq 10 \mu\text{g/dL}$  su: inhibicija enzima  $\delta$ -ALAD, sniženje nivoa hemoglobina, smanjenje broja trombocita i snižene vrednosti eritropoetina (17).



**Slika 1.** Uticaj olova na biosintezu hema

Sintetaza delta aminolevulinska kiselina ( $\delta$ -ALAS), dehidrataza delta aminolevulinska kiselina ( $\delta$ -ALAD); (17,76)

### 1.1.5.2. Hepatotoksičnost

Mali broj epidemioloških studija sprovedenih na radnicima profesionalno izloženih olovu ukazuje na povezanost ekspozicije olovu i poremećaja funkcije jetre i to uglavnom pri vrednostima koncentracije olova u krvi  $\geq 20 \mu\text{g/dL}$ . Nakon gastrointestinalne apsorpcije mnogobrojni ksenobiotici, putem vene porte dospevaju u jetru gde podležu, u zavisnosti od hemijskih karakteristika, metabolizmu prvog prolaska kroz jetru. Sumarno, epidemiološke studije sprovedene na radnicima izloženim olovu, ukazuju na povezanost ekspozicije olovu sa indukcijom pojedinih enzima jetre, povećanim vrednostima holesterola u plazmi, i zadebljanjem zida žučne kese (17). Nakon produžene ekspozicije olovu, usled oštećenja funkcije jetre, jetrini enzimi u serumu, kao što su alkalna fosfataza (ALP), alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST) i gama

glutamiltransferaza (GGT) mogu biti značajno povišeni (77,78). Takođe izloženost olovu je dovedena u vezu sa višim vrednostima nivoa lipoproteina niske gustine (LDL) i nižim vrednostima nivoa lipoproteina visoke gustine (HDL). Nakon dužeg izlaganja olovu zabeleženi su slučajevi uvećanja jetre i povećanja debljine zida žučne kese. Kod radnika izloženih olovu sa vrednošću  $\geq 70 \mu\text{g/dL}$  uočena je indukcija enzima druge faze metabolizma jetre dok su enzimi CYP 450 bili inhibirani (78,79). Mnogobrojne epidemiološke studije ukazuju da izloženost olovu može biti povezana i sa poremećajima u različitim metaboličkim putevima i transportu Fe u jetri (77). Iako za efekte olova na jetru postoji ograničen broj epidemioloških studija, studije na animalnim modelima (odrasli pacovi) neosporno ukazuju da koncentracije olova u krvi  $\geq 30 \mu\text{g/dL}$ , imaju uticaj na enzime prve i druge faze jetre kao i na lipidni metabolizam. Olovo narušava metabolizam lipida kod životinja, što je dokazano povećanom hepatičnom holesterogenezom i izmenjenim nivoima triglicerida i fosfolipida (55,80,81). Kako su doze u eksperimentalnim studijama na životinjama uglavnom visoke, a dužina ekspozicije kratka, može se postaviti pitanje relevantnosti i aproksimacije navedenih rezultata na čoveka (55).

### 1.1.5.3. Nefrotoksičnost

Mnogobrojne epidemiološke studije ukazuju na neosporan štetan uticaj olova na bubrežnu građu i funkciju čak i pri veoma niskim nivoima olova u krvi  $\leq 5 \mu\text{g/dL}$  (55). Progresivni tubulointersticijski nefritis sa tipičnom infiltracijom leukocita, intersticijalnom fibrozom i tubularnom atrofijom može se razviti kao rezultat narušene funkcije proksimalnih tubula. Pri niskim nivoima izloženosti olovu nefrotoksičnost se može manifestovati smanjenjem glomerularne filtracije, proteinurijom i razvojem hronične bubrežne insuficijencije, dok pri nivoima olova u krvi  $\geq 10 \mu\text{g/dL}$  može doći dodatno i do razvoja enzimirije, poremećaja u tubularnom transportu i patohistoloških promena u tkivu bubrega (17). Poremećaji u glomerularnoj filtraciji se manifestuju promenom u klirensu kreatinina, zatim serumskih nivoa kreatinina i azotnih materija, te albuminurijom. Poremećaj reapsorpcije u proksimalnim tubulima se manifestuje izlučivanjem serumskih proteina male molekulske mase u urin: mikroglobulina i retinol vezujućih proteina. Aktivnost enzima N-acetil-D-glukozaminidaze je takođe jedan od markera ranog oštećenja bubrežnih tubula indukovano olovom. Patohistološke promene u građi bubrega nakon ekspozicije olovu se javljaju pri višim nivoima olova u krvi  $\geq 50 \mu\text{g/dL}$  a obuhvataju intersticijalnu fibrozu, tubularnu atrofiju i fokalnu sklerozu glomerula (17,82). Istraživanja su pokazala da izlaganje niskim nivoima olova u detinjstvu može voditi razvoju hipertrofije glomerula i oštećenju njihove funkcije u kasnijem periodu života. Novija istraživanja ukazuju da niski nivoi olova u krvi predstavljaju rizik za razvoj hronične bubrežne insuficijencije kod hipertenzivne populacije (83).

Neretko, nefrotoksičnost olova se dovodi u vezu i sa razvojem hipertenzije i efektima na kardio-vaskularni sistem, jer homeostatska kontrola na nivou bubrega reguliše ravnotežu vode i elektrolita putem filtracije, ponovne apsorpcije i izlučivanja. Izloženost olovu može oštetiti bubrežnu vaskularizaciju što za posledicu ima sistemsku hipertenziju i efekte na kardiovaskularni sistem, vodeći ka hroničnom porastu vaskularnog pritiska. Na ovaj način, olovom-indukovana hipertenzija se smatra jednim od potencijalnih faktora koji doprinose olovo-indukovanoj bubrežnoj bolesti ali i oslabljena bubrežna funkcija vodi zadržavanju tečnosti u organizmu i poremećaju regulacije krvnog pritiska (17,84).

### 1.1.5.4. Neurotoksičnost

Toksično dejstvo olova na nervni sistem je jedno od najopsežnije izučениh toksičnih efekata olova u epidemiološkim studijama koji je potvrđen i mnogobrojnim studijama na animalnim modelima. Kod dece, neurotoksičnost je jedan od najosetljivijih efekata olova na kom se zasniva određivanje referentne vrednosti olova u krvi (85). Dokazano je da nivo olova u krvi  $< 5 \mu\text{g/dL}$  negativno utiče na nervni sistem dece, dok kod odraslih postoje ograničeni dokazi (66). Izlaganje olovu u detinjstvu vodi nastanku intelektualnog deficita i funkcionalnih oštećenja nervnog sistema

(86–88), primarno usled nerazvijenosti krvno moždane barijere i razvojnog perioda kod mlađe populacije (89). Kod dece, neurobihejvioralni efekti olova koji su povezani sa nivoima olova u krvi  $\leq 10 \mu\text{g/dL}$  su: smanjena kognitivna funkcija, promene raspoloženja i ponašanja koje mogu doprineti problemima pri učenju (deficit pažnje, hiperaktivnost, autistično ponašanje i delikvencija), promene neuromotornih i neurosenzornih funkcija i vizuelno-motoričke integracije. Periferna neuropatija i encefalopatija kod dece se mogu javiti u slučajevima kada vrednosti koncentracije olova u krvi pređu vrednost od  $10 \mu\text{g/dL}$  (17).

Izloženost olovu u odraslom dobu i njegovo dejstvo na CNS povezano je sa poremećajima ponašanja, smanjenjem kognitivnih sposobnosti, anksioznošću, depresijom, glavoboljom itd. (48,86,90,91). Povišeni nivoi olova u krvi zapaženi su kod pacijenata sa različitim neurološkim bolestima kao što su Alchajmerova bolest, parkinsonizam, depresija, šizofrenija i bipolarni poremećaj (92,93). Kod odraslih, neurotoksični efekti olova koji se povezuju sa niskim nivoom izloženosti olovu tj. koncentracijama olova u krvi  $\leq 10 \mu\text{g/dL}$  su: poremećaji kognitivne funkcije uključujući poremećaje pažnje, pamćenja i učenja, promene neuromotornih i neurosenzornih funkcija uključujući produženo vreme reakcije i usporeno hodanje, tremor, promenjeno raspoloženje i ponašanje uključujući rizik od različitih oboljenja (anksioznost, depresija, šizofrenija i amiotrofična lateralna skleroza). Vrednosti olova u krvi  $\geq 10 \mu\text{g/dL}$  povezani su pored navedenog i sa smanjenjem volumena mozga, izmenjenom neurohemijom i smanjenom brzinom provodljivosti perifernih nerava (17).

#### **1.1.5.5. Toksičnost na kardio-vaskularni sistem**

Novija saznanja ukazuju da olovo deluje toksično i na kardio-vaskularni sistem, te se izloženost olovu dovodi u vezu sa povećanim rizikom od razvoja srčanih oboljenja i pojavom hipertenzije. Svi ovi efekti rezultiraju povećanjem mortaliteta od kardio-vaskularnih bolesti, delom kao rezultat izloženosti niskim nivoima olova iz okoline (94). Pozitivna povezanost izloženosti olovu sa krvnim pritiskom je utvrđena u mnogim studijama u različitim okruženjima, uključujući prospektivne studije sprovedene na ispitanicima relativno homogenih socio-ekonomskih grupa. Nekoliko studija je identifikovalo odnos doza-odgovor između izloženosti olovu i povišenog krvnog pritiska, što je i potvrđeno na eksperimentalnim modelima (95,96). Osim hipertenzije, u studijama sprovedenim na opštoj populaciji zabeležena je pozitivna povezanost izloženosti olovu sa klinički značajnim kardio-vaskularnim ishodom (kardio-vaskularna, koronarna bolest srca, smrtnost od moždanog udara i periferna arterijska bolest). U nekim studijama navedene korelacije su bile primećene pri nivoima olova u krvi  $< 5 \mu\text{g/dL}$  (17,96).

#### **1.1.5.6. Toksičnost na reproduktivni i endokrini sistem**

Olovo deluje toksično i po reproduktivni sistem, dovodeći do hormonalnih, histoloških i funkcionalnih poremećaja reproduktivnog sistema žena i muškaraca što za posledicu ima smanjenje plodnosti (26,97,98). Sve veći broj dokaza ukazuje na štetne efekte olova na muški reproduktivni sistem, te se izloženost olovu može smatrati kao jedan od faktora koji doprinose nastanku muške neplodnosti. Epidemiološke studije na profesionalno izloženoj muškoj populaciji pokazale su da su muškarci sa vrednostima olova u krvi većim od  $10 \mu\text{g/dL}$  bili u većem riziku od razvoja neplodnosti (99,100). Nedavne studije su pokazale da olovo smanjuje broj i pokretljivost spermatozoida i dovodi do morfoloških promena testisa čak i pri vrednostima olova u krvi nižim od  $10 \mu\text{g/dL}$  (101,102). Efekat olova na nivo testosterona u serumu je još uvek nerazjašnjen jer rezultati ukazuju na diskrepanciju tj. i na smanjenje, ali i povećanje nivoa testosterona (97,103,104).

Postoje dokazi da olovo može uticati na endokrini sistem kao endokrini ometač, utičući na fiziološke vrednosti hormona i dovodeći do endokrinog disbalansa (98). Nekoliko epidemioloških studija je dovelo u vezu izloženost olovu i efekte na hormone štitaste žlezde, te na nivo kortizola i insulina (17,105). Jedan od najviše izučavanih efekata olova u ovom smislu je uticaj na nivo i funkciju tiroidnih hormona. Dosadašnji podaci ukazuju na povezanost ekspozicije olova i sa

smanjenjem i sa povećanjem serumske koncentracije tiroidnih hormona s tim da dozna zavisnost nije utvrđena kao ni relevantni mehanizmi kojima olovo dovodi do hormonalnog disbalansa (17,106).

### 1.1.5.7. Karcinogenost

Neorganska jedinjenja olova su od strane Internacionalne agencije za istraživanje karcinoma (engl. *International Agency for Research on Cancer, IARC*) klasifikovana kao verovatno karcinogena za ljude (Grupa 2A), na osnovu dovoljno dokaza o karcinogenosti kod eksperimentalnih životinja i ograničenih dokaza o karcinogenosti kod ljudi. Postoji dovoljno dokaza na eksperimentalnim životinjama za karcinogenost olovo-acetata, olovo-subacetata, olovo-hromata i olovo-fosfata. U eksperimentima na životinjama pokazano je da olovo izaziva karcinom bubrega nakon hronične oralne i parenteralne izloženosti, bubrežni tubularni adenom i gliome mozga. Epidemiološke studije pružaju ograničene dokaze o povezanosti olova sa incidencom karcinoma pluća, želuca, bubrega i mozga/nervnog sistema. Sa druge strane, ne postoje adekvatni dokazi na eksperimentalnim životinjama o karcinogenosti organskih jedinjenja olova te se organska jedinjenja olova od strane *IARC* klasifikuju u grupu 3 (107).

### 1.1.6. Biomonitoring i procena ekspozicije olovu

Biomarker ekspozicije olovu koji se najčešće razmatra u epidemiološkim studijama i kliničkoj praksi je koncentracija olova u punoj krvi koja se izražava u jedinicama  $\mu\text{g/dL}$  a odražava aktuelnu ekspoziciju. Kao uzorak za analizu uzima se venska krv, dok uzorkovanje iz prsta treba izbegavati usled potencijalne kontaminacije sa površina jagodice prsta i mogućih lažno visokih koncentracija olova. Podatak dobijen merenjem olova u krvi govori o nivou izloženosti, međutim dužina ekspozicije ne može biti poznata imajući u vidu da se olovo iz krvi brže eliminiše od olova iz kostiju i da odražava skorašnju ekspoziciju. Za procenu kumulativne izloženosti olovu primenjuje se indirektna neinvazivna metoda merenja olova u kostima (rendgenska fluorescentna analiza, XRF) koja se ne koristi rutinski u praksi a odražava celokupnu opterećenost organizma olovu. Pored ovoga kao biomarker ekspozicije mogu poslužiti i koncentracije olova u urinu, kosi, noktima i zubima. Procena veličine depoa olova u organizmu bazira se na količini izlučenog olova urinom tokom jednodnevne ili petodnevne terapije helatima. U kostima olovo nije ravnomerno raspoređeno. Olovo ima tendenciju da se akumulira u onom delu kosti koji prolazi kroz najaktivniju kalcifikaciju u vreme izlaganja organizma olovu. Tokom detinjstva kalcifikacija kosti je najaktivnija u trabekularnoj kosti, dok se u odrasloj dobi kalcifikacija javlja na mestima remodelovanja i u kortikalnoj i u trabekularnoj kosti. Ovo sugeriše da će se akumulacija olova odvijati pretežno u trabekularnim kostima (patela, calcaneus i sternum) tokom detinjstva i u kortikalnim (tibija, falangs ili ulna), odnosno trabekularnim kostima u odrasloj dobi (17). Biomarkeri efekta olova predstavljaju biološke parametre koji odražavaju patofiziološke promene nastale usled izloženosti olovu, a njihovo određivanje daje doprinos pri dijagnostifikovanju trovanja olovom. Olovo inhibira aktivnost enzima koji učestvuju u sintezi hema pri čemu dolazi do nakupljanja određenih supstrata u krvi i proizvoda u urinu. U krvi se određuje aktivnost enzima eritrocitne ALAD, koncentracija Zn protoporfirina i protoporfirina IX, dok se u urinu meri koncentracija koproporfirina i ALA (42).

Nivoi olova u krvi kod izložene populacije se kreću u opsegu od  $1 \mu\text{g/dL}$  do  $50 \mu\text{g/dL}$  pa i više kod profesionalno izloženih osoba (11,24,108). Danas se smatra da se većina mehanizama koji indukuju toksične efekte olova aktivira već pri koncentracijama olova u krvi nižim od  $5 \mu\text{g/dL}$ . Ova vrednost je 2012. godine proglašena kao granična referentna vrednost nivoa olova u krvi koja odgovara 97,5 percentilu distribucije vrednosti u populaciji dece u SAD starosti 1–5 godina iz studije sprovedene od strane *National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)* 2007-2010. godine. Na osnovu dosadašnjih istraživanja i studija sprovedenih u periodu 2015-2018. *NHANES*, Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Center for disease control and prevention, CDC*) 2021. godine donosi reviziju referentne vrednosti olova u krvi, prvenstveno kod dece kao osetljive

populacije sa 5 µg/dL na 3,5 µg/dL (85). Poznato je da se sa povećanjem vrednosti olova u krvi kod dece, kao osetljive populacije, snižava količnik inteligencije (IQ). Radi procene sniženja IQ, izvršen je proračun od strane SZO kojim se tvrdi da izloženost olovu putem hrane od 0,6 µg/kg t.m./dan (12 µg/dan za dete od 20 kg ≈ 2,1 µg Pb/dL krvi) vodi smanjenju vrednosti IQ za jednu jedinicu. Slično, Evropska agencija za bezbednost hrane (engl. *European Food Safety Authority, EFSA*) izračunala je referentnu vrednost za nivo olova u krvi od 1,2 µg/dL (0,5 µg/kg t.m./dan) na osnovu 95-tog percentila donje granice pouzdanosti referentne doze (BMDL) za 1% dodatni rizik kod dece za promenu u IQ. Razmatrajći navedene podatke, SZO 2012. godine, povlači do tada prihvaćenu vrednost za tolerišući nedeljni unos olova od 25 µg/kg t.m. jer je dovedena u vezu sa smanjenjem inteligencije kod dece i porastom sistolnog krvnog pritiska kod odraslih, uz zaključak da nije moguće utvrditi novu, koja bi se mogla smatrati zdravstveno bezbednom (109).

Imajući u vidu da epidemiološka ispitivanja dovode u vezu izloženost veoma niskim dozama olova sa određenim štetnim efektima po zdravlje ljudi, regulatorna tela ulažu velike napore radi procene rizika od izloženosti olovu i preispitujući važeću regulativu kao i mogućnosti za njenu primenu. Štaviše, pojedina istraživanja ukazuju na činjenicu da svaka izloženost olovu može izazvati toksičan efekat (110). Budući da je većina dosadašnjih istraživanja bila fokusirana na efekte koji se javljaju pri visokim nivoima olova u krvi, nema dovoljno dostupnih podataka za formiranje odnosa doza-odgovor i utvrđivanje referentnih toksikoloških doza za procenu rizika u uslovima niske izloženosti olovu (17,26). Stoga, javila se potreba za popunjavanjem naučne praznine vezane za efekte olova pri niskim dozama, koja bi doprinela regulatornoj proceni bezbednog nivoa olova u krvi kod dece i odraslih.

U Srbiji za decu i opštu populaciju nema preporučenih graničnih vrednosti koncentracija olova u krvi te se koriste SAD preporuke. U studiji sprovedenoj na opštoj populaciji Srbije srednje vrednosti koncentracija olova za pušače su iznosile oko 2,2 µg/dL, dok je nešto viša srednja vrednost zabeležena kod pušača, oko 3,37 µg/dL (24). Za profesionalnu izloženost prema Pravilniku o preventivnim merama za bezbedan i zdrav rad pri izlaganju hemijskim materijama („Sl. glasnik RS”, br. 106/2009, 117/2017 i 107/2021), granična vrednost iznosi 50 µg Pb/dL krvi, a izdvaja se granična vrednost kod zaposlene žene u generativnom periodu mlađe od 45 godina, koja iznosi 30 µg Pb/dL. Pravilnik takođe preporučuje praćenje zdravstvenog stanja ako je kod bilo kog zaposlenog izmeren nivo olova u krvi veći od 40 µg Pb/dL, odnosno 20 µg Pb/dL kod žene u generativnom periodu (111). Prema Pravilniku o prethodnim i periodičnim lekarskim pregledima zaposlenih na radnim mestima sa povećanim rizikom („Sl. glasnik RS”, br. 120/2007, 93/2008 i 53/2017) radnici u Srbiji podležu prethodnim pregledima pre početka rada na mestima na kojima će biti izloženi olovu i periodičnim pregledima na 12 meseci (112).

### **1.1.7. Terapija trovanja olovom**

Prema smernicama SZO od 2021. godine neke od mogućnosti za terapiju trovanja pacijenata izloženih olovu su prekid izloženosti, primena helata, simptomatska terapija i suplementacija bioelementima (113). Iznimno, prekid izloženosti može da i obuhvata gastrointestinalnu dekontaminaciju u slučajevima kada je došlo do gutanja predmeta koje je izgrađeno od materijala koji sadrži olovo. To su uglavnom akutna trovanja dece nastala pri gutanju nakita, igrački ili različitih drugih olovnih predmeta.

Helatna terapija podrazumeva primenu helatnog agensa sa ciljem sniženja koncentracije olova u krvi. Primena helatne terapije je sve ređa opcija terapije trovanja olovom usled kratkotrajnog efekta na snižavanje olova u krvi. Od helatnih agenasa najčešće se koriste: CaNa<sub>2</sub>-EDTA parenteralno, dimerkaprol (BAL) parenteralno i 2,3-dimerkapto sukcinilna kiselina (DMSA) oralno. Helatni agensi kompleksiraju metale gradeći metalo-helatni kompleks koji se dalje izlučuje putem urina i fecesa. Međutim, kako imaju mnogobrojne neželjene efekte i nemaju visoku specifičnost za olovo njihovom

primenom dolazi do heliranja i eliminacije i drugih metala a najčešće Zn. Doza i način primene helatnih agenasa u mnogome zavisi od stanja organizma, bubrežne funkcije i statusa bioelemenata. Stoga je pre primene helatnih agenasa neophodna konzultacija sa kliničkim toksikologom (17,113).

Intervencija na nivou dijetetskog režima u smislu suplementacije Ca, Zn i Fe u pojedinim situacijama može doprineti smanjenju koncentracije olova u krvi, a zavisi od nutritivnog statusa organizma pre svega unosa ovih bioelemenata. Ova preporuka se zasniva na istraživanjima gde je pokazano da se olovo kompetitivno apsorbuje u gastrointestinalnom traktu sa navedenim bioelementima i da deficit bioelemenata u krvi može dovesti do povišenog procenta apsorpcije olova (17,113).

Kada su toksični efekti olova u pitanju, deca zasigurno čine najosetljiviju populaciju. Smatra se da ne postoji bezbedan nivo olova u krvi dece te se u pojedinim razvjenim zemljama vrši redovan skrining koncentracija olova u krvi. Na primer, u SAD. stručno telo *Pediatric Environmental Health Specialty Units (PEHSUs)* izdalo je 2021. godine nove smernice vezane za kliničke korake u trapiji trovanja olovom zasnovane na koncentraciji olova u krvi dece. U Tabeli 1 su prikazane kliničke smernice za terapiju trovanja dece kao osetljive populacije, zasnovane na koncentracijama olova izmerenim u krvi, dok su u Tabeli 2 prikazane smernice terapije trovanja olovom kod profesionalno izložene populacije.

**Tabela 1.** Klinički menadžment dece pri izloženosti olovu

Nivo olova u krvi (µg/dL)	Preporuka
< 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Edukacija i savetovanje pacijenata</li> <li>➤ Dalji monitoring koncentracije olova za 3-12 meseci</li> <li>➤ Rutinska provera nutritivnog statusa</li> </ul>
5-14	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sprovesti prethodne preporuke</li> <li>➤ Identifikacija izvora ekspozicije</li> <li>➤ Suplementacija Fe ako postoji deficit</li> <li>➤ Saveti za konzumiranje namirnica bogatih Ca i Fe</li> <li>➤ Dalje praćenje nakon 1-3 meseca</li> </ul>
15-44	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sprovesti prethodne korake</li> <li>➤ Identifikovati kliničke simptome</li> <li>➤ Sprovođenje zdravstvene kontrole kućnog okruženja sa ciljem identifikovanja izvora izloženosti</li> <li>➤ Ponoviti merenje za 1-2 nedelje</li> <li>➤ Sprovođenje rendgenskog snimanja sa ciljem identifikacije potencijalnih stranih tela</li> <li>➤ Kontaktirati nacionalni centar za kontrolu trovanja</li> </ul>
> 44	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sprovesti prethodne korake</li> <li>➤ Hospitalizacija</li> <li>➤ Neurološki pregled</li> <li>➤ Opsežne biohemijske i hematološke analize</li> <li>➤ Terapija trovanja (primena helatne terapije)</li> </ul>

Izvor: (114)

**Tabela 2.** Klinički menadžment profesionalno izložene populacije olovu

Nivo olova u krvi (µg/dL)	Preporuka
Svi zaposleni	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Inicijalni monitoring olova</li> <li>➤ Dalji monitoring koncentracije olova svakih 6 meseci</li> <li>➤ Ciljna vrednost za trudnice je &lt; 5 µg/dL</li> </ul>
≥ 5-9	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Češće sprovoditi monitoring</li> <li>➤ Preporučeno udaljavanje sa posla zaposlenih osoba ženskog pola koje su trudne ili planiraju trudnoću</li> <li>➤ Nastaviti sa monitoringom</li> </ul>
10-19	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Dalji monitoring koncentracije olova u krvi svaka 2 meseca dok 2 uzastopna merenja ne budu &lt; 10 µg/dL</li> <li>➤ Udaljavanje sa posla zaposlenih osoba ženskog pola koje su trudne ili planiraju trudnoću</li> <li>➤ Sprovesti internu kontrolu uslova rada</li> <li>➤ Nastaviti sa monitoringom</li> </ul>
≥ 20	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Udaljavanje sa posla zaposlenog čiji je nivo olova u krvi ≥ 20 µg/dL nakon ponovljenog merenja u mesec dana ili ako je nivo olova 30 µg/dL u jednom merenju</li> <li>➤ Vraćanje na posao ako uzastopno dva meseca nivo olova u krvi iznosi ≤ 15 µg/dL</li> <li>➤ Sprovesti internu kontrolu uslova rada</li> <li>➤ Nastaviti sa monitoringom</li> </ul>
≥ 30	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Odmah udaljiti zaposlenog sa posla</li> <li>➤ Vraćanje na posao ako uzastopno dva meseca nivo olova u krvi iznosi ≤ 15 µg/dL</li> <li>➤ Sprovesti internu kontrolu uslova rada</li> <li>➤ Nastaviti sa monitoringom</li> </ul>

Izvori: (17,115)

## 1.2. Benchmark modelovanje odnosa doza-odgovor

Toksikološka procena rizika po zdravlje ljudi je naučno zasnovana metoda koja se sastoji iz četiri faze: 1) identifikacija hazarda 2) procena odnosa doza-odgovor 3) procena ekspozicije i 4) karakterizacija rizika. U drugoj fazi, procena odnosa doza-odgovor, cilj je ispitati odnos između doze i jačine izazvanog toksičnog efekta kao i odrediti dozu ispitivane supstance koja će se koristiti kao polazna osnova za evaluaciju odnosa izloženosti i toksičnog odgovora za efekte sa pragom. U toksikološkoj proceni rizika se duži niz godina kao polazna doza koristi *NOAEL* (engl. *No observed adverse effects level*, *NOAEL*) tj. najviša doza koja ne izaziva štetan efekat. Međutim, *EFSA* i *SZO* sugerišu zamenu *NOAEL* vrednosti *Benchmark* dozom (*BMD*) (116,117). *Benchmark* pristup je od posebnog značaja u situacijama u kojima nije moguće identifikovati *NOAEL*, zatim za određivanje referentne doze za granicu izloženosti (engl. *Margin of Exposure*, *MOE*) u slučaju supstanci koje su genotoksične i kancerogene, kao i za procenu odnosa doza-odgovora upotrebom podataka iz epidemioloških studija (118).

*Benchmark* metodologiju prvi je uveo *Crump* 1984. godine (119) za kvantalne podatke kao savremena alternativa *NOAEL* pristupu. Imajući u vidu da *Benchmark* pristup daje širok opseg podataka o odnosu doza-odgovor i omogućava kvantifikaciju nesigurnosti ovo ga čini naučno

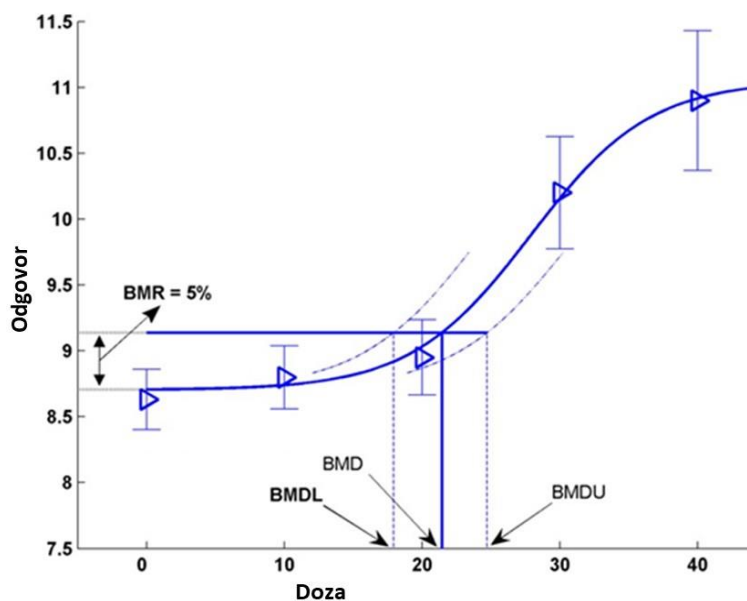


naprednijim metodom od tradicionalnog *NOAEL* pristupa (116). *Benchmark* doza (BMD) predstavlja statističku donju granicu pouzdanosti doze koja dovodi do malog povećanja efekta, uglavnom 5-10% u odnosu na kontrolnu vrednost.

Procena podataka o odnosu doza-odgovor *Benchmark* pristupom takođe podrazumeva značajan iskorak iz perspektive 3R pravila - zamena (engl. *Replacement*) eksperimentalnih životinja kad god je moguće alternativnim metodama ili vrstama koje su niže na filogenetskoj lestvici, smanjenje (engl. *Reduction*) broja životinja i usavršavanje (engl. *Refinement*) oglednih procedura u cilju smanjenja patnje pri izvođenju ogleđa, ali i poboljšavanju uslova gajenja i držanja životinja. Činjenica da će *Benchmark* pristup doprineti 3R pravilu, posebno smanjenju broja eksperimentalnih životinja, direktno proizilazi iz činjenice da je to naučno bolji i precizniji metod analize podataka o odnosu doza-odgovor u poređenju sa *NOAEL* pristupom, i da se dobija širi spektar podataka o odnosu doza-odgovor (120,121).

*Benchmark* modelovanje se vrši upotrebom dostupnih softvera. Praktično, eksperimentalni podaci se fituju u fleksibilne matematičke modele, nakon čega se identifikuje doza koja odgovara definisanom nivou odgovora. Definisan nivo odgovora označen je kao BMR (engl. *Benchmark Response, BMR*), a odgovarajuća *Benchmark* doza kao BMD (118). Većina softvera za procenu rizika koristi donju granicu pouzdanosti od 95% za BMD, dok je 2017. godine EFSA preporučila da se opiše čitav interval pouzdanosti, uključujući donju i gornju granicu pouzdanosti BMD, odnosno BMDL (engl. *BMD lower limit*) i BMDU (engl. *BMD upper limit*) (116,122). *Benchmark* pristup primenljiv je na sve toksikološke efekte i koristi sve podatke o odnosu doza-odgovor za procenu oblika krive ukupnog odnosa doza-odgovor za određivanje kritične BMDL vrednosti studije. Ova vrednost predstavlja najnižu vrednosti BMDL za različite praćene efekte. Kritičan efekat bi predstavljao toksični efekat koji rezultira najnižom vrednošću BMDL.

Na Slici 2 dat je primer modelovanja odnosa doza-odgovor gde se mogu uočiti srednje vrednosti (trouglovi) koji su prikazani zajedno sa njihovim intervalima pouzdanosti. Puna kriva predstavlja matematički model doza-odgovor. Ova kriva određuje tačku procene BMD koja se generalno definiše kao doza koja odgovara niskoj, ali merljivoj promeni u odgovoru koji se označava kao BMR. Isprekidane krive predstavljaju, redom, gornju i donju granicu pouzdanosti od 95%. Njihovi preseki sa horizontalnom linijom su na donjoj i gornjoj granici BMD, označeni kao BMDL i BMDU. Na Slici 2, BMD odgovara promeni odgovora od 5% u odnosu na kontrolnu vrednost ( $BMR = 5\%$ ). Fitovana kriva daje procenjeni odgovor kontrole 8,7, a povećanje od 5% je jednako 9,14 ( $8,7 + 0,05 \times 8,7$ ). Dakle,  $BMD_{05}$  od 21,50 se dobija iz preseka horizontalne linije, pri odgovoru od 9,14, sa ugrađenim modelom doza-odgovor. U ovom primeru,  $BMDL_{05}$  ima vrednost 18.



**Slika 2.** Prikaz modelovanja odnosa doza-odgovor (116)

Modeli koji su odobreni od strane regulatornih tela, koja razmatraju upotrebu *Benchmark* pristupa u toksikologiji, su *Exponential*, *Inverse Exponential*, *Log-Normal* i *Hill* prikazani u Tabeli 3. Kombinacijom navedenih modela, uzimajući u obzir dobijene parametre, softver generiše novi model – *Model averaging*, koji prema uputstvima EFSA najbolje opisuje dobijenu doznu zavisnost (118). Upravo najnovije smernice za primenu *Benchmark* modelovanja u toksikologiji, kao i istraživači koji se bave ovom tematikom (118,123) preporučuju upotrebu metode usrednjavanja modela (engl. *model averaging*) koja uzima u obzir nesigurnosti koje potiču od podataka kao i nesigurnosti modela.

U modelima parametar y je odgovor dok parametar x označava dozu. Ostali parametri opisuju model i to:

- Parametar a – predstavlja efekat pri nultoj dozi (*background response*)
- Parametar b – predstavlja potentnost (*potency*)
- Parametar c – predstavlja maksimalni odgovor (*maximum response*)
- Parametar d – predstavlja parametar koji opisuje nagib krive (*steepness parameter*)

**Tabela 3.** Prikaz matematičkih modela korišćenih pri modelovanju odnosa doza-odgovor u softveru PROASTweb 70.1

Model	Matematički izraz	
<i>Exponential</i>	$y = a [c - (c - 1) \exp(-bx-d)]$	$y = a \exp(bxd)$
<i>Hill</i>	$y = a [1 - xd/(bd + xd)]$	$y = a [1 + (c - 1)xd/(bd + xd)]$
<i>Inverse exponential</i>	$y = a [1 + (c - 1) \exp(-bx-d)]$	/
<i>Lognormal</i>	$y = a [1 + (c - 1) \Phi(\ln b + d \ln x)]$	/

y - funkcija doze x, a - efekat pri nultoj dozi, b - parametar potentnosti, c - parametar maksimalnog efekta, d - parametar nagiba krive (116).

## 2. OSNOVNE HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu dosadašnjih naučnih saznanja koja ukazuju da olovo pri niskim nivoima u krvi predstavlja zdravstveni rizik, SZO donosi odluku da 2012. povuče vrednost za tolerišući nedeljni unos olova od 25 µg/kg t.m. koja je dovedena u vezu sa smanjenjem inteligencije kod dece i porastom sistolnog krvnog pritiska kod odraslih i donosi zaključak da nije moguće utvrditi novu koja bi se mogla smatrati zdravstveno bezbednom (109). Imajući u vidu da je u današnje vreme opšta populacija hronično izložena niskim nivoima olova različitim putevima, a da se podaci o toksičnosti iz dosadašnjih studija uglavnom baziraju na izloženosti visokim dozama, postoji potreba da se ispituju mehanizmi toksičnog dejstva olova u uslovima produžene izloženosti niskim dozama. Sprovedenjem animalne studije na *Wistar* pacovima, omogućili bi se laboratorijski kontrolisani uslovi i eliminisao uticaj ko-faktora (nedostatak epidemioloških studija). Kako je subakutni model pacova toksikološki i regulatorno prihvaćen, dobijeni rezultati bi bili uporedivi sa već dostupnim podacima.

Pretpostavljeno je da će primena olova na modelu pacova u šest niskih rastućih doza u opsegu 0,1-15 mg Pb/kg tokom perioda od 28 dana rezultovati koncentracijama olova u krvi koje odgovaraju koncentracijama izmerenim kod opšte populacije kako bi se simulirala realna izloženost. Dodatno, rezultati dobijene studije će omogućiti dobijanje podataka o toksičnim mehanizmima i efektima niskih doza olova u različitim organima kao i izračunavanje *Benchmark* doza za ispitivane toksične efekte, što bi doprinelo određivanju referentne doze olova u procesu toksikološke procene rizika po zdravlje ljudi i identifikaciji kritičnog toksičnog efekta studije. Imajući u vidu napore regulatornih tela za određivanjem dozvoljenih nivoa olova, dobijeni rezultati bi dali naučni doprinos u donošenju odluka pri izloženosti niskim dozama olova.

Ciljevi istraživanja doktorske disertacije su:

1. Ispitati uticaj šest niskih rastućih doza olova na prirast telesne mase i prirast mase organa pacova.
2. Ispitati uticaj šest niskih rastućih doza olova na hematološke parametre u krvi i biohemijske parametre u serumu pacova.
3. Ispitati uticaj šest niskih rastućih doza olova na nivoe tiroidnih hormona i testosterona u serumu kod izloženih pacova.
4. Odrediti nivoe olova u punoj krvi i organima pacova nakon subakutne izloženosti niskim rastućim dozama olova.
5. Ispitati uticaj šest niskih rastućih doza olova na nivoe bioelemenata: Cu, Zn, Mn i Fe u punoj krvi i organima izloženih pacova.
6. Odrediti parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu i organima pacova nakon subakutne izloženosti niskim rastućim dozama olova.
7. Ispitati uticaj šest niskih rastućih doza olova na aktivnost acetilholinesteraze u mozgu izloženih pacova.
8. Ispitati patohistološke promene u tkivima pacova nakon izloženosti niskim rastućim dozama olova.
9. Odrediti BMD olova za ispitivane efekte u krvi i organima pacova.
10. Odrediti BMD studije i kritični toksični efekat.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Hemikalije

Olovo(II)-acetat trihidrat ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \times 3\text{H}_2\text{O}$ )  $\geq 99,5$  % čistoće, proizvođača Alkaloid Skopje, Makedonija je korišćen za pripremu rastvora olova kojima su tretirane životinje. Analitički standardi olova i bioelemenata (Cu, Zn, Mn, Fe) bili su visoke analitičke čistoće namenjeni za merenje elemenata u tragovima, osnovne koncentracije 1000  $\mu\text{g/mL}$  (*Agilent Technologies*). Vodonič-peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, *Scientific Fischer*, Nemačka) i azotna kiselina ( $\text{HNO}_3$  68%, *Scientific Fischer*, Nemačka) korišćeni su za mineralizaciju uzoraka. Reagensi korišćeni za određivanje hormona su nabavljeni od strane *Roche Diagnostics* (Manhajm, Nemačka). Ostale hemikalije, korišćene u eksperimentu, su bile visokog kvaliteta i visoke analitičke čistoće (*p.a.*) nabavljene na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu od pouzdanih proizvođača (*Sigma Aldrich*, Nemačka i *Scientific Fischer*, Nemačka).

#### 3.2. Eksperimentalni dizajn

Sudija je sprovedena na mužjacima albino pacova (*Rattus norvegicus*), *Wistar* soja, starosti šest nedelja koji su preuzeti iz Centra veterinarske službe Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Studija je sprovedena u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i u laboratorijama Katedre za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“. Nakon dopremanja, 42 pacova su randomizovana po šest u grupi i raspodeljena u sedam plastičnih kaveza sa metalnim poklopcima u vidu rešetaka. Životinje su držane u uslovima temperature vazduha  $25 \pm 3$  °C, relativne vlažnosti vazduha 40-60% i naizmeničnom, programiranom, 12-to časovnom ciklusu svetla i mraka. Voda za piće sa česme gradskog vodovoda i standardna hrana u peletima, su pacovima bili dostupni „*ad libitum*“.

Nakon nedelju dana privikavanja životinja na uslove boravka u vivarijumu otpočet je tretman olovom. Grupe životinja su svako jutro tokom 28 dana, oralnom gavažom pomoću metalne sonde, primale olovo-acetat u obliku vodenog rastvora u dozama: 0,1; 0,5; 1; 3; 7 i 15 mg Pb/kg t.m. Kontrolna grupa životinja dobijala je destilovanu vodu. Doze olova su odabrane sa ciljem simuliranja izloženosti niskim dozama (Tabela 4). Ispitivane doze predstavljaju raspon doza, od onih koje su niže od do sada publikovanih *NOAEL* doza olova koje ne izazivaju štetan efekat (124), do doze za koju se smatra da će dovesti do toksičnih efekata (125). Dodatno, doze su odabrane sa ciljem da se kod eksperimentalnih životinja nakon 28 dana dobiju koncentracije olova u krvi koje odgovaraju publikovanim vrednostima olova u krvi izmerenih kod opšte populacije (97,126,127) kako bi se na animalnom modelu simulirala niska izloženost olovu kod opšte populacije.

Aplikacija rastvora olova je vršena svakodnevno u isto doba dana, ujutru između 9 h i 11 h. Takođe, telesna masa pacova je beležena svakodnevno. Dvadeset četiri časa od poslednje doze (29. dan), životinje su žrtvovane na human način uz upotrebu anestetika, intra peritonealno (*i.p.*) ketamin (300 mg/kg t.m.) + ksilazin (30 mg/kg t.m.). Sve procedure u vezi tretmana životinja koje su sprovedene tokom eksperimenta su u skladu sa protokolom odobrenim od strane Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (broj etičke dozvole: 323-07-11822/2018-05).

**Tabela 4.** Pregled eksperimentalnih doznih grupa pacova

	Grupe						
<b>Doza mg Pb/kg t.m./dan</b>	0	0,1	0,5	1	3	7	15
<b>Broj pacova po grupi</b>	6	6	6	6	6	6	6
<b>Oznaka grupe</b>	Kontrola	Pb0.1	Pb0.5	Pb1	Pb3	Pb7	Pb15

### 3.3. Priprema krvi i organa za analize

Krv je uzorkovana kardijačnom punkcijom uz upotrebu plastičnih sterilnih špriceva (Sinomedic, Sinofarm, Srbija) i sterilnih igala širine 22G (NIPRO, Japan). Sa ciljem dobijanja pune krvi jedan špric je bio obložen antikoagulansom, kalijum etilendiamin-tetraacetatom ( $K_2EDTA$ , 6% vodeni rastvor) dok je drugim špricem, bez antikoagulansa uzeta krv za pripremu seruma. Krv bez antikoagulansa je ostavljena 30 min. na sobnoj temperaturi da slobodno koaguliše a zatim je izdvojen serum centrifugiranjem uzoraka na  $1000-2000 \times g$  10 minuta. Puna krv je odložena u plastične ljubičaste vakutejnere obložene sa  $K_2EDTA$ . U punoj krvi su izmereni hematološki parametri i nivoi metala, dok je serum korišćen za određivanje biohemijskih parametara, parametara oksidativnog statusa i hormona.

Neposredno nakon uzorkovanja krvi, izolovani su i sledeći organi: jetra, bubrezi, mozak, srce, testisi, slezina, femur, pankreas i timus. Svi organi su obrađeni i oprani u hladnom fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl), zatim osušeni pomoću filter hartije i izmereni na analitičkoj vagi radi računanja relativne masa organa (procenat odnosa mase organa i telesne mase životinje poslednjeg 29. dana). Nakon merenja, organi su podeljeni na više delova u zavisnosti od broja planiranih analiza (Tabela 5). Jetra je podeljena na tri dela, gde je oko jedan gram tkiva levog lateralnog lobusa jetre odvojen za analize oksidativnog statusa i patohistologiju, dok su u ostatku organa određivani metali. Slezina je poprečno podeljena na dva jednaka dela, jedan namenjen za analizu metala a drugi za patohistološku analizu. Levi bubrež je odvojen za patohistološku analizu, dok je desni sečen uzdužno na dva dela od kojih jedan deo za određivanje parametara oksidativnog statusa a drugi za određivanje metala. Srce je uzdužno podeljeno na levi deo (određivanje metala) i desni deo (određivanje parametara oksidativnog statusa). Levi testis je korišćen za patohistološku analizu, dok su u desnom testisu određivani metali. Mozak je podeljen na 4 jednaka dela pri čemu je levi prednji deo mozga korišćen za analize parametara oksidativnog statusa, desni prednji deo za analize metala, zadnji levi deo za određivanje aktivnosti enzima acetilholinesteraze i zadnji desni deo za patohistološku analizu. Levi femur je izolovan za određivanje metala. U timusu i pankreasu su mereni metali.

Uzorci za analizu parametara oksidativnog statusa su odloženi u ependorf tube, prethodno podvrgnuti brzom smrzavanju pomoću tečnog azota. Nakon toga odloženi su u zamrzivač na  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Uzorci za analizu metala čuvani su u zamrzivaču na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Uzorci organa za patohistološku analizu čuvani su u 10% rastvoru formaldehida do dalje histološke obrade. Određivanje enzima acetilholinesteraze je rađeno iz svežih uzoraka mozga neposredno nakon izolacije organa.

### 3.4. Određivanje hematoloških parametara

Analiza hematoloških parametara u punoj krvi pacova je obuhvatila određivanje broja leukocita (WBC), eritrocita (RBC), hemoglobina (HGB), hematokrita (HCT), prosečnog volumena eritrocita (MCV), srednje vrednosti sadržaja hemoglobina u eritrocitima (MCH), srednje vrednosti koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC) i broja trombocita (PLT). Sva hematološka ispitivanja obavljena su korišćenjem komercijalnih reagenasa u akreditovanoj laboratoriji u skladu sa principima Dobre laboratorijske prakse.

### 3.5. Određivanje biohemijskih parametara

Biohemijske analize su merene u serumu pacova na Beckman Coulter analizatoru (AU 480, Beckman Coulter, Brea, Kalifornija, SAD) i uključivali su sledeće parametre: azot poreklom iz uree (BUN), kreatinin (CRE), mokraćnu kiselinu (UA), ureu, ukupne serumske proteine (TP), albumin (ALB), direktni bilirubin (DB), ukupan bilirubin (TB), aspartat aminotransferazu (AST), alanin aminotransferazu (ALT), alkalnu fosfatazu (ALP), amilazu (AMY), laktat dehidrogenazu, glukozu, ukupni holesterol, trigliceride (TG), HDL-holesterol, LDL-holesterol, c-reaktivni protein (CRP),

natrijum (Na), kalijum (K), fosfor (P) i magnezijum (Mg). Sva biohemijska ispitivanja obavljena su korišćenjem komercijalnih reagenasa u akreditovanoj laboratoriji u skladu sa principima Dobre laboratorijske prakse.

**Tabela 5.** Raspodela organa za analize

Organ	Broj delova	Analize			
1. Jetra	3	Metali	Oksidativni status	Patohistologija	
2. Bubrezi	3	Metali	Oksidativni status	Patohistologija	
3. Mozak	4	Metali	Oksidativni status	Patohistologija	Acetilholinesterza
4. Srce	2	Metali		Oksidativni status	
5. Testisi	2	Metali		Patohistologija	
6. Slezina	2	Metali		Patohistologija	
7. Femur	1	Metali			
8. Pankreas	1	Metali			
9. Timus	1	Metali			

### 3.6. Određivanje metala

Uzorci za analizu metala (krv i organi) pripremani su metodom vlažne mineralizacije uz dodatak oksidacionih sredstava u zatvorenom sistemu mikrotalasne pećnice (Milestone, Start D SK-10 T, Milestone Srl, Sorisole, Italija). Na analitičkoj vagi odmereno je do 1 g tkiva, odnosno ispipetirano automatskom pipetom iz ependorfa do 1 mL pune krvi i preneto u kivete za razaranje. U svaku od kiveta dodato je 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) i 7 mL HNO<sub>3</sub> (68%). Kivete su zatvorene namenskim poklopcima, dodatno pritegnutim mehanizmom za zatvaranje i pravilno odložene u mikrotalasnu pećnicu. U jednom ciklusu razaranja korišćeno je 10 kiveta od kojih je 9 sadržalo analizirane uzorke a jedna slepu probu. Kiveta u kojoj se nalazio uzorak najveće mase predstavljala je referentni segment koji je služio za kontrolu radne temperature sistema. Nakon pripreme uzoraka, sproveden je programiran proces razaranja koji je podrazumevao tri faze:

- 1) zagrevanje sistema 15 min. do 180 °C
- 2) održavanje temperature 15 min. na 180 °C
- 3) programsko hlađenje 15 min.

Nakon postizanja temperature zatvorenog sistema mikrotalasne pećnice na nižu vrednost od 60 °C, kivete su izvađene, prenete u digestor i otvorene mehanizmom za otvaranje. Nakon hlađenja uzoraka u digestoru na sobnu temperaturu vršeno je kvantitativno prenošenje u normalni stakleni sud od 25 mL koji je zatim dopunjen dejonizovanom vodom do crte. Uzorci su preneti i čuvani u sterilnim plastičnim bočicama od 50 mL sa dvostrukim zatvaranjem do merenja koncentracije metala.

Koncentracija metala je merena metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije na aparatu Agilent Technologies GTA 120 Graphite Tube Atomizer - 200 Series AA, 240 FSAA, Santa Clara, CA, SAD, u Centralnoj laboratoriji Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Nivoi olova su mereni elektrotermalnom metodom dok su nivoi Cu, Zn, Mn i Fe mereni plamenom atomskom apsorpcionom tehnikom. Pri merenju olova kao rastvor za ispiranje korišćen je kiseli rastvor tritona dok je u ostalim slučajevima kao rastvor za ispiranje korišćena dejonizovana voda. Kao standardni referentni materijal poznate koncentracije ispitivanih metala korišćeni su Seronorm - Whole blood Level 2 i SRM 1577c - Bovine liver (LGS Standard, UK). Tokom rada rizik od kontaminacije uzoraka je sveden na najmanji mogući nivo. Radni uslovi aparata pri merenju metala su dati u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Radni uslovi aparata pri merenju metala metodama elektrotermalne i plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije

Parametar	Metal				
	Pb <sup>a</sup>	Cu <sup>b</sup>	Zn <sup>b</sup>	Mn <sup>b</sup>	Fe <sup>b</sup>
Talasna dužina (nm)	283,3	324,8	213,9	279,5	248,3
Širina proreza (nm)	0,5	0,5	1,0	0,2	0,2
Gain (%)	49	61	61	96	75
Jačina lampe (mA)	10,0	4,0	5,0	5,0	5,0
Pozadinska korekcija	da	da	da	da	da
Raspon koncentracija standardnih rastvora (mg/L)	0,001-0,020	0,1-10	0,1-10	0,1-10	0,1-10
Gas	Argon	Acetilen	Acetilen	Acetilen	Acetilen
Modifikator	0,5% NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	/	/	/	/
Sredstvo za ispiranje sistema	Triton -X 100	Dejonizovana voda	Dejonizovana voda	Dejonizovana voda	Dejonizovana voda

<sup>a</sup> elektrotermalna atomska apsorpciona tehnika

<sup>b</sup> plamena atomska apsorpciona tehnika

### 3.7. Određivanje parametara oksidativnog statusa

Priprema uzoraka organa za određivanje parametara oksidativnog statusa je vršena homogenizacijom upotrebom homogenizatora (T10 basic ULTRA-TURRAX, IKA, Nemačka). Izmerenoj masi tkiva dodat je hladan fosfatni pufer (0,1 M, pH=7,4) koji je sadržao 1,15% kalijum-hlorida (KCl), u odnosu 1:9. Homogenizacija je vršena na jačini 2 navedenog homogenizatora tokom 1-2 min. do vizuelno homogene mase. Procedura je vršena pod stalnim održavanjem hladnog lanca. Nakon homogenizacije, homogenati tkiva su centrifugirani na 800×g tokom 10 minuta, a zatim na 9500×g tokom 20 minuta, na temperaturi od 4 °C sa ciljem izdvajanja postmitohondrijalnog supernatant. Pri određivanju parametara oksidativnog statusa korišćen je izdvojeni post mitohondrijalni supernatant.

### 3.7.1. Određivanje proteina

Sadržaj proteina u uzorcima je meren korišćenjem Bradfordove metode (128) koja se zasniva na sposobnosti proteina da se vežu za Coomassie Brilliant Blue G-250. Apsorbancija dobijenog plavo obojenog kompleksa merena je na 595 nm na aparatu SPECTROstar Nano; BMG Labtech, Ortenberg, Nemačka, koji je korišćen za merenje apsorbancije u svim sledećim spektrofotometrijskim metodama za određivanje parametra oksidativnog statusa. U razblažen uzorak postmitohondrijalnog supernatanta tkiva (5  $\mu$ L) dodato je 250  $\mu$ L Bradfordovog reagensa. Nakon mešanja na šejkeru, sadržaj mikroploče je inkubiran 10 min. na sobnoj temperaturi nakon čega je izmerena apsorbancija na 595 nm prema slepoj probi. Za izračunavanje koncentracije proteina korišćena je kalibraciona kriva napravljena od osnovnog standarda goveđeg albumina (2 mg/mL) pravljenjem standardnih rastvora u rasponu od 20-1500  $\mu$ g/mL proteina.

### 3.7.2. Superoksid anjon radikal, $O_2^{\cdot-}$

Nivo superoksid anjona radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ) u ispitivanim uzorcima određen je pomoću metode koju su opisali Auclair i saradnici (129). Brzina stvaranja  $O_2^{\cdot-}$  je merena na osnovu njegove sposobnosti da redukuje nitro grupu aromatičnih amina, npr. nitroblue-tetrazolijuma (NBT, 2,2'-di-*p*-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difenilen)-ditetrazolium hlorid) do plavog formazana. Povećanje apsorbancije ( $\Delta A$ ) se prati na 515 nm, a dobijeni rezultati su izraženi u mmol/min/g proteina. Proračun je vršen na osnovu formule:

$$\text{red. NBT, } \mu\text{mol/min/L} = \Delta A/\text{min} \times 1400$$

### 3.7.3. Totalni oksidativni status, TOS

Totalni oksidativni status (TOS) predstavlja meru prooksidanasa u uzorku, a to su primarno lipidni peroksidi i vodonik-peroksid. Nivo TOS određen je spektrofotometrijskom metodom (130). Metoda se zasniva na sposobnosti prisutnih prooksidanasa u uzorku da oksiduju fero jon-orto-dianizidni kompleks u feri jon, koji zatim gradi obojeni kompleks sa ksilenil-oranžom. Apsorbancija produkta reakcije je merena na 560 nm, dok je kao standardni rastvor korišćen rastvor vodonik-peroksida opsega 10-200  $\mu$ mol/L.

### 3.7.4. Sulfhidrilne grupe, SHG

Nivoi ukupnih SHG su određivani pomoću spektrofotometrijske metode (131). Metoda se zasniva na reakciji alifatičnih tiola u baznoj sredini (pH 9,0) sa 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB) kao reagensom. U reakciji kao proizvod nastaje žuto obojen *p*-nitrofenol čija je apsorbancija merena na 412 nm.

### 3.7.5. Malondialdehid, MDA

Nivoi MDA su mereni u uzorcima spektrofotometrijskom metodom (132). U uzorak je dodat TRIS (tris(hidroksimetil)aminometan) pufer (0,05 mol/L, pH 7,4) i TBA reagens (0,917 mmol/L trihlorsirćetna kiselina i 2,6 mol/L tiobarbiturna kiselina). Nakon toga smeša je inkubirana 5 minuta na 100 °C u vodenom kupatilu, nakon čega je vršeno hlađenje i centrifugiranje pod sledećim uslovima: 4 °C, 10000 $\times$ g, 10 min. Apsorbanca supernatanta je merena na 535 nm. Uporedo sa analizama pripremljeni su i standardni rastvori MDA pomoću kojih je konstruisana kalibraciona kriva opsega 1-10  $\mu$ mol/L.



### 3.7.6. Aktivnost enzima superoksid dismutase, SOD

Za merenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD) korišćena je metoda zasnovana na sposobnosti enzima da inhibira spontanu autooksidaciju epinefrina u alkalnoj sredini (pH 10,2) (133). Jedna jedinica SOD enzima (1 U/g) je definisana kao količina enzima potrebna za 50% inhibiciju autooksidacije epinefrina. Merenjem apsorbancije nastalog crvenog proizvoda autooksidacije dobija se vrednost promene apsorbancije u minuti ( $\Delta A/\text{min}$ ) i izračunava se aktivnost enzima u kontroli (bez SOD) i u analizi (prisutan SOD). Početna koncentracija epinefrina korišćena u metodi je 10 mmol/L koja je dalje razblažena do postizanja vrednosti  $\Delta A/\text{min}$  od 0,025, pri kojoj je utvrđeno da SOD postiže najviši nivo inhibicije epinefrina.

### 3.7.7. Uznappedovali produkti oksidacije proteina, AOPP

Uznappedovali produkti oksidacije proteina (AOPP) određeni su spektrofotometrijskom metodom (134). Nakon dodatka sirćetne kiseline i kalijum-jodida (1,16 M) apsorbancija je merena na 340 nm. Kalibracija je izvedena sa hloraminom-T u opsegu 10-90  $\mu\text{mol/L}$ , a rezultati su izraženi preko ekvivalenta hloramina-T.

### 3.8. Određivanje aktivnosti enzima acetilholinesteraze u mozgu pacova

Uzorci mozga za određivanje acetilholinesteraze su homogenizovani u fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl) pomoću homogenizatora T10 basic ULTRA-TURRAX (IKA, Nemačka) u odnosu 1:3 (m/V). Određivanje aktivnosti enzima je vršenom spektrofotometrijskom metodom (135). Metoda se zasniva na principu korišćenja acetiltioholina, alternativnog supstrata za acetilholinesterazu. Pod dejstvom enzima dolazi do hidrolize acetiltioholina do tioholina i sirćetne kiseline. Tioholin i DTNB reakcijom daju proizvod 5-tio-2-nitrobenzoat koji je žute boje. Zbog pomeranja elektrona u atomu sumpora 5-tio-2-nitrobenzoata i promene boje rastvora, dolazi do smanjenja količine upadnog zračenja koje stigne do detektora usled promene u apsorbanciji rastvora. U homogenat mozga (20  $\mu\text{L}$ ) dodato je 2,5 mL rastvora DTNB-a (7,44 mg/mL u fosfatnom puferu, pH 7,4, a zatim razblažen u odnosu 1:50 sa fosfatnim puferom). Smeša se inkubirala 5 min. na temperaturi od 25 °C, a zatim je dodato 20  $\mu\text{L}$  acetiltioholin jodid rastvora u destilovanoj vodi (135 mM). Apsorbanca je merena tokom 3 minuta na 410 nm CARY60 UV-VIS spektrofotometra sa kontrolom temperature Cary single cell Peltier-a (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Aktivnost enzima acetilholinesteraze je računata prema formuli:

$$\Delta A/\text{min} \times (\xi \times l)^{-1} \times V_{\text{uk}} \times V_{\text{uz}}^{-1} \times \text{razblaženje} = \text{aktivnost } \mu\text{mol hidrolizovanog acetiltioholin-jodida/min po g tkiva}$$

Gde je:

- $\xi$  molarni apsorpcioni koeficijent (1,36 mL/ $\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$ ),
- L dužina optičkog puta (1 cm),
- $V_{\text{uk}}$  ukupna zapremina reakcione smeše i
- $V_{\text{uz}}$  zapremina uzorka.

### 3.9. Određivanje hormona u serumu

U uzorcima seruma je vršeno određivanje testosterona i tiroidnih hormona, trijodotironina ( $T_3$ ) i tiroksina ( $T_4$ ) kao i njihovih slobodnih formi,  $fT_3$  i  $fT_4$ . Hormoni su određivani u akreditovanoj laboratoriji hemiluminiscentnom imuno metodom na aparatu Cobas e411 (Roche Diagnostic, Nemačka).

### 3.10. Patohistološka analiza organa

Delovi mozga, slezine, jetre, bubrega i testisa su izolovani i fiksirani u rastvor 10% formalina (4% formaldehid). Nakon fiksacije, svako tkivo je dehidrirano u rastvorima alkohola rastuće koncentracije, očišćeno u toluenu i inkorporirano u parafin. Blokovi tkiva su isečeni na tanke delove (5 mm) i obojeni hematoksilinom i eozinom (H&E). Mikroskopske pločice su posmatrane pod svetlosnim mikroskopom modela Olympus BKS 43 (Tokio, Japan).

### 3.10. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka vršena je upotrebom SPSS 18.0 (IBM, Armonk, Njujork, SAD) i Graph Pad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, SAD) softvera. Podaci su testirani na normalnost raspodele upotrebom *Shapiro Wilk* testa, dok je homogenost varijanse proverena upotrebom *Levene's* testa. Ako su podaci ispunili navedene testove za proveru normalnosti raspodele i homogenosti varijanse, dalje je u radu za poređenje srednjih vrednosti između grupa korišćena jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) praćena odgovarajućim *post-hoc* testom (*Fishers LSD* ili *Bonfferoni* testom). Ovi podaci su predstavljeni kao srednja vrednost (SV) i standardna devijacija (SD). U suprotnom, ukoliko podaci nisu pratili normalnu raspodelu i/ili homogenost varijanse nije bila ista u grupama, korišćen je *Kruskal-Walli's* test praćen *Mann-Whitney U* testom i podaci su predstavljeni kao medijana i opseg (minimum-maksimum). Grafički prikazi rezultata su izrađeni pomoću Graph Pad Prism 8.0 softvera.

### 3.11. Modelovanje odnosa doza-odgovor

Modelovanje odnosa doza-odgovor je vršeno upotrebom PROASTweb 70.1 softvera (<https://proastweb.rivm.nl/>) razvijenim od strane Holandskog nacionalnog instituta za javno zdravlje i životnu sredinu (engl. *National Institute for Public Health and the Environment, RIVM*). Kao smernice pri radu u softveru korišćena su uputstva data od strane RIVM (136) i najnovije smernice date od strane EFSA (118). Kao doze posmatrane su primenjene doze olova u eksperimentu (eksterna doza) dok su nivoi olova u krvi (engl. *Blood lead levels, BLL*) posmatrani kao interne doze. Dodatno, u slučajevima gde postoje podaci o koncentraciji olova u organu, dodatno je vršeno modelovanje odnosa doza-odgovor gde je kao doza korišćena koncentracija olova u organu (interna doza). Kao efekat, posmatrane su vrednosti izmerenih biohemijskih i hematoloških parametara, hormona u serumu, parametara oksidativnog statusa, esencijalnih elemenata i aktivnosti enzima acetilholinesteraze. Pri modelovanju, korišćeni su kontinuirani individualni podaci za testirane parametre. Kao BMR, tj. veličina efekta za izračunatu dozu, uzeta je vrednost 5% prema preporukama softvera i EFSA za kontinuirane podatke pri nivou pouzdanosti od 90%. Pri modelovanju program fituje podatke u neki od definisanih modela uz 200 iteracija. Kao rezultat dobijen je detaljan izveštaj sa grafičkim prikazima. Dalje, u slučaju dobijanja odnosa doza-odgovor za ispitivane parametre izdvojeni su *Benchmark* intervali (BMDI) tj. statistički donji nivo pouzdanosti BMD, BMDL i statistički gornji nivo pouzdanosti BMD, BMDU. Broj iteracija je empirijski određen tako da se dobije BMDI koji bi se nalazio unutar 5 ili 10% vrednosti BMDI dobijenim sa velikim brojem iteracija.

## 4. REZULTATI

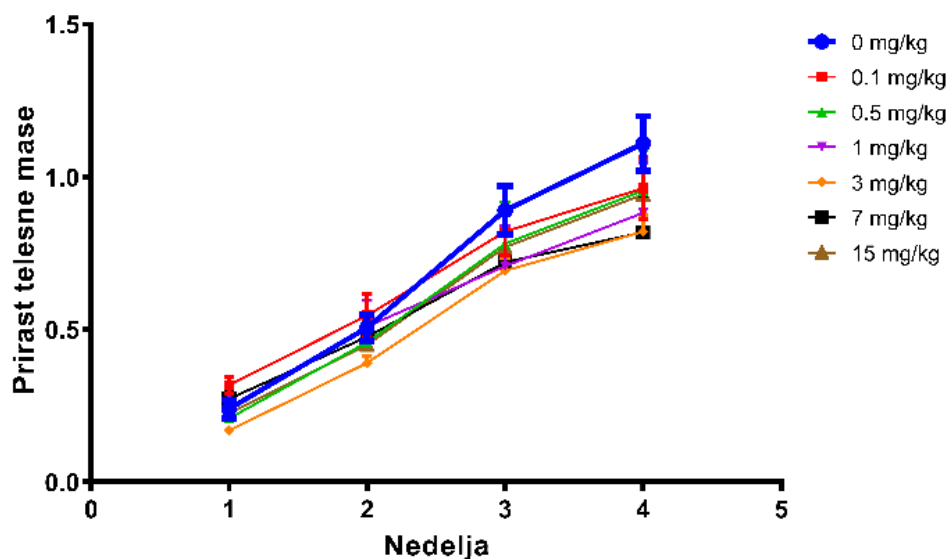
### 4.1. Prirast telesne mase i relativna masa organa

U Tabeli 7 predstavljene su terminalne telesne mase pacova kao i relativne mase izolovanih organa, dok je na Slici 3 prikazan prirast telesne mase. Tretman olovom nije doveo do statistički značajne promene u prirastu telesne mase i relativnoj masi organa iako se može zapaziti trend smanjenja telesne mase i prirasta telesne mase sa povećanjem doze.

**Tabela 7.** Terminalna telesna masa (g) i organski koeficijent (g/100g) pacova subakutno tretiranih različitim dozama olova

	Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
	0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
<b>Telesna masa</b>	404±23	436±37	419±15	387±42	380±42	371±27	367±23
<b>Jetra</b>	4,13±0,5	4,29±0,32	4,26±0,29	4,17±0,24	4,04±0,11	4,01±0,28	4,5±0,24
<b>Slezina</b>	0,21±0,03	0,21±0,04	0,20±0,03	0,20±0,05	0,21±0,03	0,17±0,02	0,20±0,02
<b>Bubrezi</b>	0,72±0,06	0,69±0,08	0,66±0,05	0,66±0,04	0,64±0,04	0,69±0,06	0,72±0,03
<b>Srce</b>	0,32±0,03	0,32±0,02	0,30±0,03	0,32±0,02	0,33±0,02	0,34±0,05	0,33±0,03
<b>Testisi</b>	0,84±0,08	0,78±0,04	0,79±0,07	0,79±0,12	0,83±0,08	0,78±0,11	0,83±0,06
<b>Mozak</b>	0,48±0,02	0,45±0,01	0,46±0,02	0,47±0,05	0,50±0,03	0,48±0,09	0,49±0,04

Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± standardna devijacija; ANOVA i *Fisher's LSD* post-hoc test



**Slika 3.** Uticaj različitih doza olova na prirast telesne mase kod pacova tokom 28-dnevne studije oralne toksičnosti.

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija

## 4.2. Nivo olova u krvi i organima

Prikaz nivoa olova u krvi i organima pacova dat je u Tabeli 8. Nivoi olova u krvi kod pacova tretiranih dozama nižim od 3 mg Pb/kg t.m./dan. bili su niži od 5 µg/dL, dok je doza od 7 mg Pb/kg t.m./dan. rezultovala nivoima olova u krvi nižim od 10 µg/dL. Statistički značajno više vrednosti olova u krvi u odnosu na kontrolu, zapažane su kod pacova tretiranih dozom većom od 0,5 mg Pb/kg t.m./dan. Najviša koncentracija olova u krvi dobijena je kod pacova tretiranih najvišom dozom i iznosila je  $16,1 \pm 3,8$  µg/dL.

Sa rastom primenjenih doza primećen je porast akumulacije olova u organima. Značajno viši nivo olova u bubrezima u odnosu na kontrolu zapažen je kod pacova tretiranih dozama višim od 0,1 mg/kg t.m./dan. U mozgu, statistički značajno više koncentracije olova su izmerene kod grupa tretiranih dozama višim od 0,5 mg Pb/kg t.m./dan, a u femuru kod grupa tretiranim dozama višim od 1 mg Pb/kg t.m./dan. Statistički značajno više koncentracije olova u jetri, slezini, srcu i testisima zapažene su kod grupa tretiranim dozama 7 mg Pb/kg t.m./dan i 15 mg Pb/kg t.m./dan.

U grupi Pb0.1 iako su izmerene koncentracije olova u organima bile više od kontrolne vrednosti, nije dobijena statistički značajna razlika u nivoima olova u odnosu na kontrolnu vrednost. U grupi Pb0.5 statistički viša koncentracija olova u odnosu na kontrolu izmerena je samo u bubrezima. U grupi Pb1, poređenjem sa koncentracijama nivoa olova u kontroli, statistički značajno više vrednosti olova su izmerene u krvi, bubrezima i mozgu. U slučaju grupe Pb3 statistički značajno više koncentracije olova su zapažene u krvi, bubrezima, mozgu i femuru. U grupama Pb7 i Pb15 statistički značajno povećanje koncentracije olova zapaženo je u svim ispitivanim organima. Najviše vrednosti nivoa olova u apsolutnom smislu zabeležene su u pacova najviše dozne grupe i to u organima: jetri (597,70 ng/g), bubrezima (2726,00 ng/g) i femuru (43317,00 ng/g).

**Tabela 8.** Nivoi olova u krvi i organima pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
<b>Krv</b>	SV	0,52	1,39	2,77	<b>2,86*</b>	<b>4,16*</b>	<b>8,14***†††††§§§#</b>	<b>16,11***†††††§§§###^</b>
<b>µg/dL</b>	SD	1,27	2,25	1,82	2,861	3,15	1,53	3,88
<b>Jetra</b>	SV	38,03	16,81	42,06	86,15	134,00	<b>198,60**†††</b>	<b>597,70***†††††§§§###^</b>
<b>ng/g</b>	SD	20,76	6,84	19,35	13,34	47,02	59,80	246,10
<b>Slezina</b>	SV	59,32	63,81	79,62	105,8	101,20	<b>116,00*†</b>	<b>221,20***†††††§§§###^</b>
<b>ng/g</b>	SD	26,13	33,82	22,44	52,38	46,97	30,25	67,04
<b>Bubrezi</b>	SV	41,91	118,60	<b>452,50*</b>	<b>301,20*</b>	<b>1002,00***†††††§§§</b>	<b>1040,00***†††††§§§</b>	<b>2726,00***†††††§§§###^</b>
<b>ng/g</b>	SD	17,43	63,37	123,40	28,08	234,00	132,4	694,80
<b>Srce</b>	SV	32,36	44,57	33,94	43,67	51,22‡	<b>49,94**††</b>	<b>59,99***</b>
<b>ng/g</b>	SD	6,176	10,23	16,27	6,216	17,46	9,83	16,45
<b>Testisi</b>	SV	9,38	22,48	19,30	22,64	30,66	<b>42,15**†§</b>	<b>52,74***†††§§</b>
<b>ng/g</b>	SD	5,06	6,79	17,97	8,924	12,86	21,13	13,29
<b>Mozak</b>	SV	6,28	5,71	36,74	<b>77,59*†</b>	<b>127,90**††</b>	<b>98,56*††</b>	<b>219,10**†††§§###^</b>
<b>ng/g</b>	SD	10,30	9,797	11,75	67,39	32,37	44,15	93,08
<b>Femur</b>	SV	47,38	348,9	2129,00	1032,00	<b>6428,00*†§</b>	<b>7112,00**†††§§</b>	<b>43317,00***†††††§§§###^</b>
<b>ng/g</b>	SD	23,28	309,60	575,50	320,80	3649,00	3411,00	7946,00

Srednja vrednost (SV), standardna devijacija (SD); \* † ‡ § # ^ p < 0,05; \*\* †† ‡‡ §§ ## ^^ p < 0,01, \*\*\* ††† ‡‡‡ §§§ ### ^^ p < 0,001 u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test

### 4.3. Efekti na krv

#### 4.3.1. Hematološki parametri

Najviša doza olova je dovela do smanjenja broja eritrocita i smanjenja nivoa hemoglobina za više od 10% u odnosu na vrednosti dobijene u kontrolnoj grupi (Tabela 9). U svim grupama tretiranim olovom došlo je do smanjenja nivoa hematokrita, koje je bilo najizraženije u Pb15 grupi. U grupama tretiranim sa 1 i 3 mg Pb/kg t.m./dan došlo je do smanjenja prosečnog volumena eritrocita u odnosu na kontrolnu grupu.

**Tabela 9.** Uticaj rastućih doza olova na hematološke parametre u krvi pacova nakon oralne subakutne ekspozicije

Parametar	Jedinica	Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
WBC	10 <sup>9</sup> /L	5,81 ± 1,09	5,34 ± 1,54	4,91 ± 2,00	4,37±1,22	4,22 ± 1,15	4,69 ± 1,91	4,99 ± 1,09
Neutrofili	%	4,20±1,84	7,98±4,59	5,02±1,54	4,15±1,89	3,97±1,30	4,90±2,13	4,25±1,18
Limfociti	%	57,40±9,00	44,78±10,50	56,20±6,65	58,05±5,90	53,70±3,99	53,10±11,66	56,95±8,41
Monociti	%	20,02±5,26	27,60±6,56	23,38±3,27	20,90±4,12	24,42±2,20	26,15±7,61	19,75±3,36
Eozinofili	%	0,78±0,80	0,63±0,38	0,66±0,34	0,27±0,08	0,95±0,36	0,30±0,08	0,33±0,12
Bazofili	%	0,92±0,21	0,83±0,34	0,94±0,32	0,62±0,38	1,40±0,56	0,68±0,34	0,88±0,16
RBC	10 <sup>12</sup> /L	7,29 ± 0,46	7,01 ± 0,16	7,17 ± 0,41	7,38 ± 0,35	7,18 ± 0,40	7,08±0,49	<b>6,70 ± 0,48*</b>
HGB	g/L	133,17±7,25	124,20±6,38	127,83±6,37	134,33±6,31†	127,67±8,41	130,83±9,45	<b>118,33±4,23*†‡§#Λ</b>
HCT	L/L	0,54±0,02	<b>0,49±0,04*</b>	0,51±0,02†	0,52±0,02†	<b>0,50±0,02*</b>	0,51±0,03†	<b>0,48±0,02*§</b>
MCV	fL	73,50±1,86	71,77±1,31	71,67±1,01	<b>70,23±1,07*</b>	<b>70,13±1,42*</b>	72,08±1,02	72,05±2,79
MCH	pg	18,23±0,31	18,12±0,20	17,88±0,38	18,20±0,60	17,77±0,55	18,50±0,29	17,72±0,82
MCHC	g/L	248,17±3,19	252,17±4,96	249,17±3,97	259,33±4,68	253,50±5,96	256,67±4,23	247,17±4,26
PLT	10 <sup>9</sup> /L	866,67	887,83	941,83	885,33	995,67	860,67	921,50
		± 50,23	± 113,97	± 97,04	± 72,18	± 23,30	± 116,71	± 106,95

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Broj leukocita (WBC), broj eritrocita (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT), prosečan volumen eritrocita (MCV), prosečna količina hemoglobina u eritrocitu (MCH), prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC), trombociti (PLT). \* † ‡ § # Λ  $p < 0,05$  u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test

#### 4.3.2. Biohemijski parametri

U grupi pacova tretiranih sa najnižom dozom, 0,1 mg Pb/kg t.m./dan, zapaženo je blago povećanje totalnih proteina i nivoa Na u serumu (Tabela 10). Sledeća viša doza (0,5 mg Pb/kg t.m./dan) dovela je do povećanja nivoa mokraćne kiseline i smanjenja neorganskog fosfora u serumu. U svim grupama je zapažen disbalans lipidnog profila. Najviši nivoi triglicerida (1,20 ± 0,36 mmol/L) su izmereni u serumu pacova tretiranih sa 1 mg Pb/kg t.m./dan. Dodatno, kod pacova koji su primali navedenu dozu izmereni su i viši nivoi albumina, Na, P i ukupnih proteina. Kod pacova koji su tretirani dozom od 3 mg Pb/kg t.m./dan zapažene su nešto niže vrednosti lipidnih parametara, kreatinina i P. Ekspozicija pacova sa 7 mg Pb/kg t.m./dan dovela je do povišenih vrednosti mokraćne kiseline, albumina, uree, Na i K u odnosu na netretiranu grupu. Najviša doza od 15 mg Pb/kg t.m./dan, dovela je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti alanin aminotransferaze. U istoj grupi su zapaženi nešto niži nivoi holesterola, LDL-holesterola i kreatinina. Posmatrajući rezultate može se izvesti generalno opažanje da je tretman olovom doveo do disbalansa lipidnog profila (holesterola, triglicerida i LDL-a). Zabeležene su povišene vrednosti mokraćne kiseline i ureje u pojedinim grupama. Došlo je do promena u vrednosti kreatinina i povišenih vrednosti albumina pretežno u višim doznim grupama. U pojedinim grupama tretman olovom je rezultovao u višim vrednostima Na, K i

neorganskog P. Tretman olovom je doveo do nešto viših vrednosti ukupnih proteina u pojedinim doznim nivoima. U tretiranim grupama nije došlo do indukcije vrednosti jetrinih enzima.

**Tabela 10.** Uticaj rastućih doza olova na biohemijske parametre u serumu pacova nakon oralne subakutne ekspozicije

Parametar	Jedinica	Doza (mg Pb/kg t.m. /dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
ALT	IU/L	77,17±7,63	79,00±6,63	76,00±7,69	69,17±7,03	74,17±4,83	75,00±10,79	<b>67,50±8,07*</b>
AST	IU/L	152,17±10,57	162,60±7,30	146,00±18,65	157,33±20,32	151,67±19,19	156,00±12,46	140,50±4,76†
ALP	IU/L	717±131	711±144	639±114	687±93	626±38	759±42	561±113
AMY	IU/L	3515±244	3958±587	3408±339†	3578±172	3689±486	3603±358	3348±396†
LDH	IU/L	935±388	1274±438	587±134†	1241±475‡	711±225	758±286	599±74†§
Glukoza	mmol/L	11±1,45	10,38±1,57	11,25±1,31	10,10±1,60	11,53±1,39	11,10±1,45	11,52±1,15
Holesterol	mmol/L	1,75±0,31	1,86±0,35	1,72±0,8	1,82±0,36	<b>1,43±0,12*†§</b>	1,75±0,14#	<b>1,42±0,16*†§Λ</b>
Trigliceridi	mmol/L	0,90±0,30	1,04±0,29	0,76±0,27	<b>1,20±0,36*‡</b>	<b>0,67±0,11†§</b>	0,85±0,14§	0,82±0,18§
HDL	mmol/L	0,92±0,09	1,00±0,18	0,93±0,16	0,96±0,21	0,81±0,06	0,94±0,08	0,78±0,09
LDL	mmol/L	0,42±0,21	0,38±0,15	0,38±0,12	0,40±0,20	0,30±0,13	0,43±0,10	<b>0,22±0,13*</b>
UA	μmol/L	258,17±37,28	297,00±57,83	<b>331,50±53,34*</b>	305,50±34,13	255,33±19,92‡§	<b>335,50±39,00*#</b>	234,33±42,78†‡§Λ
Urea	mmol/L	9,28±0,73	9,58±1,15	9,02±0,35	9,32±0,87	8,43±0,56†	<b>10,06±0,79*‡§ #</b>	8,53±0,85†Λ
CRE	μmol/L	51,65±1,31	52,88±3,09	50,05±2,94	51,83±2,18	<b>48,17±1,80*†§</b>	<b>53,58±2,49‡#</b>	<b>47,82±2,10*†§Λ</b>
ALB	g/L	39,33±1,63	41,4±3,05	40,33±1,97	<b>43,33±1,35*‡</b>	41,00±2,10§	<b>41,83±1,94*</b>	40,33±1,03§
TB	μmol/L	2,27±0,44	1,98±0,45	2,58±0,31	1,7±0,7	1,72±0,48	2,3±0,88	2,03±0,48
DB	μmol/L	0,38±0,12	0,36±0,17	0,40±0,13	0,35±0,05	0,38±0,08	0,45±0,08	0,30±0,09
CRP	mg/L	0,17±0,05	0,18±0,04	0,08±0,08*†	0,18±0,04‡	0,33±0,33‡	0,18±0,04‡	0,20±0,06‡
Na	mmol/L	158,42±1,72	<b>165,72±3,83*</b>	158,78±1,03†	<b>166,00±3,71*‡</b>	159,02±2,01†§	<b>165,62±3,86*†‡#</b>	158,35±4,98†§#
TP	g/L	71,03±2,35	<b>75,60±5,04*</b>	72,38±3,87	<b>77,50±5,11*‡</b>	72,65±2,87§	74,40±3,61	70,15±1,90†§
Mg	mmol/L	1,82±0,12	1,80±0,29	1,78±0,17	1,78±0,16	1,72±0,10	1,82±0,18	1,75±0,05
K	mmol/L	8,83±0,32	9,33±0,43	9,10±0,65	<b>9,60±0,68*</b>	9,15±0,38	<b>9,66±0,30*</b>	8,70±0,43†§Λ
P	mmol/L	5,07±0,40	5,15±0,31	<b>4,63±0,38*†</b>	<b>5,42±0,43*†</b>	<b>4,63±0,30*§</b>	5,51±0,33‡#	5,21±0,21‡#
Ca	mmol/L	3,49±0,13	3,47±0,41	3,44±0,09	3,38±0,29	3,52±0,12	3,46±0,31	3,49±0,11

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST), alkalna fosfataza (ALP), amilaza (AMY), laktat dehidrogenaza (LDH), azot iz uree (BUN), kreatinin (CRE), mokraćna kiselina (UA), albumin (ALB), direktni bilirubin (DB), totalni bilirubin (TB), c-reaktivni protein (CRP), ukupni serumski proteini (TP), natrijum (Na), hloridi (Cl), magnezijum (Mg), kalijum (K), neorganski fosfor (P), gvožđe (Fe), kalcijum (Ca). \* † ‡ § # Λ  $p < 0,05$  u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test



### 4.3.3. Parametri oksidativnog statusa u serumu

U svim grupama tretiranim olovom došlo je do inhibicije aktivnosti enzima SOD (Tabela 11). U grupama koje su tretirane dozama višim od 0,5 mg Pb/kg t.m./dan došlo je do smanjenja nivoa  $O_2^{\cdot-}$  u odnosu na kontrolu. Ostale vrednosti parametara oksidativnog statusa se nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na kontrolnu vrednost.

**Tabela 11.** Uticaj rastućih doza olova na parametre oksidativnog statusa u serumu pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

Parametar		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
AOPP <sup>b</sup>	medijana	33,10	26,10	32,65	30,00	31,30	34,55	34,30
( $\mu\text{mol/L}$ )	opseg	27,10-35,40	17,20-39,70	25,80-35,50	26,00-37,40	27,70-42,00	30,40-37,70	28,80-51,50
$O_2^{\cdot-}$ <sup>a</sup>	SV	49,40	49,33	<b>41,67*</b>	<b>40,00*</b>	<b>31,60***†</b>	<b>40,50*</b>	<b>37,00**†</b>
( $\mu\text{mol/min/L}$ )	SD	8,17	12,68	9,09	9,32	8,79	7,61	6,29
SOD <sup>b</sup>	medijana	144,0	<b>126,5**</b>	<b>135,0*</b>	<b>133,5**</b>	<b>130,5**</b>	<b>134,5**</b>	<b>130,0**</b>
(U/L)	opseg	141,0-147,0	112,0-140,0	124,0-146,0	122,0-144,0	109,0-139,0	110,0-138,0	109,0-141,0
TOS <sup>b</sup>	medijana	9,15	7,15	8,45	10,20	12,20	11,25	12,10
( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)	opseg	3,60-14,00	3,20-14,60	3,50-12,60	6,50-36,20	3,00-16,10	4,70-21,60	4,60-21,50
MDA <sup>b</sup>	medijana	3,63	4,04	3,81	4,22	3,29	3,93	3,85
( $\mu\text{mol/L}$ )	opseg	1,33-3,85	3,03-4,29	3,33-4,88	3,25-4,59	2,51-5,33	3,48-5,25	3,18-5,25
SHG <sup>b</sup>	medijana	0,24	0,36	0,19	0,32	0,22	0,21	0,20
(mmol/L)	opseg	0,16-0,42	0,22-0,50	0,098-0,27	0,25-0,60	0,15-0,36	0,18-0,29	0,17-0,44

Uznappedovali produkti oksidacije proteina (AOPP), superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoksid dismutaza (SOD), totalni oksidativni status (TOS), malondialdehid (MDA), sulfhidrilne grupe (SHG), srednja vrednost (SV), standardna devijacija (SD); \* †  $p < 0,05$ ; \*\* ††  $p < 0,01$ ; \*\*\* †††  $p < 0,001$  u odnosu na 0, 0.1, grupu, redom; <sup>a</sup>ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test odnosno <sup>b</sup>Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U post-hoc test

### 4.3.4. Nivoi bioelemenata

U svim grupama je zapažen niži nivo Cu u odnosu na kontrolnu (Tabela 12). Povišeni nivoi Zn su izmereni u grupama tretiranim dozama 3, 7 i 15 mg Pb/kg t.m./dan. Sa porastom doze zapažen je trend rasta nivoa Zn u krvi. U slučaju odnosa Cu/Zn zapažen je trend pada sa porastom doze. Smanjenje nivoa Fe je zapaženo u svim tretiranim grupama, pri čemu statistički značajno u grupama tretiranim sa 7 i 15 mg Pb/kg t.m./dan u odnosu na kontrolu. Nivoi Mn su bili ispod limita kvantifikacije te nisu mogli biti identifikovani.

**Tabela 12.** Uticaj rastućih doza olova na nivo bioelemenata u krvi pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

Parametar	Jedinica	Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
Cu	$\mu\text{mol/L}$	25,56±3,47	<b>18,39±3,18</b> *	20,13±3,44	<b>16,94±4,94</b> **	20,69±4,27	<b>14,16±5,15</b> ***†#	<b>14,80±6,04</b> ***#
Zn	$\mu\text{mol/L}$	76,58±8,31	75,02±14,36	78,42±20,70	69,05±16,17	<b>111,40±13,59</b> ***†††§§§	<b>116,50±8,12</b> ***†††§§§	<b>100,22±5,55</b> *†§§
Cu/Zn	/	0,34±0,07	<b>0,25±0,09</b> *	0,28±0,05	<b>0,24±0,05</b> **	<b>0,17±0,07</b> ***†††	<b>0,12±0,04</b> ***†††§§§	<b>0,15±0,06</b> ***†††§§§
Fe	mmol/L	6,64±0,30	5,50±0,53	7,03±1,47 †	6,24±1,22	5,99±0,49	<b>5,45±1,20</b> *†	<b>5,43±0,53</b> *†

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \* † ‡ § #  $p < 0,05$ ; \*\* †† †† ‡‡ ‡‡ § § § ##  $p < 0,01$ ; \*\*\* ††† ††† ††† § § § ###  $p < 0,001$  u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test

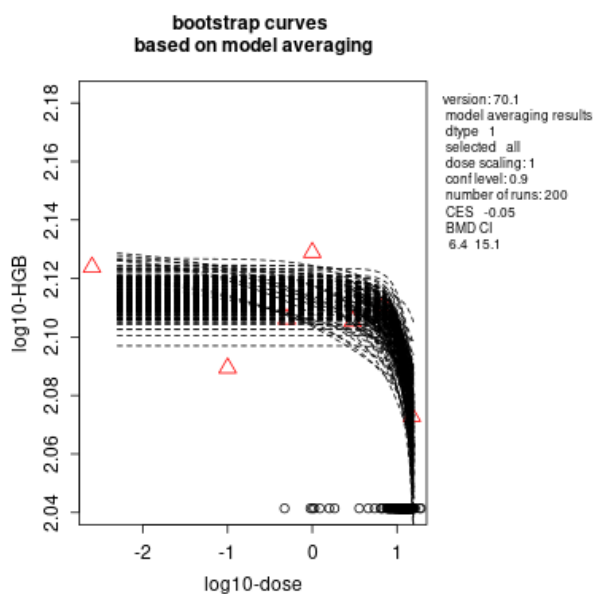
#### 4.3.5. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u krvi

Sveobuhvatan prikaz modela i rezultata dobijenih modelovanjem odnosa doza-odgovor za efekte olova u krvi dat je u Prilogu 1 (Tabela 1 i Tabela 2). Pri modelovanju eksterne doze sa odgovorom, dozna zavisnost je dobijena za sledeće parametre: hemoglobin, holesterol, HDL holesterol, kreatinin, mokraćna kiselina,  $O_2^-$  i SOD u serumu, kao i za Fe, Zn, Cu u krvi (Tabela 13), dok je u slučaju modelovanja interne doze (BLL) sa odgovorom, dozna zavisnost dobijena za hemoglobin, holesterol, HDL holesterol, kreatinin, ureu, AOPP u serumu i Fe u krvi (Tabela 14). Grafikonima na kojima su prikazani odnosi doza-odgovor za efekte olova na krv dobijeni metodom usrednjavanja modela su prikazani na Slici 4 (eksterna doza-odgovor) i Slici 5 (interna doza-odgovor).

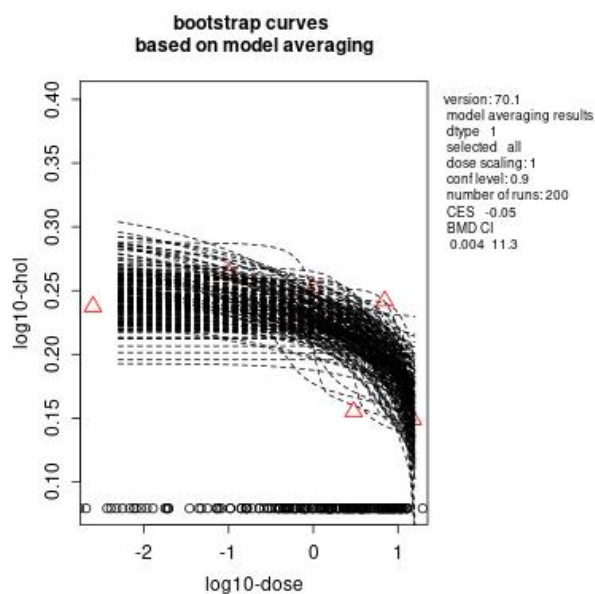
U slučaju modelovanja eksternih doza olova sa odgovorom pozitivan trend odnosa doza-odgovor je dobijen samo za Zn, dok su svi ostali parametri pratili negativan trend. Najniža BMDL je izračunata za smanjenje nivoa Cu, 1,4 ng Pb/kg t.m./dan što predstavlja kritičan toksičan efekat posmatrajući efekte olova na krv. Inhibicija aktivnosti SOD enzima je sledeći kritičan efekat sa dobijenom BMDL vrednošću 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg t.m./dan}$ .

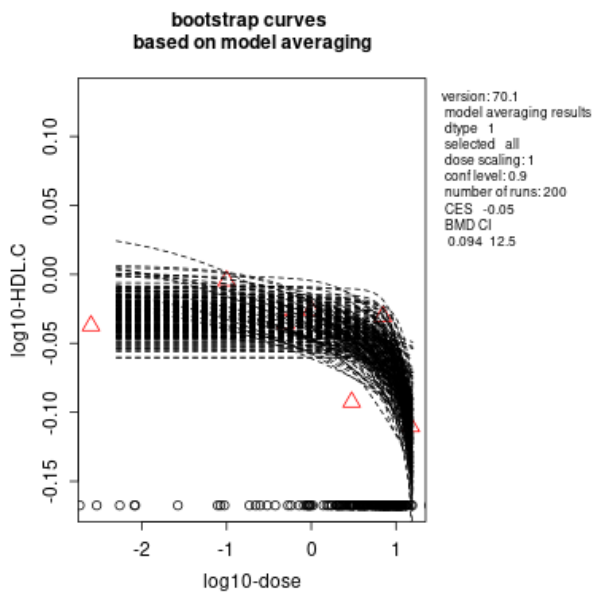
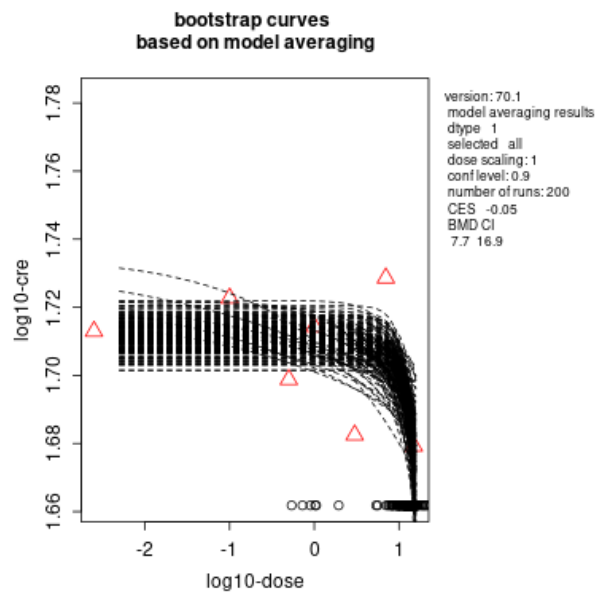
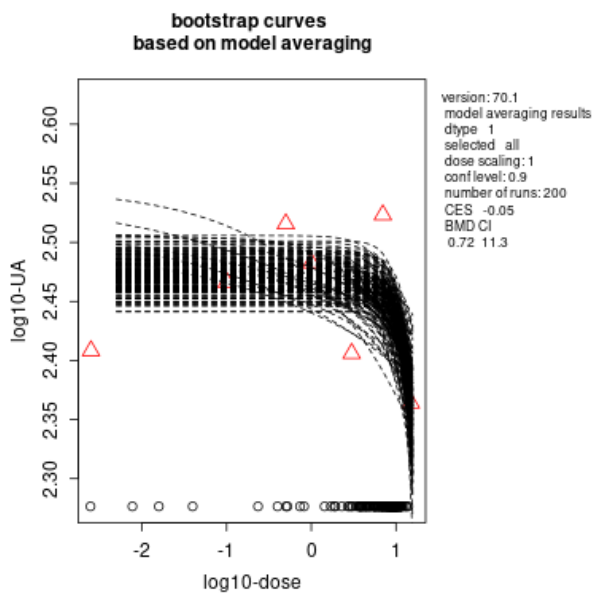
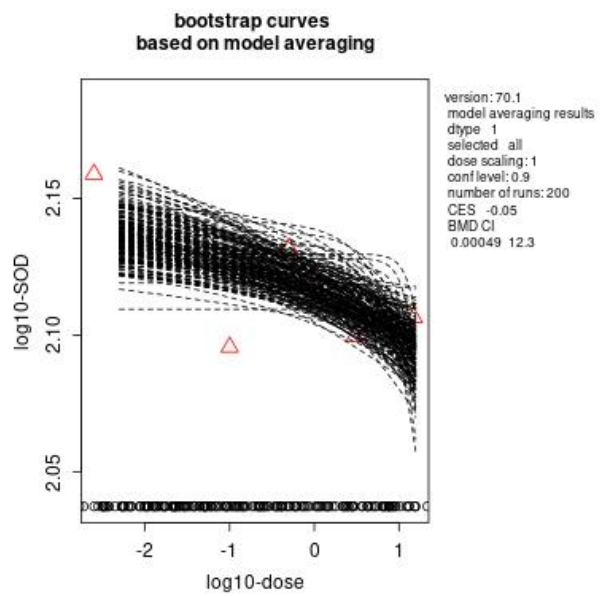
Kada je u pitanju modelovanje interne doze (BLL) sa odgovorom, dobijen je pozitivan trend na krivoj doza-odgovor za AOPP, dok je za ostale parametre ovaj trend bio negativan. Od navedenih promena kao toksični efekti se mogu smatrati dozno-zavisno smanjenje nivoa hemoglobina, HDL holesterola i Fe. Najniža BMDL je izračunata za povećanje nivoa AOPP (BMDL 3,7 ng/dL). Iako je procenjeni BMDI za AOPP širok, BMDU za ovu promenu je 9,15  $\mu\text{g Pb/dL}$  što predstavlja relativno nizak BLL. Sličan, širok opseg BMDI je primećen za nivoe Fe, gde je dobijena druga najniža vrednost BMDL koja iznosi 0,006  $\mu\text{g Pb/dL}$ .

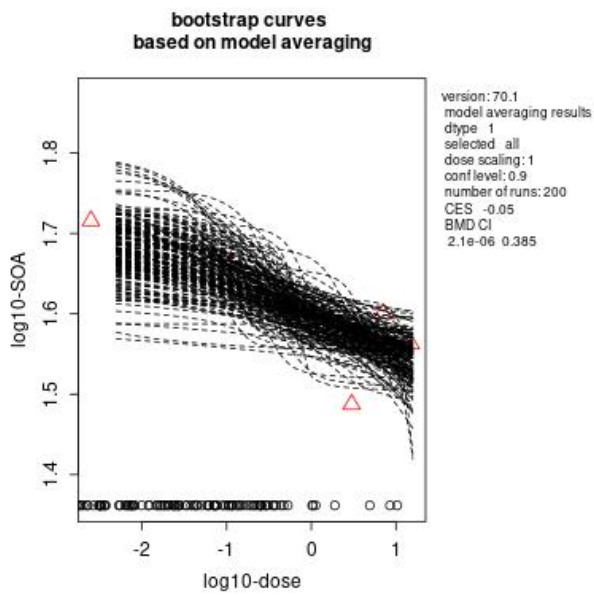
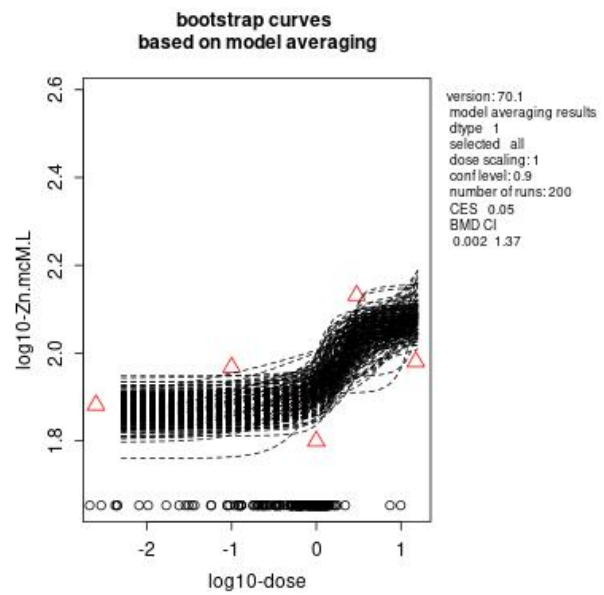
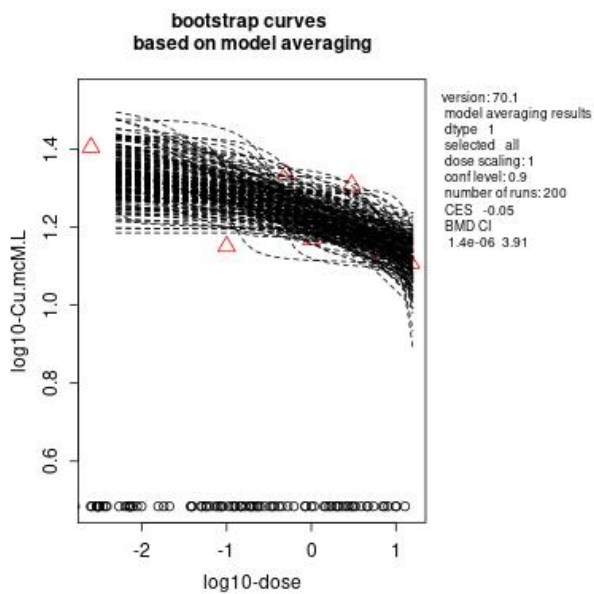
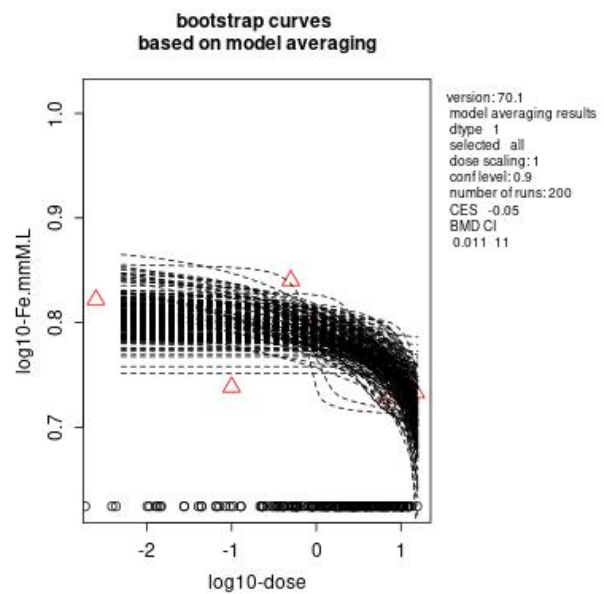
A



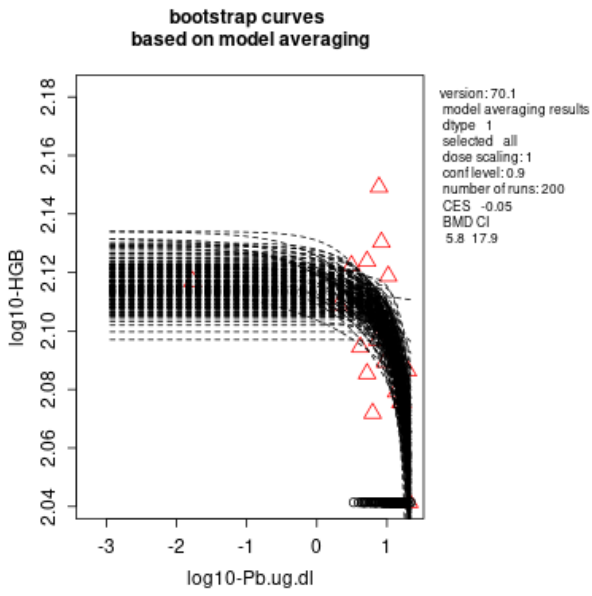
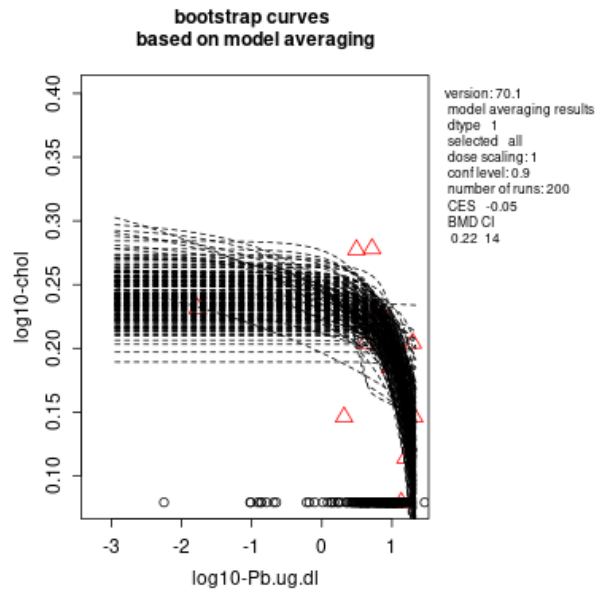
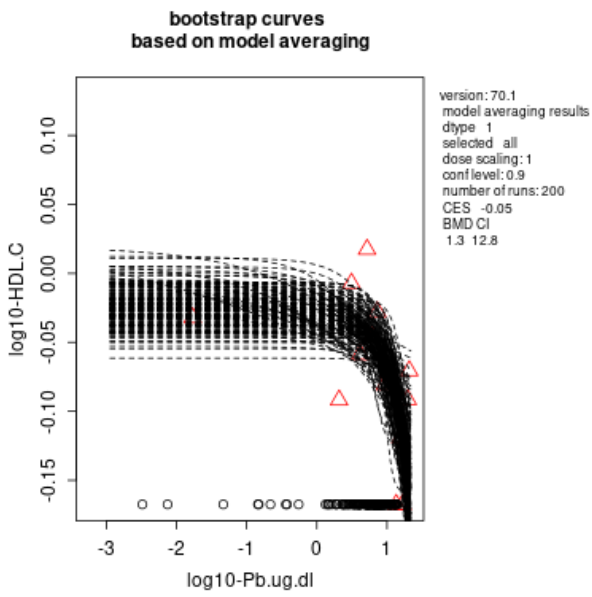
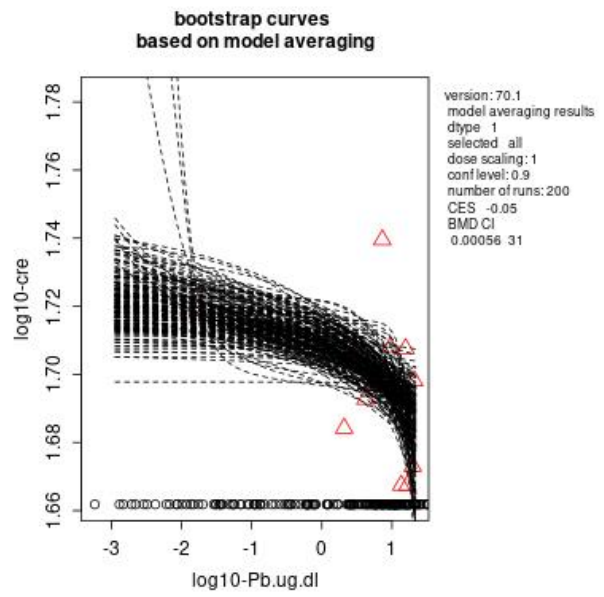
B



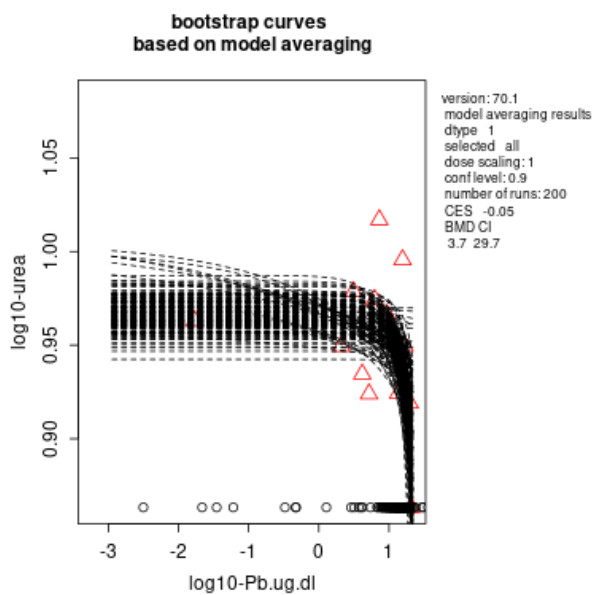
**C****D****E****F**

**G****H****I****J**

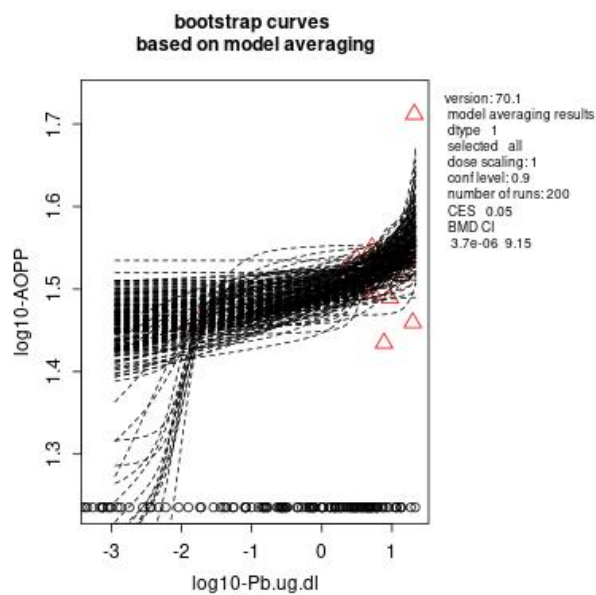
**Slika 4.** Grafički prikazi modelovanja odnosa eksternih doza olova i nivoa hemoglobina (A) u krvi, holesterola (B), HDL holesterola (C), kreatinina (D), mokraćne kiseline (E), superoksid dismutaze (F), superoksid anjon radikala (G) u serumu, Zn (H), Cu (I) i Fe (J) u punoj krvi, kod pacova tretiranih oralno sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

**A****B****C****D**

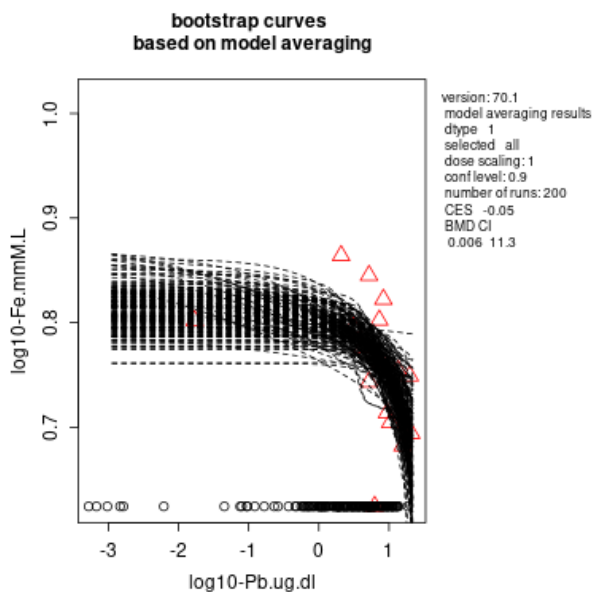
E



F



G



**Slika 5.** Grafički prikazi modelovanja odnosa internih doza olova (BLL,  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) i nivoa hemoglobina (A) u krvi, holesterola (B), HDL holesterola (C), kreatinina (D), uree (E), uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina (F) u serumu i Fe (G) u punoj krvi, kod pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

**Tabela 13.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksterna doza-odgovor za efekte olova u krvi upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (mg Pb/kg t.m./dan)	BMDU (mg Pb/kg t.m./dan)	Trend
HGB	6,41	15,1	-
Holesterol	0,00405	11,3	-
CRE	7,72	16,9	-
HDL	0,0937	12,5	-
UA	0,725	11,3	-
SOD	0,000493	12,3	-
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	2,13e-06	0,385	-
Zn	0,00203	1,37	+
Cu	<b>1,38e-06*</b>	3,91	-
Fe	0,0108	11	-

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), hemoglobin (HGB), kreatinin (CRE), HDL holesterol (HDL), mokraćna kiselina (UA), superoksid dismutaza (SOD), superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), cink (Zn), bakar (Cu), gvožđe (Fe); \* najniža BMDL

**Tabela 14.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa internih doza (BLL, µg/dL)-odgovor za efekte olova u krvi pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (µg Pb/dL)	BMDU (µg Pb/dL)	Trend
HGB	5,77	17,9	-
Holesterol	0,223	14	-
CRE	0,000561	31	-
HDL	1,29	12,8	-
Urea	3,68	29,7	-
AOPP	<b>3,69e-06*</b>	9,15	+
Fe	0,00596	11,3	-

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), hemoglobin (HGB), kreatinin (CRE), nivoi olova u krvi (BLL), HDL holesterol (HDL), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), gvožđe (Fe), \* najniža BMDL

## 4.4. Efekti na hormonski status

### 4.4.1. Nivoi tiroidnih hormona i testosterona

Tretman olovom doveo je do sniženja nivoa testosterona u serumu pacova pri čemu je statistički značajno smanjenje dobijeno u grupama tretiranim sa dozama višim od 0,1 mg Pb/kg t.m./dan (Tabela 15). Zapažen je trend porasta nivoa tiroidnih hormona, pre svega T<sub>4</sub> i fT<sub>4</sub>, koji su bili statistički značajno viši u grupama Pb1 i Pb15.

**Tabela 15.** Uticaj rastućih doza olova na nivoe tiroidnih hormona i testosterona u serumu pacova nakon oralne subakutne ekspozicije

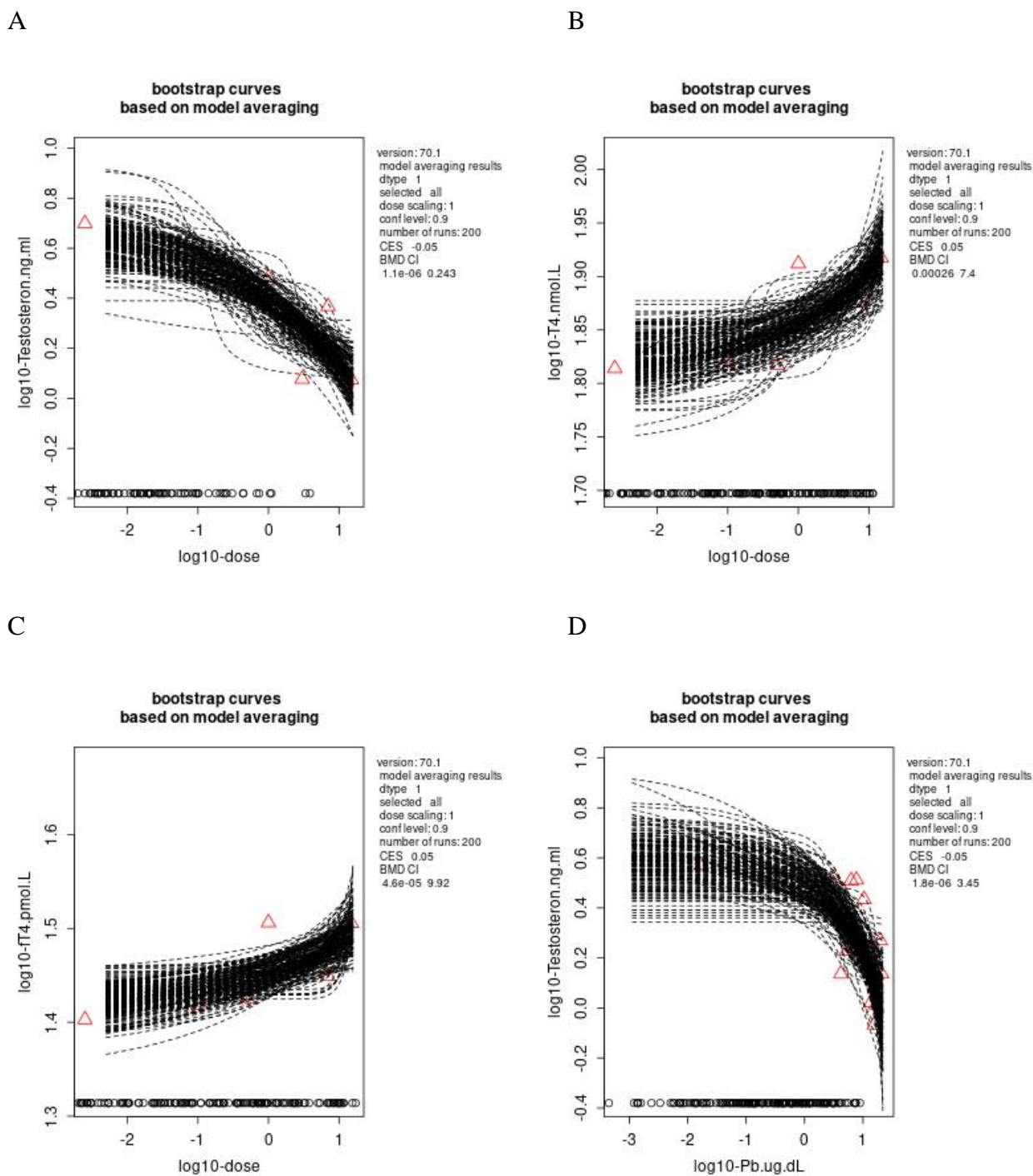
Hormon		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
T <sub>3</sub> <sup>b</sup>	medijana	1,62	1,78	1,67	2,02	1,88	1,82	1,84
pmol/L	opseg	1,57-2,07	1,68-1,99	1,54-1,97	1,47-2,31	1,67-2,14	1,61-2,13	1,77-1,93
T <sub>4</sub> <sup>a</sup>	SV	66,02	67,53	66,14	<b>83,73</b> <sup>*†‡</sup>	76,48	75,71	<b>82,92</b> <sup>*†‡</sup>
pmol/L	SD	11,53	13,28	8,706	20,09	7,394	11,33	7,070
fT <sub>3</sub> <sup>a</sup>	SV	5,89	6,24	5,85	6,907	6,44	6,32	6,11
nmol/L	SD	0,72	0,43	0,30	0,8693	0,77	1,09	0,21
fT <sub>4</sub> <sup>a</sup>	SV	25,45	26,60	26,72	<b>32,86</b> <sup>*</sup>	28,88	28,38	<b>32,21</b> <sup>*</sup>
nmol/L	SD	3,120	5,158	2,979	7,927	2,844	4,135	3,860
Testosteron <sup>a</sup>	SV	5,53	3,90	<b>2,92</b> <sup>**</sup>	<b>3,35</b> <sup>*</sup>	<b>1,63</b> <sup>***†</sup>	<b>2,40</b> <sup>**</sup>	<b>1,23</b> <sup>*†§</sup>
ng/ml	SD	2,67	1,81	0,64	1,55	0,75	0,65	0,39

\* † ‡ § #  $\wedge p < 0,05$ ; \* \* † ‡ ‡ § § ##  $\wedge \wedge p < 0,01$ ; \* \* \* † † ‡ ‡ § § § ###  $\wedge \wedge \wedge p < 0,001$ ; u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; <sup>a</sup>ANOVA i *Fisher's LSD* post-hoc test odnosno <sup>b</sup>*Kruskal-Wallis* i *Mann-Whitney U* post-hoc test

### 4.4.2. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova na nivoe tiroidnih hormona i testosterona u serumu

Prilikom modelovanja odnosa eksternih doza olova i nivoa hormona, dobijena je dozna zavisnost za testosteron, sa najnižom BMDL vrednošću (BMDL: 1,1e-06 mg Pb/kg t.m./dan), zatim T<sub>4</sub> (BMDL: 0,00026 mg Pb/kg t.m./dan) i fT<sub>4</sub> (4,6e-05 mg Pb/kg t.m./dan), dok je u slučaju modelovanja internih doza olova (BLL) i nivoa hormona dobijena dozna zavisnost samo za testosteron (BMDL: 1,8e-06  $\mu$ g/dL). Prikaz modela i rezultata dobijenih modelovanjem odnosa doza-odgovor dat je u Tabeli 16 i Tabeli 17, detaljan prikaz u Prilogu 1 Tabeli 3, dok je grafički prikaz dat na Slici 6. Za nivoe ostalih ispitivanih hormona u serumu nije dobijena dozna zavisnost.





**Slika 6.** Grafički prikazi modelovanja odnosa eksternih doza olova i nivoa testosterona (A), T<sub>4</sub> (B) i fT<sub>4</sub> (C) u serumu pacova; Grafički prikazi modelovanja odnosa internih doza olova (BLL, μg/dL) i nivoa testosterona (D) u serumu pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

**Tabela 16.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksternih doza olova-odgovor za efekte olova na hormone u serumu pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Hormon	BMDL (mg Pb/kg t.m./dan)	BMDU (mg Pb/kg t.m./dan)	Trend
Testosteron	1,07e-06*	0,243	-
T4	0,00256	7,4	+
ft4	4,6e-05	9,92	+

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), \* najniža BMDL

**Tabela 17.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa internih doza olova (BLL,  $\mu\text{g Pb/dL}$ )-odgovor za efekte olova na hormone u serumu pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Hormon	BMDL ( $\mu\text{g Pb/dL}$ )	BMDU ( $\mu\text{g Pb/dL}$ )	Trend
Testosteron	1,82e-06	3,45	-

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU)

## 4.5. Efekti na jetru

### 4.5.1. Parametri oksidativnog statusa

U grupama pacova koje su tretirane olovom zapažen je porast nivoa AOPP (Tabela 18). U tretiranim grupama zapaža se indukcija aktivnosti enzima SOD, sa najvišim porastom u grupi tretiranom najvišom dozom (15 mg Pb/kg t.m./dan). Nivo MDA je bio nešto niži u grupama Pb0.1 i Pb0.7 u odnosu na kontrolu. Kod ostalih parametara nije uočena statistički značajna promena u odnosu na kontrolnu grupu.

**Tabela 18.** Uticaj rastućih doza olova na parametre oksidativnog statusa u jetri pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

Parametar		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
AOPP <sup>a</sup>	SV	21,80	24,25	23,10	<b>28,00***‡</b>	24,60#	<b>27,05***‡</b>	23,60#Λ
(μmol/g protein)	SD	6,20	7,50	7,30	9,40	2,70	4,70	3,80
O <sub>2</sub> <sup>-a</sup>	SV	32,89	36,47	36,51	34,90	38,07	33,88	39,05
(μmol/min/g protein)	SD	2,73	3,98	5,91	3,04	1,89	3,75	7,73
SOD <sup>a</sup>	SV	5,753	<b>10,44***</b>	7,29†	7,30†	<b>10,31***‡§</b>	7,84†	<b>13,28***†‡§#Λ</b>
(U/g protein)	SD	2,63	3,26	2,92	0,94	2,37	0,55	0,44
TOS <sup>b</sup>	medijana	2,99	3,35	3,54	2,26	3,52	3,51	2,92
(μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv. /g protein)	opseg	1,95	2,22	1,43	1,43	2,10	0,44	3,60
MDA <sup>a</sup>	SV	0,2100	<b>0,1517*</b>	0,2467†††	0,1717‡	0,2250††§	<b>0,1567*†††‡§</b>	0,23††§Λ
(μmol/g protein)	SD	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04	0,06
SHG <sup>b</sup>	medijana	0,090	0,100	0,095	0,110	0,110	0,095	0,115
(mmol/g protein)	opseg	0,040	0,140	0,080	0,030	0,020	0,050	0,070

Uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoksid dismutaza (SOD), totalni oksidativni status (TOS), malondialdehid (MDA), sulfhidrilne grupe (SHG), srednja vrednost (SV), standardna devijacija (SD); \* † ‡ § # Λ  $p < 0,05$ , \*\* †† ‡‡ §§ ## ΛΛ  $p < 0,01$ , \*\*\* ††† ‡‡‡ §§§ ### ΛΛΛ  $p < 0,001$  u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; <sup>a</sup>ANOVA i *Fisher's LSD* post-hoc test odnosno <sup>b</sup>*Kruskal-Wallis* i *Mann-Whitney U* post-hoc test

### 4.5.2. Nivoi bioeleminata

Nakon analize bioeleminata u jetri, može se zapaziti trend pada nivoa Cu sa najnižom vrednošću u najvišoj doznoj grupi. Statistički značajno niži nivoi Cu su primećeni kod grupa Pb0.5 i višim. Kod ostalih vrednosti nivoa bioeleminata u jetri (Zn, Fe, Mn) nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu vrednost (Tabela 19).

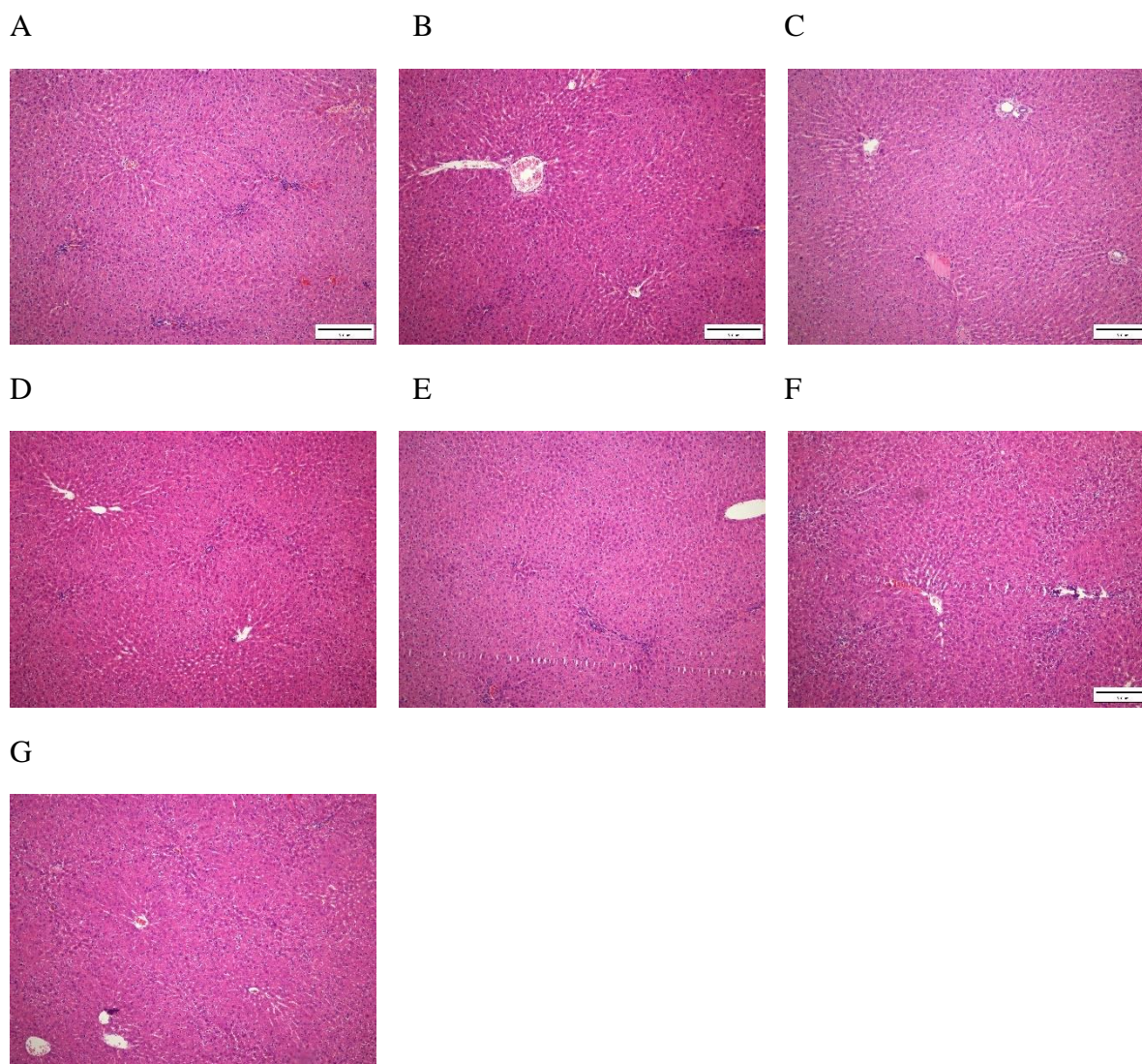
**Tabela 19.** Uticaj rastućih doza olova na nivoe bioelemenata u jetri pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

Metal ( $\mu\text{g/g}$ )		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
Cu	SV	2,58	2,11	<b>1,94*</b>	<b>1,78**</b>	<b>1,73**</b>	<b>1,68***</b>	<b>1,29***†††</b>
	SD	0,39	0,19	0,26	0,59	0,26	0,59	0,52
Zn	SV	25,22	27,58	24,60	26,71	23,28	26,67	22,24
	SD	2,244	1,637	2,131	5,554	2,557	5,866	4,485
Fe	SV	88,19	103,5	92,85	92,79	76,57††	103,1#	86,89
	SD	8,116	13,01	17,74	23,04	8,890	13,83	19,49
Mn	SV	4,21	4,77	2,07†	2,49	2,15	5,60‡§#	2,70 $\wedge$
	SD	1,38	1,22	1,19	1,52	1,37	2,42	1,19

Srednja vrednost (SV), standardna devijacija (SD), \* † ‡ § #  $\wedge$   $p < 0,05$ ; \*\* †† ‡‡ §§ ##  $\wedge\wedge$   $p < 0,01$ ; \*\*\* ††† ‡‡‡ §§§ ###  $\wedge\wedge\wedge$   $p < 0,001$ ; u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test

### 4.5.3. Patohistološke promene

Histološkim pregledom tkiva jetre pacova tretiranih grupa nije uočena značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu. Preseci tkiva jetre prikazani su na Slici 7.



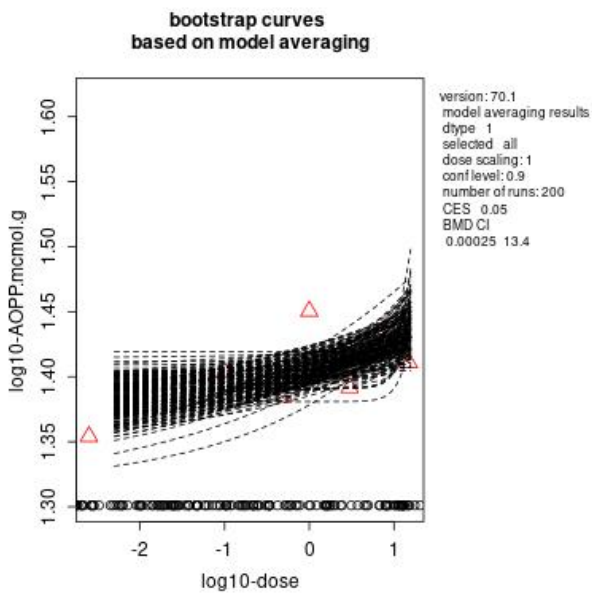
**Slika 7.** Histološki prikaz jetre u (A) kontrolnoj, (B) Pb0.1, (C) Pb0.5, (D) Pb1, (E) Pb3, (F) Pb7, (G) Pb15 grupi pacova tretiranih subakutno rastućim dozama olova, dobijenih uz upotrebu *Haematoxylin-Eosin* bojenja

### 4.5.4. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u jetri

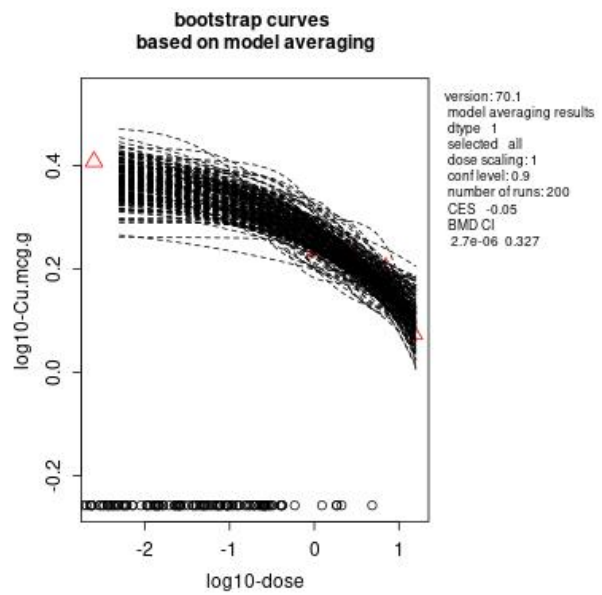
Na Slici 8 predstavljeno je modelovanje odnosa doza olova sa odgovorom za efekte na jetru. Uočena je dozna zavisnost za AOPP (eksterna doza-odgovor, BMDL: 0,00025 mg Pb/kg t.m./dan) i Cu (eksterna doza-odgovor, BMDL: 2,7e-06 mg Pb/kg t.m./dan; interna doza (BLL)-odgovor, BMDL: 1,4e-05  $\mu$ g/dL; Interna doza (ng Pb/g jetre)-odgovor, BMDL: 2,4e-06 ng Pb/g). Detaljan

prikaz modela i parametara modelovanja dat je u Prilogu 1 Tabeli 4, dok su BMD vrednosti prikazane tabelarno (Tabela 20, 21, 22).

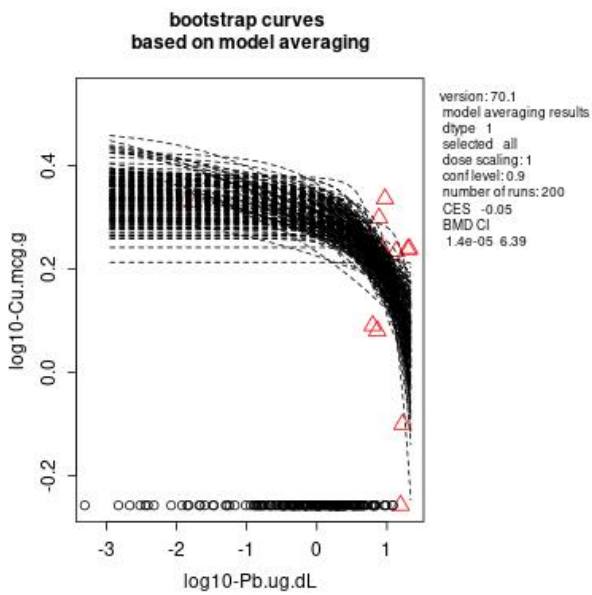
A



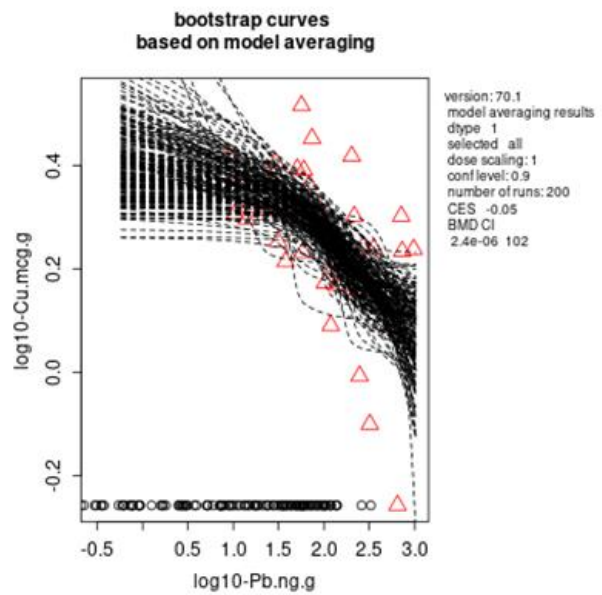
B



C



D



**Slika 8.** Grafički prikazi modelovanja odnosa eksternih doza olova i nivoa AOPP (A), Cu (B) u jetri pacova; Grafički prikazi modelovanja odnosa internih doza olova (BLL) i nivoa Cu u jetri pacova (C); Grafički prikazi modelovanja odnosa internih doza olova (ng/g jetre) i nivoa Cu u jetri pacova (D) tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

**Tabela 20.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksternih doza olova-odgovor za efekte olova na jetru pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (mg Pb/kg t.m./dan)	BMDU (mg Pb/kg t.m./dan)	Trend
AOPP	0,000248	13,4	+
Cu	2,66e-06*	0,327	-

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), \*najniža BMDL

**Tabela 21.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa internih doza olova (BLL)-odgovor za efekte olova na jetru pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (µg Pb/dL)	BMDU (µg Pb/dL)	Trend
Cu	1,39e-05	6,39	-

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU)

**Tabela 22.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa internih doza olova (ng Pb/g jetre)-odgovor za efekte olova na jetru pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (ng Pb/g)	BMDU (ng Pb/g)	Trend
Cu	2,37e-06	102	-

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU)

## 4.6. Efekti na bubrege

### 4.6.1. Parametri oksidativnog statusa

Kod svih tretiranih grupa došlo je do inhibicije aktivnosti enzima SOD u bubrezima (Tabela 23). Blago smanjenje nivoa MDA i  $O_2^{\cdot-}$  primećeno je kod pojedinih tretiranih grupa. Ostali parametri oksidativnog statusa su ostali nepromenjeni u odnosu na kontrolnu vrednost.

**Tabela 23.** Uticaj rastućih doza olova na parametre oksidativnog statusa u bubrezima pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

Parametar		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
AOPP <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol/g}$ protein)	SV	6,75	6,04	4,66	6,86	5,56	7,40	5,71
	SD	1,21	1,26	0,817	0,74	1,06	2,20	1,57
$O_2^{\cdot-}$ <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol/min/g}$ protein)	SV	34,91	35,24	33,61	27,13**††‡	33,64	29,13**††	33,87§Λ
	SD	3,60	6,01	4,70	1,56	9,782	4,69	5,75
SOD <sup>a</sup> (U/g)	SV	13,56	9,205*	10,64	7,204**	7,182**	7,446**	8,099**
	SD	0,95	2,36	3,44	2,80	4,24	2,53	3,23
TOS <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./g protein)	SV	3,30	3,30	3,60	3,11	3,84	3,35	3,78
	SD	0,38	0,37	0,34	0,20	0,41	0,71	0,66
MDA <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol/g}$ protein)	SV	1,659	1,418	1,021**	0,726***	1,103*	0,692***	1,139*
	SD	0,324	0,371	0,229	0,553	0,315	0,144	0,224
SHG <sup>b</sup> (mmol/g protein)	medi jana	0,084	0,095	0,072	0,089	0,086	0,110	0,088
	opse g	0,07-0,10	0,06- 0,11	0,05-0,08	0,07-0,13	0,06-0,09	0,10-0,19	0,05-0,09

Uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoksid dismutaza (SOD), totalni oksidativni status (TOS), malondialdehid (MDA), sulfhidrilne grupe (SHG), srednja vrednost (SV), standardna devijacija (SD); \* † ‡ § # Λ  $p < 0,05$ , \*\* †† ‡‡ §§ ## ΛΛ  $p < 0,01$ , \*\*\* ††† ‡‡‡ §§§ ### ΛΛΛ  $p < 0,001$  u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; <sup>a</sup>ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test, <sup>b</sup>Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U post-hoc test

### 4.6.2. Nivoi bioelemenata

Nije zapažena promena u nivou bioelemenata u tkivu bubrega tretiranih pacova u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 24).

**Tabela 24.** Uticaj rastućih doza olova na nivoe bioelemenata u bubrezima pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

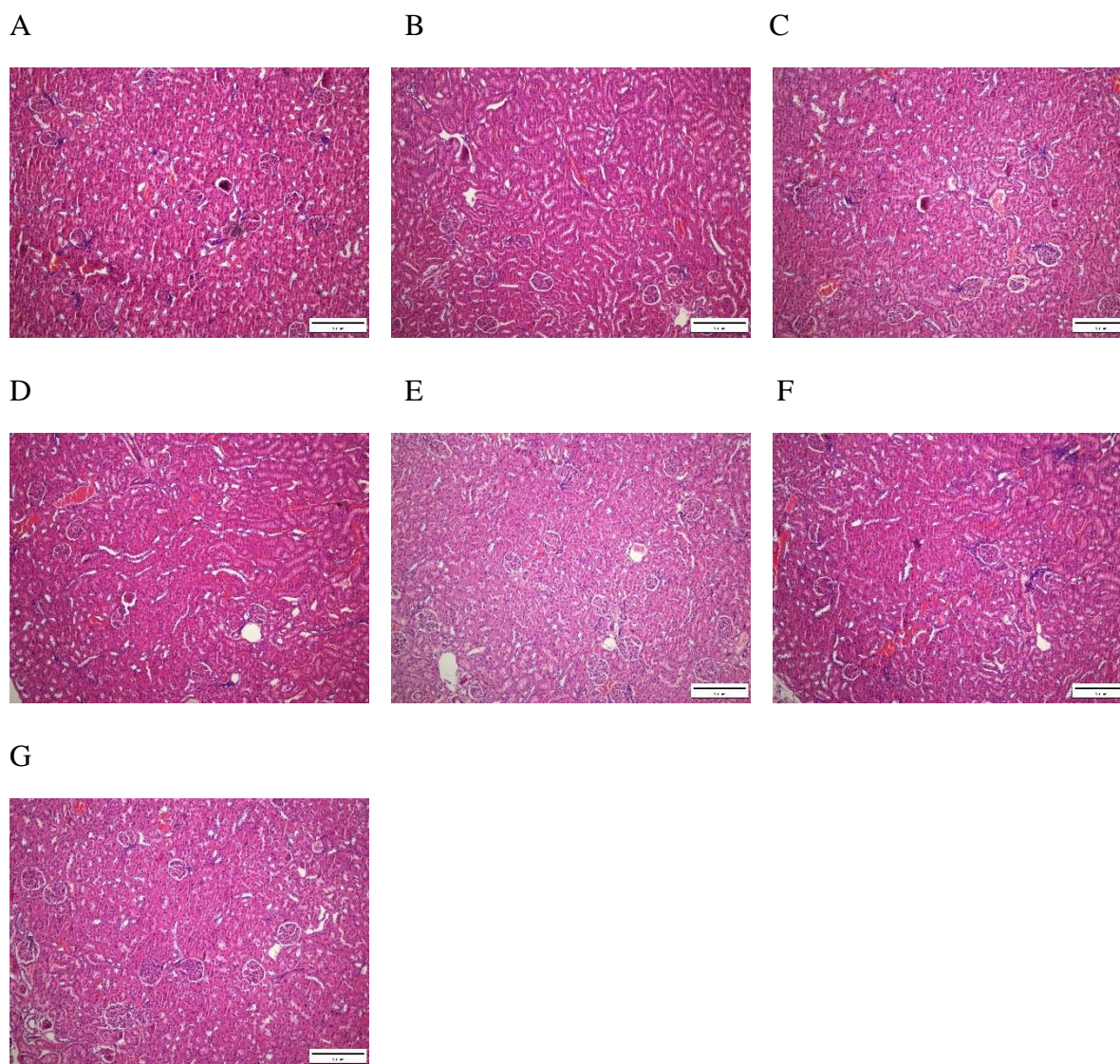
Metal ( $\mu\text{g/g}$ )		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
Cu	SV	1,79	1,65	1,88	1,36	2,04	1,38	1,43
	SD	0,82	0,58	0,52	0,62	0,78	0,49	0,35
Zn	SV	9,48	8,52	10,27	8,91	11,87	8,025	7,969
	SD	4,22	2,84	2,92	4,34	3,29	2,51	0,67
Fe	SV	5,155	6,074	8,935	5,28	8,38	6,143	5,52
	SD	1,59	2,13	3,99	2,35	2,80	2,25	1,88
Mn	SV	3,47	1,95	2,41	3,13	2,86	2,40	2,62
	SD	1,52	0,98	0,33	1,24	1,48	0,58	0,98

Srednja vrednost (SV), standardna devijacija (SD) ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test



### 4.6.3. Patohistološke promene

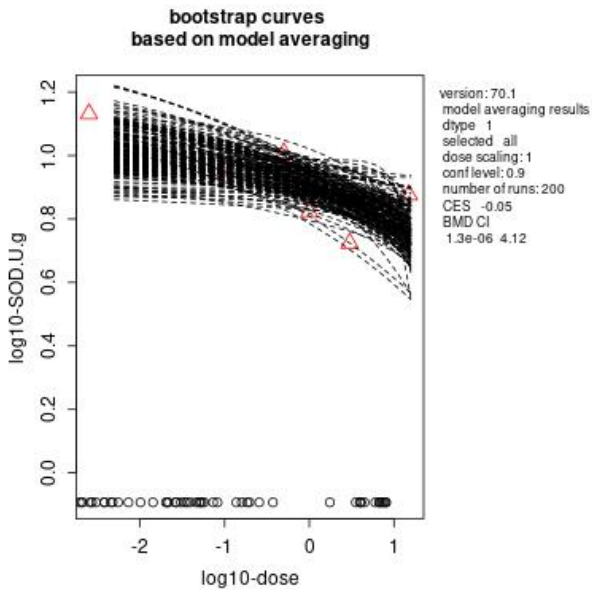
Histološkim pregledom tkiva bubrega pacova tretiranih grupa nije uočena značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu. Preseci tkiva bubrega prikazani su na Slici 9.



**Slika 9.** Histološki prikaz bubrega u (A) kontrolnoj, (B) Pb0.1, (C) Pb0.5, (D) Pb1, (E) Pb3, (F) Pb7, (G) Pb15 grupi pacova tretiranih subakutno rastućim dozama olova, dobijenih uz upotrebu *Haematoxylin-Eosin* bojenja

### 4.6.4. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u bubrezima

Modelovanjem odnosa eksternih doza-odgovor za efekte olova u bubrezima dobijena je dozna zavisnost za aktivnost SOD (Slika 10), dok za sve ostale parametre modelovanjem odnosa doza-odgovor nije dobijena dozna zavisnost. Modelovanjem internih doza-odgovor nije dobijena dozna zavisnost za ispitivane parametre. Prikaz rezultata modelovanja dat je u Tabeli 25, a detaljan prikaz u Prilogu 1 Tabeli 5.



**Slika 10.** Grafički prikazi modelovanja odnosa eksternih doza olova i nivoa SOD u bubrezima pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

**Tabela 25.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksterne doze olova-odgovor za efekte olova na bubrege pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

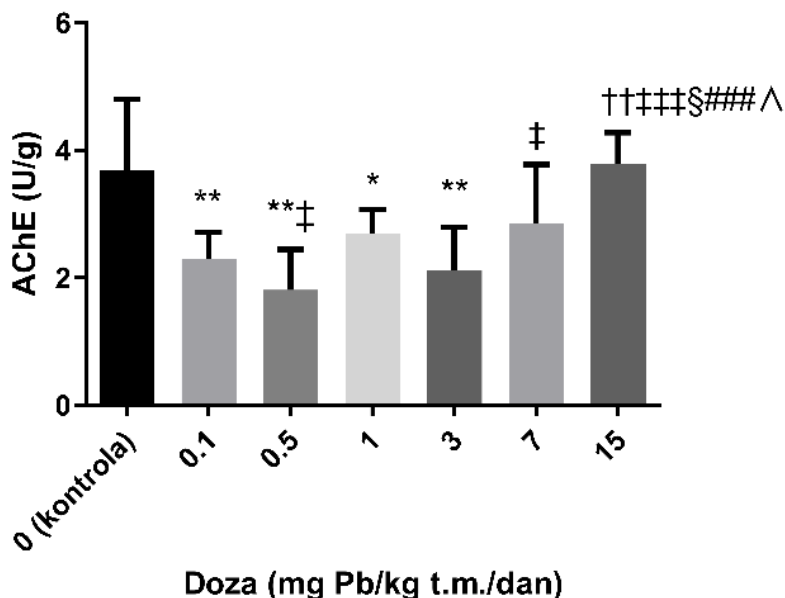
Parametar	BMDL (mg Pb/kg t.m./dan)	BMDU (mg Pb/kg t.m./dan)	Trend
SOD	1,27e-06	4,12	-

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), superoksid dismutaza (SOD)

## 4.7. Efekti na mozak

### 4.7.1. Aktivnost enzima acetilholinesteraze

Statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima acetilholinesteraze u odnosu na kontrolu je zapaženo kod grupa tretiranih dozama olova nižim od 7 mg Pb/kg t.m./dan (-28%, -51%, -27% i -42% za grupe Pb 0.1, 0.5, 1, 3, redom) (Slika 11). U slučaju tretmana sa dozama 7 i 15 mg Pb/kg t.m./dan, nije došlo do promene u aktivnosti enzima.



**Slika 11.** Uticaj rastućih doza olova na aktivnost enzima acetilholinesteraze u mozgu pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

\* † ‡ § # ^ p < 0,05; \*\* †† ‡‡ §§ ## ^^ p < 0,01; \*\*\* ††† ‡‡‡ §§§ ### ^^ p < 0,001 u odnosu na kontrolu, 0.1, 0.5, 1, 3,7 grupu, redom; ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test

### 4.7.2. Parametri oksidativnog statusa

Uočeno je značajno povećanje nivoa  $O_2^-$  u mozgu kod pacova tretiranih sa 3, 7 i 15 mg Pb/kg t.m./dan u poređenju sa vrednošću u kontroli (Tabela 26). Najviši nivo  $O_2^-$  je izmeren u mozgu pacova tretiranim najvišom dozom, koji se statistički značajno razlikovao u odnosu na sve ostale grupe. Aktivnost SOD značajno je smanjena u svim tretiranim grupama u odnosu na kontrolu, s tim da nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti SOD između grupa tretiranih olovom. Samo u grupi Pb1 primećeno je značajno povećanje nivoa MDA u poređenju sa vrednošću u kontrolnoj grupi.

**Tabela 26.** Uticaj rastućih doza olova na parametre oksidativnog statusa u mozgu pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

Parametar		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
AOPP <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol/g}$ protein)	SV	17,87	18,57	18,67	19,02	20,17	20,95	20,79
	SD	3,08	4,30	1,44	2,15	0,46	2,38	2,52
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol/min/g}$ protein)	SV	15,60	14,50	16,04	18,51	<b>20,28*</b> †	<b>21,21*</b>	<b>23,36**†††††§</b>
	SD	19,01	13,95	6,44	11,19	7,23	8,21	3,46
SOD <sup>a</sup> (U/g protein)	SV	21,91	<b>14,28***</b>	<b>12,93***</b>	<b>15,09***</b>	<b>12,18***</b>	<b>15,44**</b>	<b>13,06***</b>
	SD	2,43	4,08	2,42	2,374	2,78	3,86	0,76
TOS <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{g}$ protein)	SV	1,14	1,61	1,46	1,902	2,36	1,95	2,20
	SD	0,56	1,14	0,56	0,54	0,33	0,57	0,48
MDA <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol/g}$ protein)	SV	4,66	4,77	4,45	<b>6,13*†††</b>	3,98§§§	3,73†§§§	4,34§§§
	SD	0,86	1,36	0,51	0,98	0,38	0,78	0,24
SHG <sup>b</sup> (mmol/g protein)	medijana	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05
	opseg	0,04	0,02	0,03	0,03	0,02	0,05	0,02

Uznappedovali produkti oksidacije proteina (AOPP), superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), superoksid dismutaza (SOD), totalni oksidativni status (TOS), malondialdehid (MDA), sulfhidrilne grupe (SHG), srednja vrednost (SV), standardna devijacija (SD); \* † ‡ § #  $\wedge p < 0,05$ ; \*\* †† ‡‡ §§ ##  $\wedge\wedge p < 0,01$ ; \*\*\* ††† ‡‡‡ §§§ ###  $\wedge\wedge\wedge p < 0,001$  u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; <sup>a</sup>ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test

#### 4.7.3. Nivoi bioeleminata

U grupama tretiranim dozama većim od 0,5 mg Pb/kg t.m./dan primećen je trend povećanja nivoa Zn u mozgu (Tabela 27). Nivo Fe u mozgu bio je niži u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolnom vrednošću, ali statistički značajno samo u grupama Pb0.1, Pb1, Pb7 i Pb15. Nije bilo značajnih promena u nivoima Cu i Mn u mozgu između grupa.

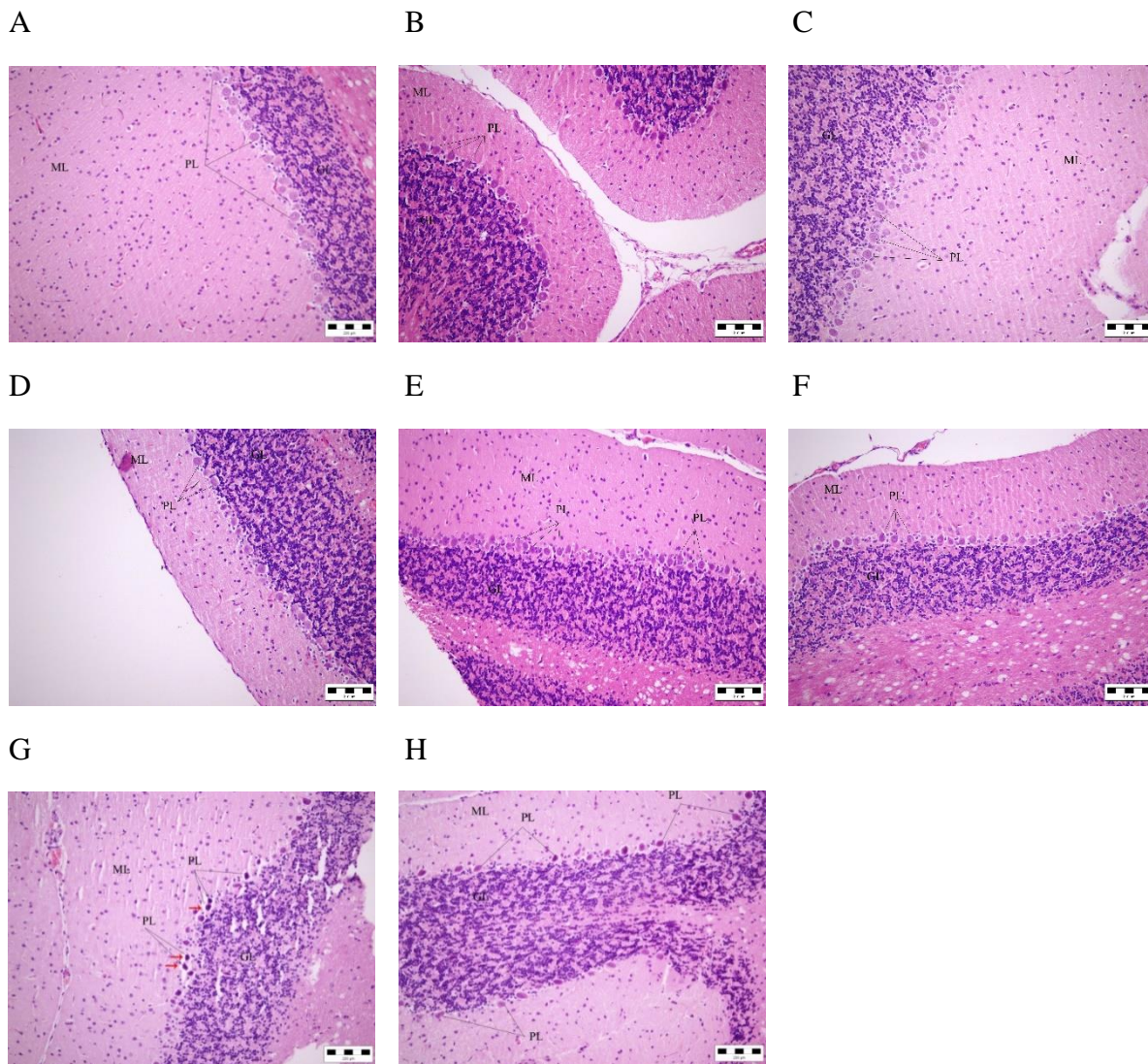
**Tabela 27.** Uticaj rastućih doza olova na nivoie bioeleminata u mozgu pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

Metal ( $\mu\text{g/g}$ )		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
Cu <sup>b</sup>	Mediana	1,90	2,15	1,86	1,91	1,97	2,06	1,99
	Opseg	1,63-2,28	1,99-2,30	1,75-1,98	1,84-2,35	1,84-2,14	1,78-2,10	1,67-3,03
Zn <sup>a</sup>	SV	10,1	11,2	10,3	<b>12,9*†††</b>	<b>12,9*†††</b>	<b>12,3*†</b>	11,1§#
	SD	0,53	0,76	0,99	1,00	1,26	2,81	0,42
Fe <sup>b</sup>	Mediana	12,27	<b>8,80*</b>	11,20	<b>6,70**††</b>	10,50§§§	<b>8,54*†#</b>	<b>7,76**†#</b>
	Opseg	11,21-14,89	6,78-10,50	8,61-14,85	4,55-9,63	10,00-13,89	4,74-9,99	6,18-9,91
Mn <sup>b</sup>	Mediana	4,19	4,00	2,39	4,46	1,99	3,14	3,39
	Opseg	1,60-6,30	1,28-4,98	1,91-3,41	3,44-5,33	1,89-4,99	1,82-5,26	2,06-6,38

\* † ‡ § #  $\wedge p < 0,05$ ; \*\* †† ‡‡ §§ ##  $\wedge\wedge p < 0,01$ ; \*\*\* ††† ‡‡‡ §§§ ###  $\wedge\wedge\wedge p < 0,001$  u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; <sup>a</sup>ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test odnosno <sup>b</sup>Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U post-hoc test

#### 4.7.4. Patohistološke promene

Histološki pregled moždanog tkiva pokazao je patološke promene kod pacova tretiranih najvišom dozom (15 mg Pb/kg t.m./dan) (Slika 12), dok u ostalim grupama nije bilo histoloških promena (slike B, C, D, E, F). U najvišoj doznoj grupi (Slika 12, G i H) uočava se distorzija oblika Purkinjeovih ćelija (skupljanje i deformacija jedra). Može se videti blaga do umerena kondenzacija hromatina i pojava perinuklearnog „haloa“. Raspored Purkinjeovih ćelija je takođe izmenjen i može se primetiti veliki razmak između susednih Purkinjeovih ćelija.



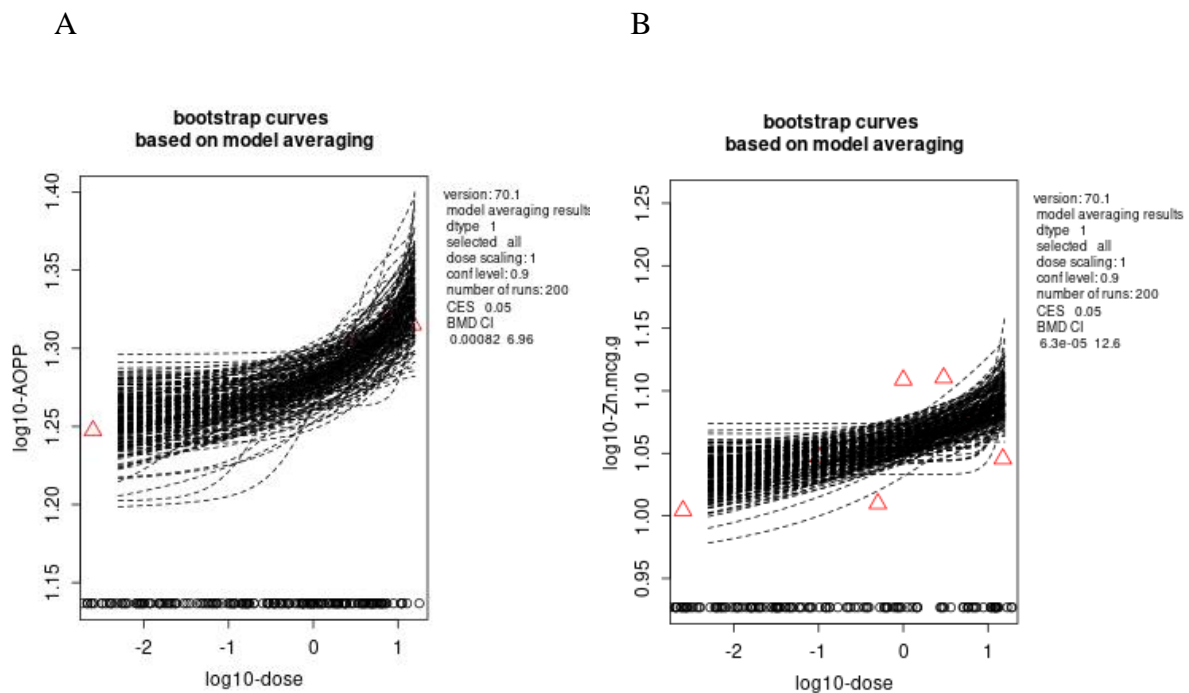
**Slika 12.** Histološki prikaz mozga u (A) kontrolnoj, (B) Pb0.1, (C) Pb0.5, (D) Pb1, (E) Pb3, (F) Pb7, (G, H) Pb15 grupi pacova tretiranih subakutno rastućim dozama olova, dobijenih uz upotrebu *Haematoxylin-Eosin* bojenja.

Tri sloja cerebelarne kore pacova gledano od spolja ka unutra; spoljašnji molekularni sloj (ML), sloj Purkinjeovih ćelija (PL) koji je formiran od jednog sloja Purkinjeovih ćelija (PC) i unutrašnji sloj granularnih ćelija (GL) formiran od čvrsto zbijenih malih zrnastih ćelija. Mikroskopska analiza mozga pacova u kontrolnoj grupi (A) i grupi Pb15 (G, H). (G) Nefiziološki oblik Purkinje ćelija može se primetiti sa smanjenim i hiperhromatičnim jedrom. Predstavljene su perinuklearni oreoli oko Purkinjeovih ćelija (crvene strelice). (H) Širok razmak između Purkinjeovih ćelija sa izobličenjem njihovog oblika (hiperhromatično jedro nepravilnog oblika).

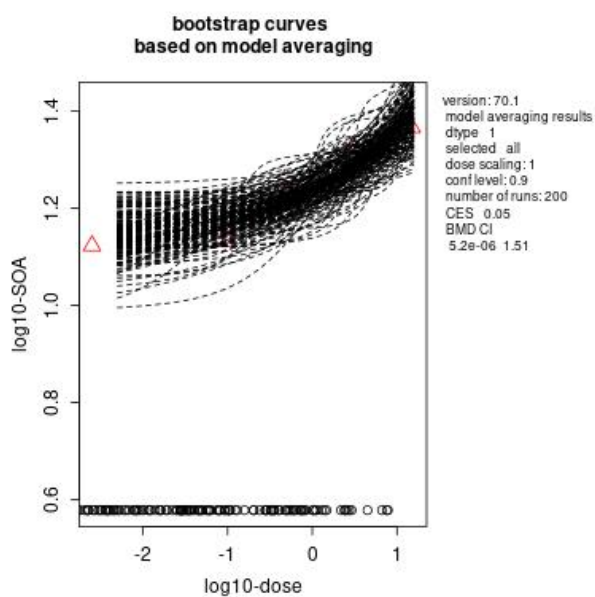
#### 4.7.5. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u mozgu

Modelovanjem odnosa eksternih doza olova sa odgovorom dobijena je dozna zavisnost za AOPP (BMD: 0,0082 mg Pb/kg t.m./dan), TOS (BMD: 4,5e-06 mg Pb/kg t.m./dan),  $O_2^{\cdot-}$  (BMD: 5,2e-06 mg Pb/kg t.m./dan) i Zn (BMD: 6,3e-06 mg Pb/kg t.m./dan) pri čemu je trend promene bio pozitivan (Slika 13 A.B.C.D.). U svim ostalim slučajevima eksterni odnos doza-odgovor nije utvrđen. Najniža vrednost BMDL dobijena je za TOS (BMD: 4,5e-06 mg Pb/kg t.m./dan).

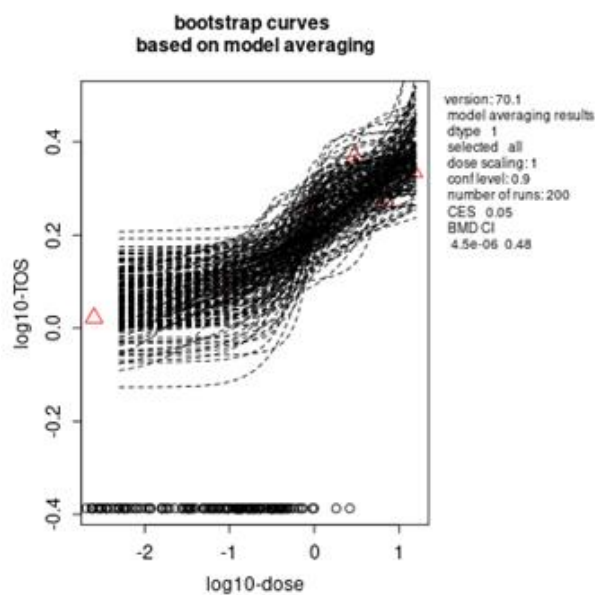
Modelovanjem odnosa internih doza olova (BLL,  $\mu\text{g/dL}$ ) sa odgovorom, dobijena je dozna zavisnost samo za  $O_2^{\cdot-}$  (BMD: 3e-06  $\mu\text{g Pb/dL}$ ) (Slika 13 E.), pri čemu je trend bio pozitivan. Sveobuhvatan detaljan prikaz modela i rezultata dobijenih modelovanjem odnosa doza-odgovor za efekte olova u mozgu pacova dat je u Prilogu 1 Tabeli 6, dok je prikaz BMD dat u Tabelama 28 i 29.



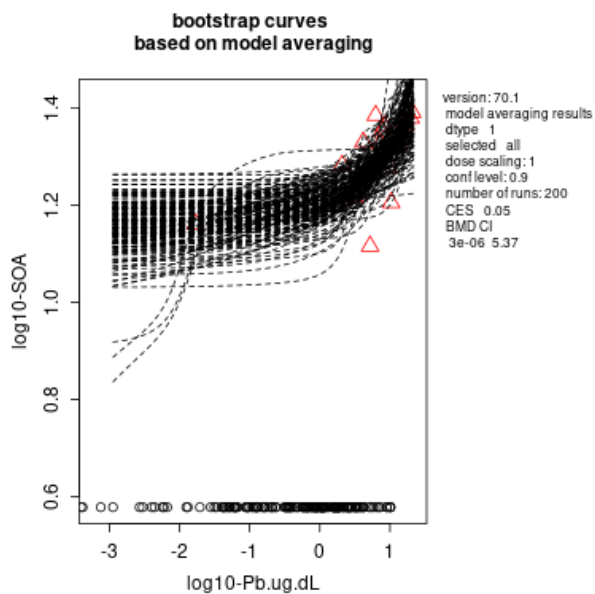
C



D



E



**Slika 13.** Grafički prikazi modelovanja odnosa eksternih doza olova i nivoa AOPP (A), Zn (B),  $O_2^{\bullet-}$  (C) i TOS (D) u mozgu pacova; Grafički prikazi modelovanja odnosa internih doza olova (BLL) i nivoa  $O_2^{\bullet-}$  (E) u mozgu pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

**Tabela 28.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksterne doze olova-odgovor za efekte olova u mozgu pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (mg Pb/kg t.m./dan)	BMDU (mg Pb/kg t.m./dan)	Trend
AOPP	0,00082	6,96	+
TOS	4,49e-06*	0,48	+
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	5,17e-06	1,51	+
Zn	6,27e-06	12,6	+

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), totalni oksidativni status (TOS), cink (Zn), \*najniža BMDL

**Tabela 29.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa internih doza olova (BLL, µg/dL)-odgovor za efekte olova u mozgu pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (µg Pb/dL)	BMDU (µg Pb/dL)	Trend
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	3,05e-06	5,37	+

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)



## 4.8. Efekti na srce

### 4.8.1. Parametri oksidativnog statusa

U svim tretiranim grupama nivoi  $O_2^{\cdot-}$  su bili povišeni u poređenju sa vrednošću u kontrolnoj grupi, s tim da je statistički značajno povećanje zabeleženo samo u grupi pacova tretiranih najvišom dozom od 15 mg Pb/kg t.m./dan (Tabela 30). U grupi Pb15 zabeležen je statistički značajno viši nivo MDA u odnosu na kontrolu. Više vrednosti SHG izmerene su u srcu pacova tretiranih najnižom dozom, dok je u ostalim višim doznim grupama zabeležen blagi porast nivoa SHG koji nije bio tako izražen kao u grupi Pb0.1.

**Tabela 30.** Uticaj rastućih doza olova na parametre oksidativnog statusa u srcu pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

Parameter		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
AOPP <sup>b</sup> ( $\mu\text{mol/g protein}$ )	medijana	3,67	3,82	3,98	4,47	4,43	4,64	3,13
	opseg	1,93	9,81	5,12	4,93	4,41	4,02	4,74
$O_2^{\cdot-}$ <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol/min/g protein}$ )	SV	10,31	13,34	10,85	12,77	12,83	12,43	<b>13,39*</b>
	SD	1,33	1,33	1,12	1,61	2,93	1,88	1,39
SOD <sup>a</sup> (U/g protein)	SV	13,58	10,50	12,06	12,31	12,29	11,14	13,72
	SD	2,87	2,68	3,03	2,02	3,67	2,92	3,99
TOS <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq./g protein)	SV	4,09	3,29	3,31	4,00	3,83	4,47	4,20
	SD	0,43	0,83	1,01	0,84	0,44	0,95	1,11
MDA <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol/g protein}$ )	SV	0,1608	0,2638	0,2060	0,2780	0,2721	0,2487	<b>0,4036***‡Λ</b>
	SD	0,0328	0,0408	0,0300	0,0647	0,0791	0,0491	0,1503
SHG <sup>a</sup> (mmol/g protein)	SV	0,0695	<b>0,1143*</b>	0,0523††	0,0955	0,0782	0,0669†	0,0836
	SD	0,0057	0,0361	0,0143	0,0304	0,0205	0,0116	0,0184

Uznepredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoksid dismutaza (SOD), totalni oksidativni status (TOS), malondialdehid (MDA), sulfhidrilne grupe (SHG), srednja vrednost (SV), standardna devijacija (SD); \* † ‡ Λ  $p < 0,05$  u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 7 grupu redom, \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu; <sup>a</sup>ANOVA i Bonfferoni post-hok test; <sup>b</sup> Kruskal-Wallis test i Mann-Whitney U post-hoc test

### 4.8.2. Nivoi bioelemenata

Nije bilo statistički značajnih promena u nivou esencijalnih metala (Cu, Zn, Fe) u srcu (Tabela 31). Viši nivoi Mn su dobijeni u srcu u grupama životinja tretiranih sa 1 i 7 mg Pb/kg t.m./dan u poređenju sa kontrolnom grupom.

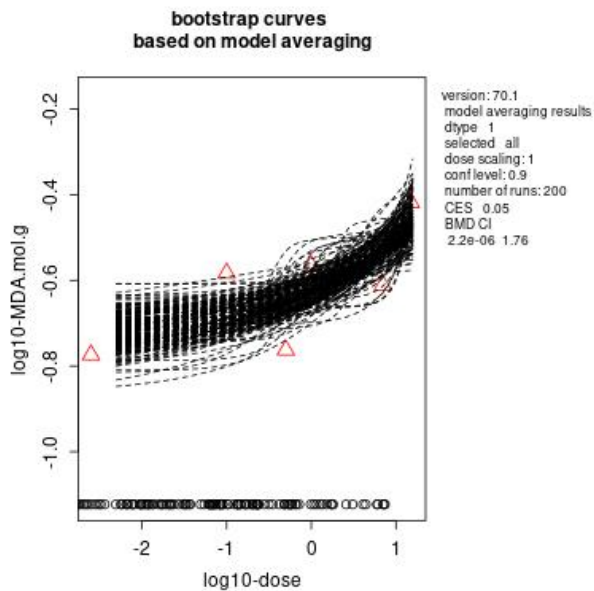
**Tabela 31.** Uticaj rastućih doza olova na nivoe bioelemenata u srcu pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

Metal ( $\mu\text{g/g}$ )		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
Cu <sup>b</sup>	medijana	4,11	4,91	4,02	4,78	5,08	4,67	4,32
	opseg	3,97-4,13	4,40-5,13	2,88-4,42	4,36-5,11	4,06-5,47	4,07-4,76	3,52-6,92
Zn <sup>b</sup>	medijana	17,00	16,03	16,03	16,60	16,62	16,86	15,55
	opseg	15,42-17,67	15,01-16,87	15,80-17,39	15,98-17,64	16,50-19,77	16,25-19,16	11,44-24,02
Fe <sup>b</sup>	medijana	57,44	55,95	51,93	54,31	52,69	53,81	50,58
	opseg	52,67-60,26	50,45-68,01	48,24-59,61	26,61-82,69	43,88-58,30	52,18-68,16	37,87-91,22
Mn <sup>a</sup>	SV	2,91	4,12	3,64	6,26**	2,61§§	5,82*##	3,26§§^
	SD	1,93	1,21	0,83	1,01	0,727	1,57	1,29

\* § #  $\wedge p < 0,05$ ; \*\* §§ ##  $\wedge\wedge p < 0,01$  u odnosu na 0, 1, 3, 7 grupu, redom; <sup>a</sup> ANOVA i *Bonfferoni* post-hoc test; <sup>b</sup> *Kruskal-Wallis* i *Mann-Whitney U* post-hoc test

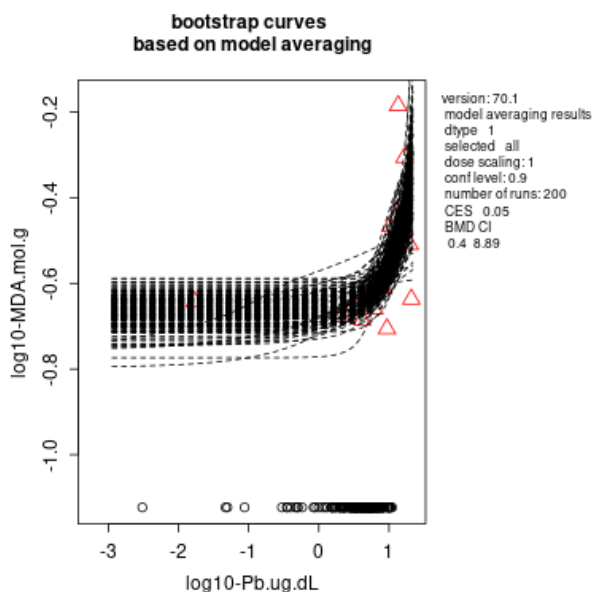
#### 4.8.3. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u srcu

Prilikom modelovanja odnosa eksterna doza-odgovor pokazana je dozna zavisnost za vrednosti MDA u srcu pri čemu je dobijena BMDL iznosila  $2,2e-0.6$  mg Pb/kg t.m./dan (Slika 14). Modelovanje odnosa interna doza (BLL)-odgovor pokazalo je doznu zavisnost za MDA (BMDL:  $0,4$   $\mu\text{g Pb/dL}$ ) i nivo Cu ( $0,081$   $\mu\text{g Pb/dL}$ ) u srcu (Slika 15). U drugom slučaju kad je kao interna doza posmatran nivo Pb u srcu, modelovanje odnosa interna doza-odgovor je pokazalo doznu zavisnost za nivo SHG (BMDL:  $1e-06$  ng Pb/g) (Slika 16). Sveobuhvatan detaljan prikaz modela i rezultata dobijenih modelovanjem odnosa doza-odgovor dat je u Prilogu 1 Tabeli 7, dok su vrednosti BMD prikazane u tabelama 32, 33 i 34. Za ostale ispitivane parametre u srcu nije dobijena dozna zavisnost.

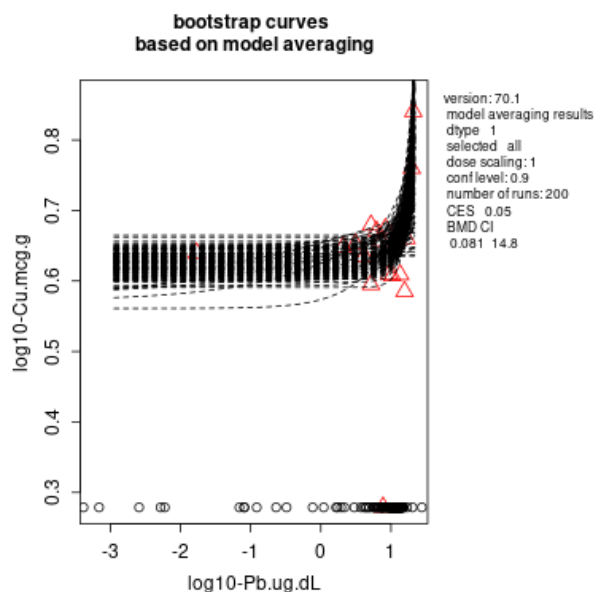


**Slika 14.** Grafički prikazi modelovanja odnosa eksternih doza olova i nivoa MDA u srcu pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

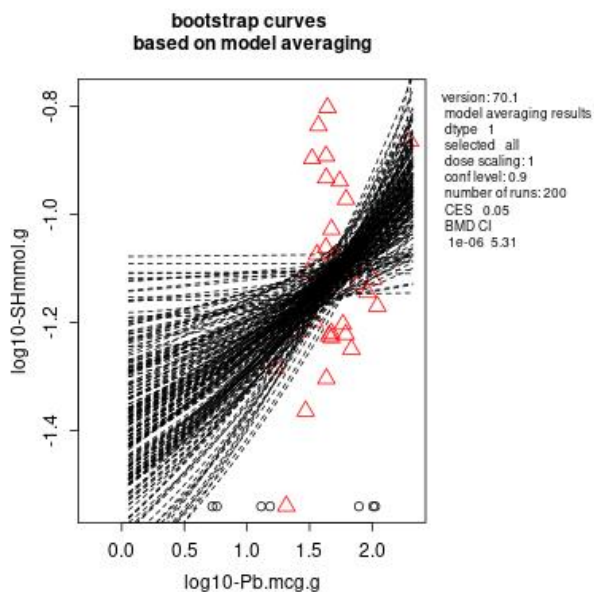
A



B



**Slika 15.** Grafički prikazi modelovanja odnosa nivoa olova u krvi (BLL,  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) i nivoa MDA (A) i Cu (B) kod pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju mediane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.



**Slika 16.** Grafički prikazi modelovanja odnosa internih doza olova (nivoi olova u srcu,  $\text{ng}/\text{g}$ ) i nivoa SHG kod pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju mediane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

**Tabela 32.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksterne doze olova-odgovor za efekte olova na srce pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (mg Pb/kg t.m./dan)	BMDU (mg Pb/kg t.m./dan)	Trend
MDA	0,000248	1,76	+

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), malondialdehid (MDA)

**Tabela 33.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa internih doza olova (BLL, µg/dL)-odgovor za efekte olova na srce pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (µg Pb/dL)	BMDU (µg Pb/dL)	Trend
MDA	0,398	8,89	+
Cu	0,081	14,8	+

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), malondialdehid (MDA), bakar (Cu)

**Tabela 34.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa internih doza olova (ng Pb/g srca)-odgovor za efekte olova na srce pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (ng Pb/g)	BMDU (ng Pb/g)	Trend
SHG	1e-06	5,31	+

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), sulfhidrilne grupe (SHG)

## 4.9. Efekti na testise

### 4.9.1. Nivoi bioelemenata

U grupama tretiranim dozama višim od 0,5 mg Pb/kg t.m./dan zapažaju se viši nivoi Zn u testisima u odnosu na kontrolnu vrednost (Tabela 35). Statistički značajno povećanje Cu i smanjenja Mn primećeno je u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom. Nije bilo statistički značajnih razlika u nivou Fe između grupa.

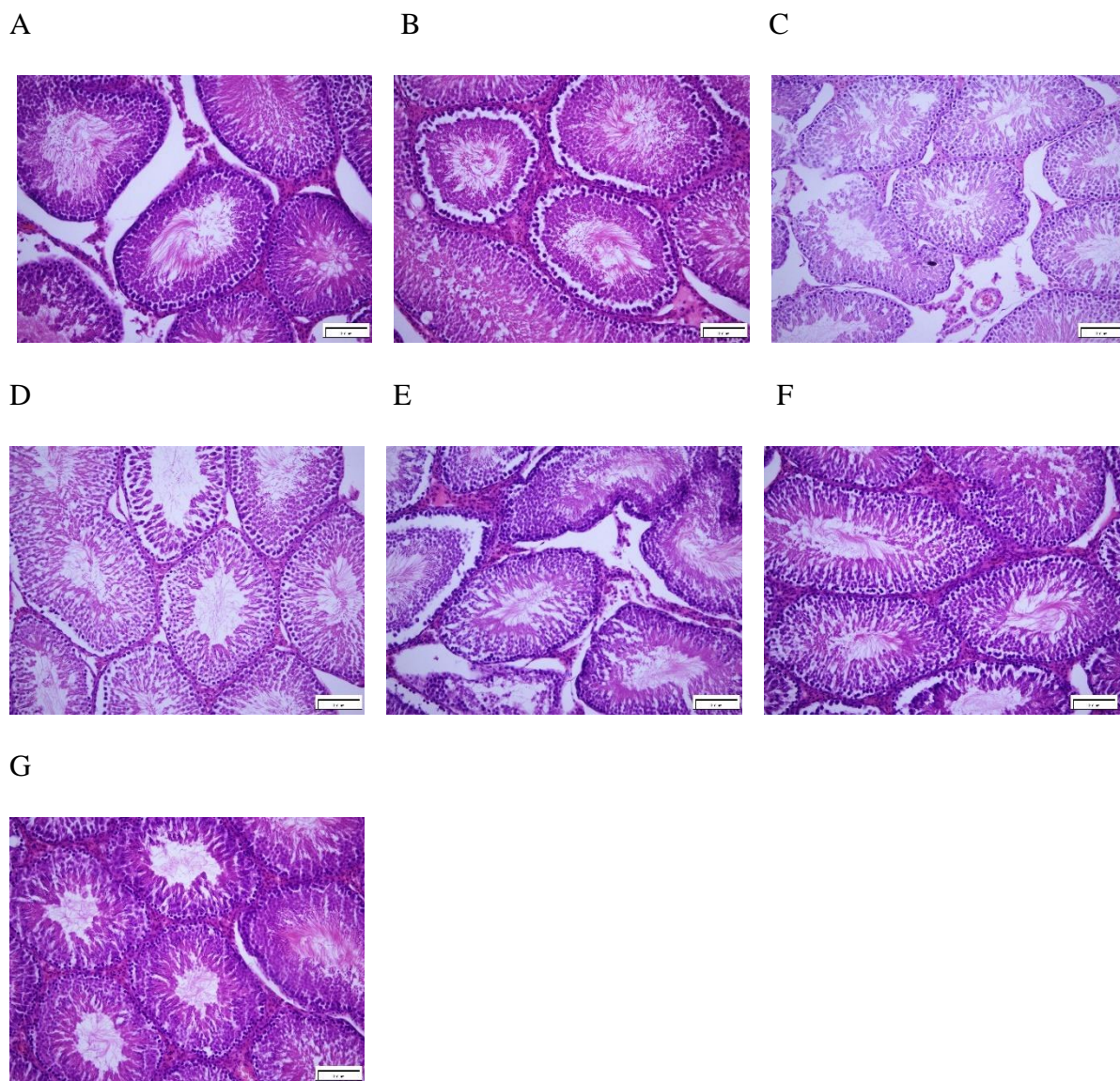
**Tabela 35.** Uticaj rastućih doza olova na nivoe bioelemenata u testisima pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

Metal ( $\mu\text{g/g}$ )		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
Cu	SV	0,37	<b>1,38***</b>	<b>1,24***</b>	<b>1,13***</b>	<b>1,26***</b>	<b>1,03***</b>	<b>1,303***</b>
	SD	0,19	0,16	0,40	0,26	0,16	0,19	0,19
Zn	SV	21,60	23,77	<b>23,32*</b>	<b>24,78*</b>	<b>24,39*</b>	<b>24,04*</b>	<b>23,70*</b>
	SD	1,04	1,73	0,39	1,02	2,08	0,91	1,19
Fe	SV	14,36	16,99	13,51	14,58	14,03	17,42	13,82
	SD	2,65	2,79	2,87	2,56	1,47	3,50	1,97
Mn	SV	6,90	<b>0,81***</b>	<b>0,85***</b>	<b>1,31***</b>	<b>0,27***</b>	<b>1,75***</b>	<b>0,41***</b>
	SD	2,71	0,85	2,03	0,88	0,48	1,04	0,44

Srednja vrednost (SV), standardna devijacija (SD); \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , u odnosu na kontrolnu grupu; ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test

#### 4.9.2. Patohistološke promene

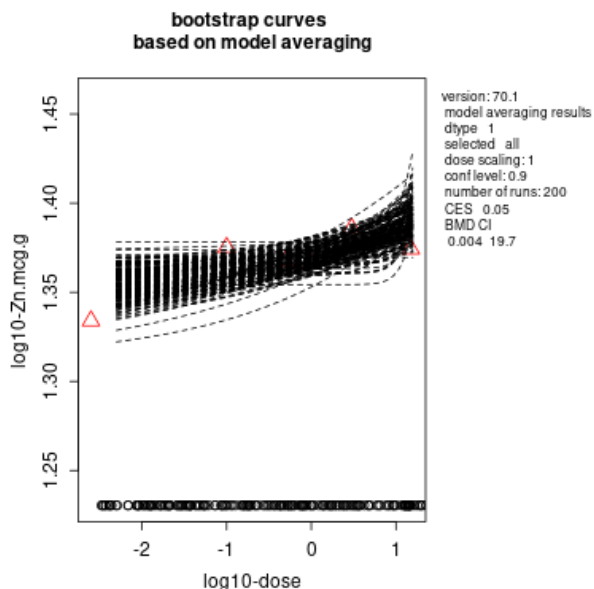
Histološki pregled tkiva testisa pokazao je da nema promena u strukturi testisa kod pacova tretiranih olovom u odnosu na kontrolnu grupu pacova (Slika 17).



**Slika 17.** Histološki prikaz testisa u (A) kontrolnoj, (B) Pb0.1, (C) Pb0.5, (D) Pb1, (E) Pb3, (F) Pb7, (G) Pb15 grupi pacova tretiranih subakutno rastućim dozama olova, dobijenih uz upotrebu *Haematoxylin-Eosin* bojenja

### 4.9.3. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u testistima

Modelovanjem odnosa doza-odgovor dobijena je dozna zavisnost eksterno primenjenih doza olova i nivoa Zn (BMD: 0,004 mg Pb/kg t.m./dan) pri čemu je trend efekta bio pozitivan (Slika 18). U svim ostalim slučajevima nije dobijena dozna zavisnost. Detaljan prikaz modela i parametara modelovanja dat je u Prilogu 1 Tabeli 8, dok je prikaz BMD vrednosti dat u Tabeli 36.



**Slika 18.** Grafički prikazi modelovanja odnosa eksternih doza olova i nivoa Zn u testisima pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

**Tabela 36.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksternih doza olova-odgovor za efekte olova u testisima pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (mg Pb/kg)	BMDU (mg Pb/kg)	Trend
Zn	0,004	19,7	+

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), cink (Zn)

## 4.10. Efekti na slezinu

### 4.10.1. Nivoi bioelemenata

Analizom rezultata dobijenih merenjem bioelemenata pokazano je da tretman olovom nije doveo do razlike u nivoima Cu, Zn, Mn i Fe u slezini pacova nakon 28 dana izlaganja (Tabela 37).

**Tabela 37.** Uticaj rastućih doza olova na nivoe bioelemenata u slezini pacova nakon oralne subakutne ekspozicije

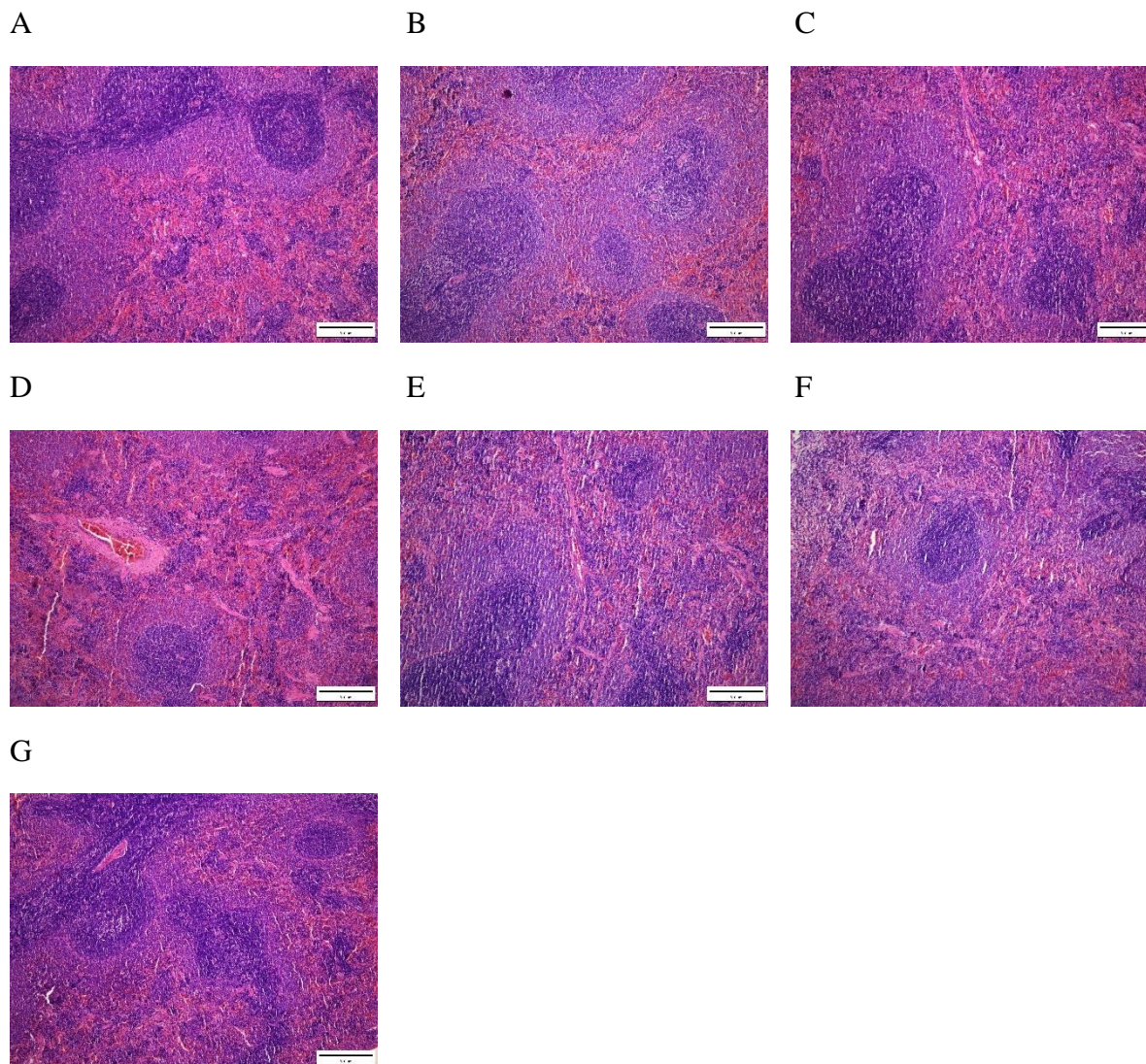
Metal ( $\mu\text{g/g}$ )		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
Cu <sup>b</sup>	medijana	1,09	1,15	1,04	1,05	1,06	0,93	1,25
	opseg	0,32-1,39	0,83-1,43	0,70-1,63	0,49-1,16	0,90-1,81	0,19-1,89	0,87-1,61
Zn <sup>a</sup>	SV	20,50	20,32	20,38	19,60	19,14	20,31	19,47
	SD	1,265	1,321	1,286	0,9052	1,529	1,615	2,547
Fe <sup>b</sup>	medijana	138,7	133,7	123,5	128,0	125,8	151,4	131,0
	opseg	123,0-171,9	90,29-153,4	117,5-133,3	111,1-182,0	113,8-157,6	113,9-162,8	112,7-177,3
Mn <sup>a</sup>	SV	20,50	20,32	20,38	19,60	19,14	20,31	19,47
	SD	1,265	1,321	1,286	0,9052	1,529	1,615	2,547

Srednja vrednost (SV), standardna devijacija (SD), <sup>a</sup>ANOVA i *Fisher's LSD* post-hoc test odnosno <sup>b</sup>*Kruskal-Wallis* i *Mann-Whitney U* post-hoc test



#### 4.10.2. Patohistološke promene

Histološkim pregledom tkiva slezine pacova tretiranih grupa nije uočena značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu. Preseci tkiva slezine prikazani su na Slici 19.



**Slika 19.** Histološki prikaz slezine u (A) kontrolnoj, (B) Pb0.1, (C) Pb0.5, (D) Pb1, (E) Pb3, (F) Pb7, (G) Pb15 grupi pacova tretiranih subakutno rastućim dozama olova, dobijenih uz upotrebu *Haematoxylin-Eosin* bojenja

#### 4.10.3. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u slezini

Modelovanjem odnosa eksternih i internih doza-odgovor nije dobijena dozna zavisnost za efekte olova u slezini.

## 4.11. Efekti na femur

### 4.11.1. Nivoi bioelemenata

U svim grupama tretiranim olovom je primećeno statistički značajno povećanje nivoa Cu. U slučaju Zn, Mn i Fe, tretman olovom nije doveo do promena u nivoima (Tabela 38).

**Tabela 38.** Uticaj rastućih doza olova na nivoe bioelemenata u femuru pacova nakon subakutne oralne ekspanzije

Metal ( $\mu\text{g/g}$ )		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
Cu	SV	0,1475	<b>0,7807**</b>	<b>0,8133**</b>	<b>0,7038**</b>	<b>0,7489**</b>	<b>0,9200***</b>	<b>0,9944***</b>
	SD	0,1160	0,1766	0,1368	0,2399	0,2227	0,2286	0,3192
Zn	SV	104,0	88,96	101,6	91,40	95,95	101,1	95,12
	SD	8,669	6,511	10,88	18,80	9,969	6,278	10,78
Fe	SV	40,15	35,32	37,98	30,83	30,82	30,52	35,53
	SD	9,43	5,40	7,01	7,81	5,48	5,85	7,41
Mn	SV	3,13	2,45	1,4	2,66	2,22	2,90	2,94
	SD	1,39	0,92	0,38	1,17	1,10	0,63	2,21

\* † ‡ § #  $\wedge p < 0,05$ ; \* \* †† ‡ ‡§§ ##  $\wedge\wedge p < 0,01$ ; \*\*\* ††† ‡ ‡‡§§§ ###  $\wedge\wedge\wedge p < 0,001$ ; u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; <sup>a</sup>ANOVA i Fisher's LSD post-hoc test

### 4.11.2. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u femuru

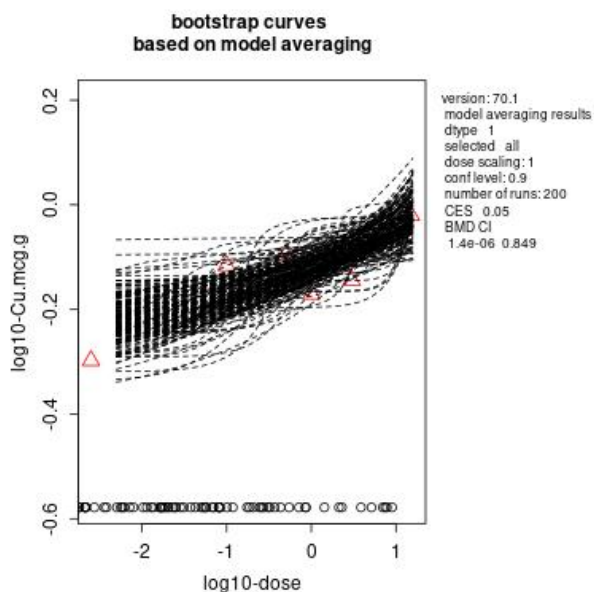
Modelovanjem odnosa eksterne doze i odgovora, dobijena je dozna zavisnost za nivoe Cu (BMDL:  $1,43e-06$  mg Pb/kg t.m./dan) i Fe (BMD:  $1,94e-06$  mg Pb/kg t.m./dan) u femuru. Grafički prikaz je dat na Slici 20, dok je pregled BMD dat u Tabeli 39.

Modelovanjem odnosa interne doze (BLL,  $\mu\text{g/dL}$ ) i odgovora, dobijena je dozna zavisnost za nivoe Cu (BMD:  $1,66e-06$   $\mu\text{g Pb/dL}$ ). Grafički prikaz je dat na Slici 21, dok je pregled BMD dat u Tabeli 40.

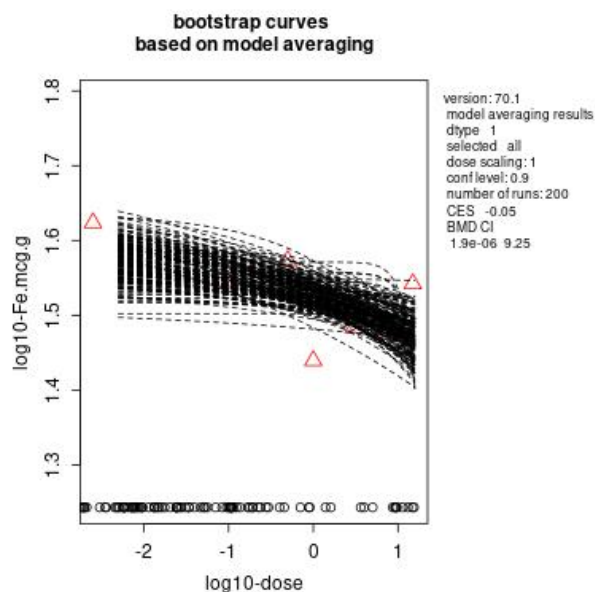
Modelovanjem odnosa interne doze (nivo Pb u femuru, ng/g) i odgovora, dobijena je dozna zavisnost za nivoe Cu (BMD:  $2,56e-06$  ng Pb/g). Grafički prikaz je dat na Slici 22, dok je pregled BMD dat u Tabeli 41.

Detaljan prikaz modela i parametara dat je u Prilogu 1 Tabeli 9.

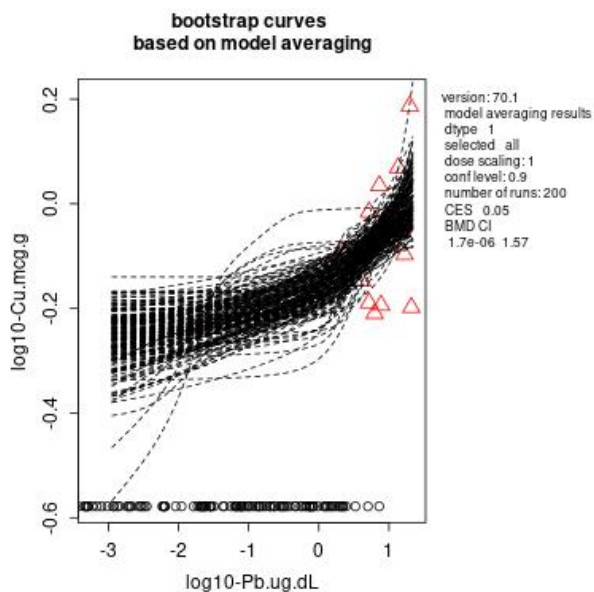
A



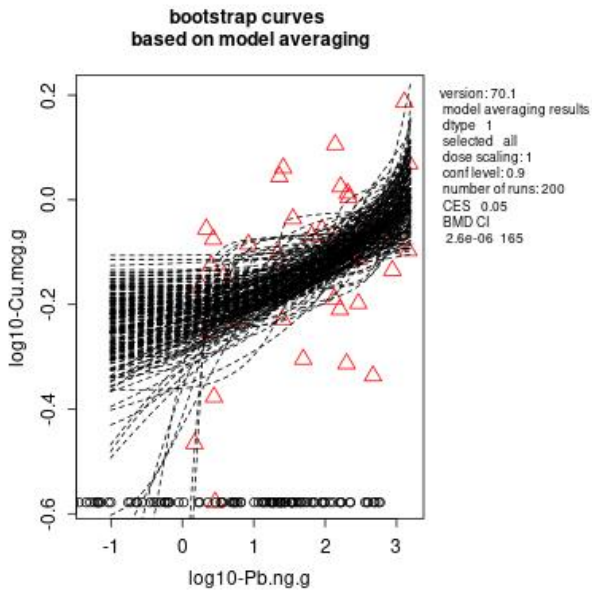
B



**Slika 20.** Grafički prikazi modelovanja odnosa internih doza olova (mg Pb/kg t.m./dan) i nivoa Cu (A) i Fe (B) u femuru pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.



**Slika 21.** Grafički prikazi modelovanja odnosa internih doza olova (BLL,  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) i nivoa Cu u femuru pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.



**Slika 22.** Grafički prikazi modelovanja odnosa internih doza olova (ng Pb/g femura) i nivoa Cu u femuru pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

**Tabela 39.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksternih doza olova-odgovor za efekte olova u femuru pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (mg Pb/kg t.m./dan)	BMDU (mg Pb/kg t.m./dan)	Trend
Cu	1,4e-06*	0,849	+
Fe	1,9e-06	9,25	-

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), bakar (Cu), gvožđe (Fe)

**Tabela 40.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa internih doza olova (BLL, µg/dL)-odgovor za efekte olova u femuru pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (µg Pb/dL)	BMDU (µg Pb/dL)	Trend
Cu	1,7e-06	1,57	+

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), bakar (Cu)

**Tabela 41.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa internih doza olova (ng Pb/g femura)-odgovor za efekte olova u femuru pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (ng Pb/g)	BMDU (ng Pb/g)	Trend
Cu	2,6e-06	165	+

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), bakar (Cu)

## 4.12. Efekti na pankreas

### 4.12.1. Nivoi bioelemenata

U grupama tretiranim dozama višim od 1 mg Pb/kg t.m./dan primećen je trend rasta nivoa Zn u pankreasu (Tabela 42). Nivo ostalih bioelemenata nije se menjao u odnosu na kontrolnu vrednost.

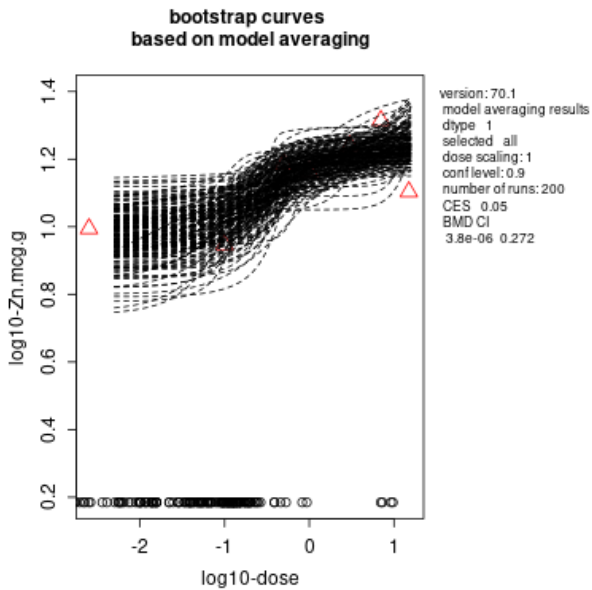
**Tabela 42.** Uticaj rastućih doza olova na nivo bioelemenata u pankreasu pacova nakon subakutne oralne ekspozicije

Metal ( $\mu\text{g/g}$ )		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
Cu	SV	0,7873	0,6060	0,8870	0,8040	1,127	0,9917	0,9485
	SD	0,3106	0,4573	0,2643	0,3408	0,4398	0,2754	0,4236
Zn	SV	11,82	11,03	15,50†	14,70	<b>17,58**††</b>	<b>19,94**††† §</b>	<b>17,15*††</b>
	SD	3,396	5,608	2,515	2,150	2,979	2,955	1,584
Fe	SV	22,54	19,13	23,45	19,11	24,51	24,25	21,92
	SD	16,13	4,845	6,444	2,679	8,628	2,830	6,067
Mn	SV	2,271	2,299	1,230	2,608	2,623	5,040	2,289
	SD	3,125	1,703	0,6054	1,335	1,745	1,119	1,509

Srednja vrednost (SV), standardna devijacija (SD); \* † ‡ § #  $\wedge p < 0,05$ ; \* \* †† ‡ ‡§§ ##  $\wedge\wedge p < 0,01$  u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; ANOVA i Fisher's LSD post-hoc

### 4.12.2. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u pankreasu

Modelovanjem odnosa eksternih doza olova (mg Pb/kg t.m./dan) i odgovora dobijena je dozna zavisnost za nivo Zn u pankreasu, BMD:  $3,84e-06$  mg Pb/kg t.m./dan (Slika 23). Modelovanjem odnosa internih doza olova-odgovor nije dobijena dozna zavisnost za efekte olova u pankreasu. Detaljan prikaz modela i parametara je prikazan u Prilogu 1 Tabeli 10. Prikaz BMD doza je dat u Tabeli 43.



**Slika 23.** Grafički prikazi modelovanja odnosa eksternih doza olova (mg Pb/kg t.m./dan) i nivoa Zn u pankreasu pacova tretiranih sa šest različitih doza olova tokom 28 dana. Za proračune je korišćen softver PROASTweb 70.1 uz upotrebu metode usrednjavanja modela sa 200 iteracija. Crveni trouglovi predstavljaju medijane, dok crne tačke predstavljaju dobijene BMD za svaku iteraciju.

**Tabela 43.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksternih doza olova-odgovor za efekte olova u pankreasu pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	BMDL (mg Pb/kg t.m./dan)	BMDU (mg Pb/kg t.m./dan)	Trend
Zn	3,8e-06	0,272	+

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), cink (Zn)

## 4.13. Efekti na timus

### 4.13.1. Nivoi bioelemenata

Tretman olovom u svim grupama je doveo do sniženja nivoa Fe (Tabela 44). Sa druge strane nije bilo statistički značajne razlike u nivoima Cu i Zn. Nivoi Mn su bili ispod limita kvantifikacije korišćene analitičke metode.

**Tabela 44.** Uticaj rastućih doza olova na nivo bioelemenata u timusu pacova nakon subakutne oralne eksozicije

Metal ( $\mu\text{g/g}$ )		Doza (mg Pb/kg t.m./dan)						
		0 (kontrola)	0.1	0.5	1	3	7	15
Cu <sup>a</sup>	SV	0,63	0,32	0,46	0,39	0,44	0,38	0,30
	SD	0,31	0,21	0,27	0,14	0,29	0,21	0,091
Zn <sup>b</sup>	medijana	15,34	15,22	14,58	17,09	16,50	15,53	16,46
	opseg	13,93-17,51	14,96-15,36	13,88-22,95	16,52-18,07	14,48-18,38	14,44-18,93	16,80
Fe <sup>a</sup>	SV	27,52	<b>19,76**</b>	<b>19,64***</b>	<b>20,26**</b>	23,56	<b>18,89***#</b>	<b>22,61*</b>
	SD	3,15	1,98	4,89	2,43	1,35	3,86	3,57

\* † ‡ § #  $\wedge p < 0,05$ ; \* \* †† ‡ ‡§§ ##  $\wedge\wedge p < 0,01$ ; \*\*\* ††† ‡ ‡§§§ ###  $\wedge\wedge\wedge p < 0,001$ ; u odnosu na 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 7 grupu, redom; <sup>a</sup>ANOVA i *Fisher's LSD* post-hoc test odnosno <sup>b</sup>*Kruskal-Wallis* i *Mann-Whitney U* post-hoc test

### 4.13.2. Modelovanje odnosa doza-odgovor za efekte olova u timusu

Modelovanjem odnosa doza-odgovor nije dobijena dozna zavisnost za efekte olova u timusu.



#### 4.14. Kritični toksični efekti

U tabeli 45 su navedeni kritični toksični efekti u ispitivanim organima/sistemima organa. Kritični toksični efekat za krv je smanjenje nivoa Cu. Za endokrini sistem sniženje nivoa testosterona predstavlja kritični toksični efekat. U slučaju jetre kritični toksični efekat je smanjenje nivoa Cu. U bubrezima inhibicija SOD se može smatrati kritičnim efektom. U srcu kritični toksični efekat je povećanje vrednosti MDA što odražava oksidativno oštećenje lipida. U mozgu, kritični toksični efekat je povećanje vrednosti TOS, tj. povišene vrednosti prooksidanasa. Povećanje vrednosti Zn u testisima i pankreasu predstavlja kritičan efekat. Povišene vrednosti Cu u femuru indukovane olovom predstavljaju kritičan toksični efekat u ovom organu.

Najniža BMDL vrednost dobijena u studiji iznosi  $1,07e-06$  mg Pb/kg t.m./dan za efekat smanjenja nivoa testosterona u serumu pacova. Stoga, smanjenje nivoa testosterona indukovano olovom predstavlja kritični toksični efekat studije.

Sledeći najosetljiviji efekti jesu indukcija SOD u bubrezima, povećanje nivoa Cu u femuru i sniženje Cu u krvi. Zatim, povećanje MDA u srcu, povećanje TOS u mozgu, povećanje Zn u pankreasu i sniženje Cu u jetri. Navedeni efekti su bili reda veličine  $e-06$  mg Pb/kg t.m./dan. Dodatno, povišene vrednosti Zn u testisima su najmanje osetljivi toksični efekti.

**Tabela 45.** Kritični toksični efekti olova i BMD vrednosti dobijene modelovanjem eksterne doze-odgovora

Ciljni organ/sistem	Parametar	Trend	BMDL (mg Pb/kg t.m./dan)
Krv	Cu	-	$1,38e-06$
<b>Endokrini sistem</b>	<b>Testosteron</b>	<b>-</b>	<b><math>1,07e-06^*</math></b>
Jetra	Cu	-	$2,66e-06$
Bubrezi	SOD	-	$1,27e-06$
CNS	TOS	+	$4,49e-06$
Srce	MDA	+	$2,2e-06$
Slezina	/	/	/
Testisi	Zn	+	0,004
Femur	Cu	+	$1,4e-06$
Pankreas	Zn	+	$3,8e-06$
Timus	/	/	/

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), centralni nervni sistem (CNS), bakar (Cu), superoksid dismutaza (SOD), malondialdehid (MDA), totalni oksidativni status (TOS), cink (Zn), \* BMD studije

U slučaju modelovanja internih doza olova (BLL)-odgovor, najniža dobijena BMDL iznosi  $1,7e-06$   $\mu$ g Pb/dL za efekat olova na povećanje koncentracije Cu u femuru (Tabela 46). *Benchmark* doze koje su bile istog reda veličine su dobijene za efekte povećanja AOPP u krvi, sniženje nivoa testosterona i povećanje vrednosti nivoa superoksid anjon radikala u mozgu. Parametri koji su u oba slučaja dali odnos doza-odgovor pri modelovanju internih i eksterih doza su Cu u jetri sa trendom smanjenja i Cu u femuru sa trendom povećanja nivoa.

**Tabela 46.** Kritični toksični efekti olova i BMD vrednosti dobijene modelovanjem interne doze (BLL,  $\mu\text{g/dL}$ )-odgovora

Ciljni organ/sistem	Parametar	Trend	BMDL (BLL, $\mu\text{g Pb/dL}$ )
Krv	AOPP	+	3,69e-06
Endokrini sistem	Testosteron	-	1,82e-06
Jetra	Cu	-	1,39e-05
Bubrezi	/	/	/
CNS	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	3,05e-06
Srce	Cu	+	0,081
Slezina	/	/	/
Testisi	/	/	/
<b>Femur</b>	<b>Cu</b>	<b>+</b>	<b>1,7e-06*</b>
Pankreas	/	/	/
Timus	/	/	/

Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), centralni nervni sistem (CNS), bakar (Cu), superoksidni anjon (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), \* BMD studije

## 5. Diskusija

### 5.1. Toksični efekti olova na krv

Nakon apsorpcije, olovo dospeva u krvotok gde se u najvećem procentu vezuje za proteine crvenih krvnih zrnaca, čemu doprinosi i osobina olova da poseduje visok afinitet za ALAD, enzim koji katalizuje reakciju između dva ALA molekula pri čemu nastaje porfobilinogen, među produkt sinteze hema (17,65). Kinetika olova umnogome zavisi od prisustva proteina u tkivima za koje se olovo vezuje visokim afinitetom (137–139), a koji mogu uticati na apsorpciju i distribuciju olova (124,140–143). U epidemiološkim studijama, prilikom procene ekspozicije olovu, prednost se daje internim procenama izloženosti u odnosu na eksterne. Najčešće se sprovodi merenju olova u krvi kao jednostavna i lako dostupna metoda pri čemu koncentracija u krvi odražava skorašnju izloženost olovu. Druga mogućnost procene izloženosti olovu je merenje olova u kostima neinvazivnom metodom pomoću X-zraka, pri čemu dobijena vrednost odražava telesno opterećenje olovom, imajući u vidu da su kosti mesto deponovanja olova (144). U ovoj studiji, izloženost olovu tokom 28 dana navedenim dozama, dovela je do akumulacije olova u krvi i tkivima. Najviša vrednost olova je zabeležena u krvi pacova tretiranih najvišom dozom ( $16,1 \pm 3,8 \mu\text{g/dL}$ ), dok su ostale vrednosti bile niže i iznosile su kod najniže dozne grupe ( $1,38 \pm 2,24 \mu\text{g/dL}$ ). Dobijeni opseg vrednosti BLL kod tretiranih pacova odgovara vrednostima BLL u krvi opšte populacije u epidemiološkim studijama (11,126,145–148). Sličan opseg koncentracija olova u krvi pacova zabeležen je u studiji sprovedenoj od strane Ruiz i sar (149), gde su životinje tretirane olovo-acetatom kroz vodu za piće u koncentracijama od 125, 250 i 500 ppm tokom 14 dana, a koncentracije olova u krvi su iznosile od 15-25  $\mu\text{g/dL}$ .

U ovom radu, subakutna izloženost ispitivanim dozama olova, dovela je do promena u hematološkim parametrima gde je uočeno sniženje nivoa hematokrita, hemoglobina i srednjeg volumena eritrocita koje je najizraženije u najvišoj doznoj grupi. Modelovanjem odnosa doza-odgovor dobijena je dozna zavisnost za nivo hemoglobina gde je BMDL iznosila 6,41 mg Pb/kg t.m./dan. Uočene promene su očekivane i mogu biti potkrepljene brojnim studijama o štetnim efektima olova na hematološki sistem (68,145,147,150). Dobijeni rezultati su u skladu sa studijom koju su sproveli Dewanjee i sar. (2013) gde je uočeno smanjenje broja crvenih krvnih zrnaca kod pacova *Wistar* soja pri niskom nivou izloženosti (5 mg olovo-acetata/kg t.m./dan) tokom 40 dana - perioda oralnog izlaganja (151).

Olovo ima sposobnost da izazove oksidativni stres pomoću dva nezavisna mehanizma, povećavajući proizvodnju slobodnih radikala i inhibirajući odbrambene mehanizme od oksidativnog stresa. U krvi, inhibicija ALA-D od strane olova dovodi do inhibicije hem sinteze i proizvodnje slobodnih radikala: superoksid radikala anjona, hidroksil radikala i vodonik-peroksida (56,152). U ovoj studiji ALA-D nije određivana usled vremenskog ograničenja studije (28 dana). Superoksid radikala anjon se proizvodi u fiziološkim uslovima u mnogim biološkim reakcijama, dok antioksidativni enzim SOD igra ključnu ulogu u zaštiti ćelija od njegovih toksičnih efekata (153). Dobijeni rezultati su pokazali inhibiciju SOD u svim tretiranim grupama što se može objasniti direktnom inhibicijom ovog enzima od strane olova ali i sposobnošću olova da zameni metale koji služe kao kofaktori enzima (56,152,154). Modelovanjem odnosa doza-odgovor dobijeni BMDL je bio veoma nizak ( $0,5 \mu\text{g/kg t.m./dan}$ ) što ukazuje da promena aktivnosti SOD u krvi može biti osetljiv indikator izloženosti olovu. Superoksid dismutaza je enzim antioksidativne zaštite čija fiziološka funkcija zavisi od Cu i Zn (155). Smanjenje  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , kao i smanjenje SOD, je bilo dozno zavisno. Smanjenje nivoa  $\text{O}_2^{\cdot-}$  u ovom eksperimentu može biti povezano sa  $\text{O}_2^{\cdot-}$  inaktivacijom u reakciji sa

azotnim oksidom pri čemu nastaje visoko reaktivno jedinjenje peroksinitrit, koji reaguje sa ostacima tirozina u proteinima (17). Međutim, potrebno je sprovesti dalja ispitivanja kako bi se dokazala ova pretpostavka.

Interakcija između olova i esencijalnih katjona je još jedan važan mehanizam toksičnosti olova (60,156). Dobijeni rezultati su pokazali da tretman olovom dovodi do sniženja nivoa Cu u krvi čak i u grupi pacova tretiranih najnižom dozom. Slično zapažanje dobijeno je u studiji koju su sprovedli Ademuyiwa i sar. (124) gde je izlaganje 200 ppm Pb (nizak nivo) putem vode za piće tokom 12 nedelja dovelo do nižih nivoa Cu u krvi kod pacova u poređenju sa kontrolom. Ovaj efekat se može objasniti mogućom preraspodelom Cu u druga tkiva. Smanjenje nivoa Cu je zavisilo od doze i procenjeni BMDL je bio veoma nizak (1,4 ng Pb/kg t.m.) pokazujući nivo Cu u krvi kao mogući osetljivi parametar toksičnosti olova. Nivoi Zn, esencijalnog katjona koji ima brojne fiziološke uloge, takođe je bio predmet istraživanja u ovoj studiji. Modelovanje odnosa doza-odgovor, pokazano je da je promena Zn dozno-zavisna sa izračunatom BMDL 0,002 mg Pb/kg t.m./dan. Povišeni nivoi Zn u krvi u svim grupama koje su primale doze veće od 1 mg Pb/kg t.m./dan može biti posledica zamene Zn olovom u proteinima koji vezuju Zn, te se višak oslobođenog Zn preraspodeljuje u krv (157,158). Za razliku od rezultat dobijenih u ovoj studiji gde su ispitivane niske doze olova, u drugim studijama pri ekspoziciji višim dozama utvrđeno je smanjenje nivoa Zn u krvi (60,159). U ovoj studiji uočeni su suprotni trendovi nivoa Cu i Zn koji se mogu objasniti kompetitivnom konkurencijom Cu i Zn za crevne i ćelijske transportere za ova dva metala (160).

Važan cilj ove studije bio je da se pomoću *Benchmark* analize utvrdi odnos doza-odgovor za sve ispitivane parametre i da se odredi BMD za svaki od njih. Ova studija je do sada prva koja je izučavala odnos doza-odgovor za ispitivane parametre u krvi pacova nakon subakutnog izlaganja niskim nivoima olova sa ciljem da se otkrije polazna tačka ispitivanih parametara. U slučaju eksternog odnosa doza-odgovor, najniži BMDL je bio za nivo Cu, pokazujući da je pri 5% referentnog odgovora olova, BMD za nivo Cu u krvi 1,4 ng Pb/kg t.m. Promena aktivnosti SOD je pronađena kao sledeći osetljivi efekat toksičnosti olova. Najviši BMDL je utvrđen za nivo hemoglobina. U slučaju modelovanja interne doze-odgovora, najniži BMDL je bio za AOPP. Iako je procenjeni BMDI bio širok, BMDL za ovu promenu je ispod nivoa od 10 µg Pb/dL. Drugi najniži BMDL je dobijen za nivo Fe. Analogno eksternoj dozi, najviši BMDL je primećen za nivo hemoglobina, ali je uočena vrednost i dalje bila u opsegu BLL publikovane u populaciji izloženoj životnoj sredini (161–163).

## 5.2. Toksični efekti olova na jetru

Promene u aktivnostima enzima jetre zabeležene su u brojnim studijama na eksperimentalnim životinjama, ali sa primenjenim znatno većim dozama olova nego što su ispitivane u ovom eksperimentu. U studiji koju su sprovedli Alia i sar. hronična izloženost olovu (50 mg/L ~ 5mg Pb/kg t.m./dan) dovela je do povišene vrednosti alanin aminotransferaze kao i aspartat aminotransferaze u serumu ženki pacova nakon perioda izlaganja od 40 dana (164). Druga studija na ženkama pacova izloženih hronično dozama olova od 30 i 100 mg Pb/kg t.m. tokom 10, 20, 30, 40, 50 i 60 dana takođe je pokazala da olovo indukuje enzime jetre kao rezultat hepatotoksičnog efekta (165). U ovoj disertaciji dobijeni rezultati ukazuju na smanjenje aktivnosti alanin aminotransferaze pri najvišoj dozi, ali zbog širokog spektra fizioloških vrednosti i visokih standardnih devijacija, ova promena bi se mogla zanemariti (166,167). Pored toga, nije promenjena ni aktivnost drugih enzima jetre, aspartat transaminaze i alkalne fosfataze, te se može zaključiti da pri navedenim dozama i periodu izloženosti olovo nije dovelo do indukcije enzima jetre.

Povišene vrednosti triglicerida su zabeležene u grupi tretiranoj sa 1 mg Pb/kg t.m./dan. Ovo zapažanje se može objasniti sposobnošću olova da modifikuje funkciju enzima uključenih u metabolizam lipida u jetri vodeći ka poremećaju biosinteze žučnih kiselina koja je neophodna za eliminaciju holesterola iz organizma (168). Trend smanjenja nivoa ukupnog holesterola i HDL holesterola primećen je u svim tretiranim grupama. Slični rezultati vrednosti holesterola su dobijeni u studiji na pacovima izloženim 35 mg Pb/kg t. m. nedeljno (169). Modelovanje odnosa doza-odgovor je pokazalo da je BMDL za ukupni holesterol, pri 5% BMR, bio 0,004 mg Pb/kg t.m./dan, a za HDL, BMDL vrednost je iznosila 0,094 mg Pb/kg t.m./dan. U epidemiološkim studijama kod populacija izloženih olovu na radnom mestu, povišene vrednosti BLL dovode se u vezu sa povišenim ali i sa sniženim vrednostima nivoa HDL holesterola (170,171). U studiji koju su sprovedi Lu i sar. (2020) BLL kod dece izložene olovu povezan je sa smanjenjem nivoa HDL i višim sistolnim krvnim pritiskom (172). Imajući u vidu da HDL holesterol ima zaštitno dejstvo u procesu ateroskleroze te ima značajnu ulogu u regulaciji kardiovaskularnog pritiska (173), promena u vrednostima HDL može biti jedan od mehanizama koji doprinosi nastanku visokog krvnog pritiska izazvanog olovom i povećanju rizika od kardiovaskularnih bolesti povezanih sa izloženošću olovu (171,174).

U predstavljenoj studiji, tretman olovom je doveo do dozno-zavisnog smanjenja Cu u jetri, a dobijene vrednosti BMD su bile:  $2,7e-06$  mg Pb/kg t.m./dan za eksternu dozu,  $1,4e-05$   $\mu$ g Pb/dL za internu dozu (BLL) i  $2,4e-06$  ng Pb/g za nivo olova u jetri posmatrane kao doza. Dobijena dozno-zavisnost na sva tri nivoa definitivno potvrđuje da olovo ima neosporan uticaj na nivo Cu u jetri. Cu predstavlja bitnu komponentu različitih enzima koji su potrebni za održavanje fizioloških funkcija u organizmu, te se njegov deficit i suficit može manifestovati različitim kliničkim znacima. Jetra, u normalnim uslovima, efikasno održava ravnotežnu koncentraciju Cu aktivirajući procese fiziološke regulacije (175,176). Štaviše, Cu je ključan za funkciju nekoliko enzima kao kofaktor: SOD, mitohondrijalne monoamin oksidaze, triptofon-2,3-dioksigenaze, citohrom c oksidaze, ceruloplazmina i hefestina (175,176). Višak bakra iz organizma se izlučuje preko žučnih puteva i fecesa. Tretman olovom izaziva nedostatak bakra u studijama na eksperimentalnim životinjama (177), a i kod izložene populacije (178). Sa druge strane suplementacija Cu u studijama na životinjama pokazala je protektivne efekte pri izloženošću olovu (179).

Drugi važan mehanizam toksičnosti olova je indukcija oksidativnog oštećenja u različitim tkivima (56). Dobijeni rezultati su pokazali indukciju SOD enzima i povećanje nivoa AOPP u jetri koje je zavisno od doze, pri čemu je dobijena BMDL iznosila 0,00025 mg/kg t.m./dan. Uznapredovali produkti oksidacije proteina su umreženi proteinski proizvodi nastali kao proizvod interakcije slobodnih radikala i proteina. Godine 1996. AOPP su prvi put identifikovani u plazmi hroničnih uremičnih pacijenata kao novi indikatori oksidativnog stresa (134). AOPP se transportuju proteinima plazme i vezuju za receptore za HDL klase B tipa I, tako da su klasifikovani kao antagonisti HDL receptora (180). Indukcija jetrenog SOD enzima u prikazanoj studiji može biti zaštitni mehanizam aktiviran kao odgovor na indukciju oksidativnog stresa, imajući u vidu da proizvodnja slobodnih radikala može stimulisati aktivnost antioksidativnih enzima (181). Slično rezultatima ove studije, Berrahal et al. su u svom eksperimentu na pacovima (40 dana, 10,39 mg Pb/kg t.m./dan) pokazali da tretman olovom indukuje povećanje aktivnosti SOD u jetri i smanjenje aktivnosti SOD u bubrezima (182). U studijama gde su korišćene više doze olova, dokumentovana je inhibicija enzima SOD, katalaze i glutation peroksidaze. Na primer, u studiji na *Wistar* pacovima gde je olovo primenjivano intraperitonealno u dozi od 20 mg/kg t.m./dan tokom 5 dana došlo je do inhibicije enzima SOD u jetri (183). Druga studija na pacovima *Wistar* soja tretiranih olovom (100 mg/kg t.m./dan, *per os*, 60 dana) takođe je rezultirala inhibicijom aktivnosti enzima SOD, CAT i GSH, dok su nivoi MDA bili povišeni u jetri, u poređenju sa netretiranom grupom (184).

### 5.3. Toksični efekti olova na bubrege

U brojnim humanim i animalnim studijama izlaganje olovu je povezano sa povišenim markerima nefrotoksičnosti u serumu i sa razvojem hronične bubrežne insuficijencije (146,185–188). U ovoj studiji tretman sa 7 mg Pb/kg t.m./dan je rezultirao značajno povišenim nivoima mokraćne kiseline, uree, Na i K što može ukazivati na oštećenje funkcije bubrega. Mokraćna kiselina, urea i kreatinin su metabolički proizvodi koji se izlučuju iz organizma putem urina (125). Kao rezultat toga, ovi biohemijski markeri su široko korišćeni u praksi za dijagnozu bubrežne insuficijencije jer se usled oštećenja bubrega njihovi nivoi u krvi rastu. Promene u nivou kreatinina su se pokazale kao najmerodavniji prognostički parametar za bubrežnu insuficijenciju (125,189). Modelovanjem odnosa doza-odgovor uočen je trend pada nivoa kreatinina i mokraćne kiseline u serumu. U slučaju odnosa interne doze-odgovor, u ovoj studiji je utvrđen trend smanjenja kreatinina i uree. Mokraćna kiselina je važan prirodni lipofilni antioksidans koji štiti krv i CNS od reaktivnih vrsta kiseonika, azot-oksida i jona gvožđa (190). Takođe je uključena u procese neurotransmisije u CNS i pripisuje joj se neuroprotektivni značaj. Ovo je posebno važno imajući u vidu da je najvažniji toksični efekat olova oštećenje funkcije mozga i poremećaj učenja i pamćenja (191,192). Međutim, uočeno smanjenje kreatinina i uree obično ne ukazuje na patološke promene. Ovi parametri imaju širok opseg normalnih vrednosti koje zavise od unosa proteina, hidratacije organizma, katabolizma i eliminacije proteina (167,193).

Izloženost olovu dovodi do značajnih gubitaka bubrežne funkcije s tim da simptomi hroničnog izlaganja olovu često izostaju. Hronična izloženost visokim dozama olova može voditi ka nastanku ireverzibilnih promena u bubrežnom tkivu: intersticijalne fibroze, tubularne atrofije, glomerularne skleroze i na kraju gubitak funkcije bubrega. Hronična izloženost niskim nivoima olova se povezuje sa razvojem gihta i hipertenzije putem bubrežnih i drugih mehanizama (82). Izlučivanje olova iz organizama i njegova sposobnost da se distribuira i akumulira u bubrezima vodi ka ispoljavanju direktnih toksičnih efekata na bubrežno tkivo. Pored osnovnih mehanizama toksičnosti kojima olovo dovodi do nefrotoksičnosti uključeni su i promene u bubrežnim gangliozidima (lipidi plazma membrane koji igraju ulogu u kontroli glomerularne filtracije), promene u bubrežnom vaskularnom tonusu i promene u hormonskom sistemu renin-angiotenzin-aldosteron (17). Nedavna studija Kwon i sar. je pokazala da olovo može delovati nefrotoksično i indukcijom eritrofagocitoze u tubularnim ćelijama što bi značajno moglo povećati nefrotoksičnost (194). U ovoj studiji, niži nivoi Fe u bubrezima su utvrđeni u nekim grupama, što bi moglo biti povezano sa olovo-indukovanom anemijom. Pokazalo se da olovo izaziva mikrocitnu, hipohromnu anemiju nakon produžene izloženost eksperimentalnim životinjama sa trendom snižavanja nivoa crvenih krvnih zrnaca, hemoglobina i Fe ali i nakon kratkog vremena (65). Podaci dobijeni u ovoj studiji su pokazali dozno-zavisno smanjenje aktivnosti SOD bubrega kod životinja tretiranih olovom, sa dobijenim BMDL:  $1,3e-06$  mg Pb/kg t.m./dan. Slično dobijenim rezultatima, u studiji na mužjacima *Wistar* pacova, olovo-acetat (20 mg/kg t.m., *i.p.* 7 dana) je izazvao inhibiciju aktivnosti renalnih antioksidativnih enzima (SOD, katalaze i glutation peroksidaze) (187). Inhibicija renalne SOD je primećena u studiji na *Wistar* pacovima koji su tretirani sa 22,5 mg/kg t.m. olovo-nitrata, tokom 28 dana (195).

## 5.4. Toksični efekti olova na centralni nervni sistem

Interakcije sa neurotransmiterima, koja dovodi do oštećenja funkcije CNS, jedan je od mehanizama neurotoksičnosti izazvane olovom (196). Toksični efekat na holinergički sistem je od posebnog interesa jer se odražava na funkcionalno oštećenje CNS, uključujući poremećaje učenja i kognitivnih sposobnosti (47–49). Poznato je da je prenos acetilholina u CNS odgovoran za usvajanje novih podataka i njihovo skladištenje (51,197). Olovo deluje na prenos acetilholina inhibirajući enzim acetilholinesterazu direktnim vezivanjem za funkcionalne grupe (50). Inhibicija acetilholinesteraze je jedan od mehanizama neurotoksičnosti olova koji je zabeležen u brojnim studijama na životinjama pod različitim dozama, putevima i dužinom izlaganja (50,51,198–201). U prikazanoj studiji, četiri niže doze Pb (0,1, 0,5, 1 i 3 mg Pb/kg t.m./dan) su izazvale inhibiciju aktivnosti acetilholinesteraze koja je bila najizraženija u grupi Pb3, za više od 40% u poređenju sa kontrolom, dok u slučaju viših doza nije došlo do promene aktivnosti acetilholinesteraze. Uočeni rezultati u ovoj studiji mogu biti posledica afiniteta olova za funkcionalne grupe (amino, sulfhidrilna i karboksilna) enzima (50,202) što vodi ka inhibiciji katalitičke funkcije (51,159,203,204). U više različitih studija na eksperimentalnim životinjama je zapaženo da olovo dovodi do oštećenja učenja i pamćenja kod eksperimentalnih životinja povezanih sa disfunkcijom holinergičkog sistema izloženih hemikalijama poznatim kao inhibitori acetilholinesteraze (205,206). Potrebno je sprovesti dalje studije da bi se razumeo dvofazni odgovor u aktivnosti acetilholinesteraze, kako bi se identifikovali i drugi povezani mehanizmi kojima olovo izaziva neurotoksične efekte u slučaju izlaganja niskim dozama.

Jedan od opštih mehanizama kojima olovo deluje toksično u svim organima je indukcija oksidativnog stresa (44,53,153). Slično dobijenim rezultatima, inhibicija aktivnosti SOD u mozgu je primećena u studiji koju je sprovedla Baranowska i sar. (2012) na pacovima izloženim pre i postnatalno olovo-acetatu putem vode za piće u koncentraciji 0,1% (207). U studiji koju su sprovedli Abdulmajeed i sar. (2015), izlaganje 0,2% Pb tokom 28 dana dovelo je do povećanja lokomotorne i istraživačke aktivnosti Wistar pacova i oštećenja pamćenja koja su bila praćena smanjenjem aktivnosti SOD i povišenim nivoima MDA u mozgu (208). Superoksid dismutaza je metaloenzim (zavisan od Cu i Zn) koji katalizuje reakciju dismutacije  $O_2^{\cdot-}$  u kiseonik i vodonik-peroksid. U našoj studiji, inhibicija ovog enzima se može objasniti direktnom interakcijom sa olovom (199), a sledstveno tome se očekuje i povećanje koncentracije  $O_2^{\cdot-}$ . Modelovanjem odnosa doza-odgovor, pokazana je dozna zavisnost za indukciju  $O_2^{\cdot-}$ , TOS i AOPP u mozgu. Najniži izračunati BMDL bio je za TOS ( $4,5e-06$  mg Pb/kg t.m./dan), zatim  $O_2^{\cdot-}$  ( $5,2e-06$  mg Pb/kg t.m./dan) i AOPP ( $0,00082$  mg Pb/kg t.m./dan).

Još jedan neurotoksični mehanizam olova uočen u ovoj studiji bio je poremećaj homeostaze esencijalnih elemenata koji se ogleda u dozno-zavisnom povećanju nivoa Zn sa BMDL vrednošću od  $6,3e-06$  mg Pb/kg t.m./dan. Prihvaćeno je mišljenje da sličnosti između olova i dvovalentnih katjona dovode do interakcija i poremećaja nivoa esencijalnih elemenata u mozgu, kao i u drugim tkivima (60,192). Važno je napomenuti da su i disbalansi nivoa metalnih jona i oksidativni stres povezani sa hiperaktivnim ponašanjem kako u humanim tako i u studijama na eksperimentalnim životinjama (124,206,209,210). Zink je esencijalni katjon koji igra ključnu ulogu u razvoju CNS, neurološkim funkcijama i učestvuje u metabolizmu biogenih amina (60,211–213). Interakcije između olova i Zn mogu se objasniti njihovim sličnostima i sposobnošću olova da oponaša dvovalentne katjone i istisne Zn sa kritičnih molekularnih puteva ili mesta vezivanja za proteine i transportera (27,192,214). Zink je takođe esencijalni metal koji ima ulogu u održavanju oksidativne ravnoteže (215). Dodatno Zn ulazi u sastav SOD enzima kao kofaktor, te doprinosi normalnoj funkciji antioksidativne zaštite (216).

U predstavljenoj studiji dobijena je veza između eksterne doze olova i odgovor za AOPP, TOS,  $O_2^{\cdot-}$  i Zn sa trendom rasta navedenih parametara sa povećanjem doze, dok je u slučaju modelovanja interne doze-odgovora dozna zavisnost dobijena samo za  $O_2^{\cdot-}$ , takođe sa trendom rasta. Najniži izračunati BMDL bio je za TOS ( $4,5e-06$  mg Pb/kg t.m./dan), što ukazuje da je oksidativni stres u mozgu bio najosetljiviji efekat. Sledeća najniža doza bila je za  $O_2^{\cdot-}$  ( $5,2e-06$  mg Pb/kg t.m./dan) i Zn ( $6,3e-06$  mg Pb/kg t.m./dan). Dobijene BMD vrednosti su veoma blizu BMD za TOS, te se može pretpostaviti da bi ove promene u mozgu mogle biti izazvane istovremeno pri veoma niskim BLL vrednostima a primarno ukazuju na prisustvo oksidativnog stresa. U slučaju modelovanja odnosa eksterne doze-odgovor, najviša BMDL vrednost od ispitivanih je bila za AOPP. Povišen nivo AOPP u tkivu je rezultat reakcije između slobodnih radikala i proteina i prepoznat je kao marker oksidativnog stresa (134). Nivoi olova u krvi, koji predstavljaju biomarker ekspozicije olovu, pokazali su doznu zavisnost samo za nivo  $O_2^{\cdot-}$  u mozgu sa BMDL ( $3e-06$   $\mu$ g Pb/dL). Ujedno,  $O_2^{\cdot-}$  je i jedini parametar oksidativnog statusa koji se ponašao dozno zavisno pri modelovanju eksternih i internih doza. Procenjeni BMDL za  $O_2^{\cdot-}$  bio je veoma nizak, što ukazuje da bi nizak BLL mogao da izazove indukciju stvaranja  $O_2^{\cdot-}$  u mozgu. U ovoj studiji, ispitivane vrednosti BMDL date su za primarne neurotoksične mehanizme olova, dajući podatke koji će doprineti otkrivanju vrednosti praga za neurotoksične efekte izazvane olovom.

## 5.5. Toksični efekti olova na srce

Regulacija kardio-vaskularnog sistema je složena i zavisi prvenstveno od funkcije bubrega, ali i neuro-endokrine regulacije (217). Znajući da olovo deluje toksično skoro na sve organe i sisteme organa, brojni mehanizmi su izučavani kako bi se razjasnila kardiotoksičnost izazvana olovom, uključujući: oštećenje bubrega, poremećaj vazodilatacije, direktne efekte na vaskularne mišiće, hipersimpatičku aktivnost, oštećenje krvnih sudova u vezi sa oksidativnim stresom, inflamacija, poremećaj homeostaze esencijalnih elemenata itd. (17).

Uticao olova na esencijalne katjone zasniva se na njihovoj sličnosti i sposobnosti olova da ih oponaša u različitim molekularnim procesima (26,192). U prikazanoj studiji je pokazano da olovo dovodi do povećanja nivoa Cu u srcu, zavisno od BLL (BMDL:  $0,4$   $\mu$ g Pb/dL). Bakar je važan esencijalni element koji učestvuje u procesu regeneracije srčanog tkiva i neophodan je za aktivaciju angiogeneze. Pokazano je da pri ishemiji miokarda nivo Cu u srcu opada (218). Adekvatna dostupnost bakra u ishemijskom miokardu dovodi do stimulacije angiogeneze i posledično regeneracije srca (219). Predloženi mehanizam aktivacije angiogeneze bakrom je reaktivacija faktora 1 izazvanog hipoksijom (220). Dakle, moglo bi se pretpostaviti da bi efekat olova na nivo  $Cu$  u ovoj studiji, koji se manifestuje njegovim porastom, mogao biti jedan od zaštitnih mehanizama srčanog tkiva sa ciljem stimulacije procesa angiogeneze, ali navedenu hipotezu treba dalje istražiti.

Indukcija oksidativnog stresa nakon ekspozicije olovu je uočena u mnogobrojnim publikovanim studijama i igra važnu ulogu u oksidativnom oštećenju izazvanom olovom (56,151). Rezultati ove studije sugerišu da subakutna izloženost olovu u ispitivanim dozama dovodi do povećanja nivoa  $O_2^{\cdot-}$  u srčanom tkivu pacova. Čak i najniža doza korišćena u eksperimentu ( $0,1$  mg Pb/kg t.m./dan) izazvala je povećanje nivoa  $O_2^{\cdot-}$  i MDA u poređenju sa kontrolom. Indukcija produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), uključujući  $O_2^{\cdot-}$ , može biti izazvana olovom usled inhibicije biosinteze hema i aktivacijom nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze (153). U toksičnim efektima izazvanim olovom na kardio-vaskularni sistem, uticaj na nivo NO i poremećaj u funkciji vazodilatacije takođe mogu igrati važnu ulogu (221). Istraživanja su pokazala da povećanje ROS inaktivira NO i inhibira njegovu fiziološku funkciju u vazodilataciji vaskularnih



mišića. Proizvod reakcije između  $O_2^{\cdot-}$  i NO je visoko reaktivni peroksinitrit anjon (ONOO-) koji poseduje visok potencijal za interakciju sa proteinima i DNK, što posledično rezultuje oštećenjima usled nitrozativnog stresa (222). Indukcija stvaranja  $O_2^{\cdot-}$  i drugih ROS takođe može dovesti do interakcije sa lipidnim membranama što vodi peroksidaciji lipida i povećanja nivoa MDA (57,192,223). MDA je krajnji proizvod razgradnje lipidnih hidroperoksida i indikator kasne faze oksidativnog oštećenja lipida (153,224). Indukcija stvaranja MDA u srcu pacova u ovoj studiji bila je dozno zavisna. Modelovanjem eksterne i interne doze (BLL) sa odgovorom dobijene su vrednosti BMDL: 2,2e-0,6 mg Pb/kg t.m./dan i 0,081  $\mu$ g Pb/dL. Ova studija je prva u kojoj je primećeno povećanje vrednosti MDA u zavisnosti od doze u srčanom tkivu nakon subakutnog izlaganja. Viši nivoi MDA su primećeni i u grupi tretiranoj veoma niskom dozom olova (0,1 mg Pb/kg t.m./dan). Ovo je najniža doza korišćena u eksperimentu, te bi se moglo pretpostaviti da je NOAEL još niži i ne može se odrediti na osnovu dobijenih podataka. Slično kao u ovoj studiji, visoki nivoi MDA u srcu takođe su utvrđeni u studiji sprovedenoj na pacovima, koji su, u poređenju sa ovim istraživanjem, bili izloženi višoj dozi olova (intraperitonealno, 20 mg Pb/kg t.m.) 5 dana nedeljno tokom 8 nedelja (225). Olovo ima afinitet da se vezuje za SHG strukturnih proteina i enzima (15,53). U ovoj studiji je primećeno povišenje nivoa SHG u najnižoj dozi. Može se pretpostaviti da organizam pokušava da mobilize zaštitne proteine, odnosno SHG u srčanom tkivu, ali ovaj zaštitni mehanizam nije bio u potpunosti uspešan u slučaju izloženosti višim dozama, verovatno zbog ograničenih kapaciteta proteina sa SHG. Modelovanjem odnosa interne doze (nivoa olova u srcu)-na nivoa SHG dobijena je dozna zavisnost sa BMDL vrednošću 1e-06  $\mu$ g Pb/g srčanog tkiva. Pozitivan trend pri modelovanju se može objasniti potencijalnom mobilizacijom SHG kao odbrambenog mehanizma nakon izlaganja olovu (226,227).

Ranije objavljene epidemiološke studije i studije na životinjama pokazale su neosporno da izloženost olovu dovodi do štetnih efekata na kardio-vaskularni sistem (94,127,228,229). Većina epidemioloških studija dovela je u vezu niske BLL (< 10  $\mu$ g/dL) sa povećanjem sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, pri čemu je najniža objavljena vrednost BLL 1,33  $\mu$ g/dL dobijena u studiji koja je uključivala odraslo stanovništvo u SAD (230). Mali broj epidemioloških studija je pratio druge štetne efekte olova na srce. U velikoj studiji koju su sprovedeli Jing et al (2019) abnormalnosti srčane kontrakcije pacijenata, tačnije QRS-T talasa, dovedene su u vezu sa nivoima olova u krvi (231). Međutim, tačni mehanizmi koji leže u osnovi kardio toksičnih efekata olova još uvek nisu jasni i potrebno ih je dalje istražiti (26) posebno za niske nivoa izloženosti (94), jer granična doza za štetne efekte na kardio-vaskularni sistem izazvane olovom još uvek nije definisana (26,232). U cilju obezbeđivanja polazne tačke za kardiotoksični efekat izazvan olovom, u prikazanoj studiji je izračunata BMD za testirane parametre. Modelovanjem odnosa doza-odgovor dobijena je BMD u slučaju eksterne doze samo za nivoa MDA (BMDL 2,2e-0,6 mg Pb/kg t.m./dan). Odnos interna doza-odgovor je dobijen za srčane nivoa MDA i Cu sa BLL kao internom dozom i SHG sa nivoima Pb u srčanom tkivu, takođe kao internom dozom. Dobijeni rezultati ovog istraživanja daju korisne podatke za procenu rizika po zdravlje ljudi i dalju procenu referentne tačke za olovo.

## 5.6. Toksični efekti olova na muški reproduktivni sistem

Uticaj olova na reproduktivni sistem muškaraca se može objasniti opštim mehanizmima toksičnosti koje olovo ispoljava u ćelijama. Međutim, u slučaju izloženosti niskih doza, toksični mehanizmi nisu u potpunosti razjašnjeni. Generalno, pokazalo se da je promena nivoa testosterona izazvana olovom posledica oštećenja hipotalamus-hipofiza-gonade ose (233). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su u skladu sa prethodno objavljenim publikacijama i pokazali su smanjenje nivoa testosterona koje je dozno zavisno. Takođe, interna doza olova (BLL) negativno je korelirala sa

nivoima testosterona u serumu, pri čemu je dobijena BMDL  $1,8e-06$   $\mu\text{g Pb/dL}$ . Ovaj mehanizam bi se mogao objasniti uticajem olova na Lajdigove ćelije koji obično dovodi do patoloških promena i posledično smanjenju lučenja testosterona (234). U skladu sa dobijenim rezultatima ove studije, smanjenje nivoa testosterona je zabeleženo i u studiji sprovedenoj na pacovima koji su bili izloženi olovu tokom 35 dana ( $150 \text{ mg/kg t.m./dan}$ ), i praćeno je indukcijom oksidativnog stresa (povećavanjem nivoa MDA) u testisima i sa abnormalnostima u kvalitetu sperme. Navedena izloženost olovu je dovela i do histoloških promena germinalnog epitela i smanjenja koncentracije Lajdigovih ćelija (235). Druga studija na pacovima pokazala je da izloženost olovu tokom 65 dana koje daje BLL vrednosti oko  $30 \mu\text{g/dL}$  (70) dovodi do smanjenja nivoa testosterona (236). Iako su druge studije pokazale histološke promene kod pacova izloženih većim dozama olova (215,237), u ovoj studiji, koja simulira realnu i nisku izloženost olovu, nije bilo histoloških razlika između tretiranih grupa i kontrolne, kao ni između tretiranih grupa, što implicira da su u slučaju izloženosti niskim dozama olova uključeni neki drugi mehanizmi reproduktivne toksičnosti.

U prikazanoj studiji ispitani su efekti niskih doza olova na nivoe esencijalnih metala (Cu, Zn, Fe i Mn) u tkivu testisa. Olovo kao dvovalentni jon ima sposobnost da oponaša esencijalne jone, primarno katjone i takmiči se za transport i mesta vezivanja bioelemenata na enzimima (192,238). Mehanizam interakcije olova sa esencijalnim katjonima je prevashodno proučavan u neurotoksikološkim istraživanjima gde je utvrđeno da olovo kompetitivno menja jone kalcijuma u biološkim procesima. Međutim, esencijalni joni su prisutni u svim organima i igraju esencijalnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji, funkciji enzima i oksidativnoj odbrani u ćelijama (53). Štaviše, esencijalni joni su usko povezani sa normalnom funkcijom reproduktivnog zdravlja. Cink je esencijalni element sa važnom ulogom u mnogim telesnim funkcijama, uključujući spermatogenezu i sintezu testosterona (215). U ovoj studiji zapaženo je blago povišenje nivoa Zn u grupama koje su tretirane dozama većim od  $0,1 \text{ mg Pb/kg t.m./dan}$ . Eksterni odnos doza-odgovor je dobijen za nivoe Zn sa dobijenom BMDL vrednošću  $0,004 \text{ mg Pb/kg t.m./dan}$ . U studiji sprovedenoj na albino pacovima pokazano je da olovo u većim dozama ( $60 \text{ mg/kg t.m./dan}$  tokom šest nedelja) dovodi do smanjenja sadržaja Zn u testisima (239). Tretman olovom nije uticao na nivoe Fe, dok su nivoi Cu bili viši, a nivoi Mn niži u odnosu na kontrolu, čak i u grupi tretiranoj najnižom dozom. Slično dobijenim rezultatima ove studije, povećanje nivoa Cu i Zn u testisima je utvrđeno u eksperimentu koji je izveden na pacovima *Wistar* soja tretiranim  $1000 \text{ ppm Pb}$  u hrani tokom tri meseca (240). Štaviše, Tvrdica i sar. su pokazali da fiziološke koncentracije Mn, Cu, Fe i drugih esencijalnih elemenata u testisima imaju pozitivnu korelaciju sa antioksidativnim markerima i negativnu sa MDA, što ukazuje na zaštitnu ulogu ovih elemenata u oksidativnom oštećenju tkiva testisa (241). Mangan je kofaktor antioksidativnog enzima SOD-2 koji se nalazi prvenstveno u mitohondrijima, dok su Cu i Zn kofaktori enzima SOD-1. Smanjenje ovih elemenata potencijalno može uticati na antioksidativnu odbranu ćelija što dovodi do oštećenja ćelijskih funkcija (153,154). Dobijeni rezultati ukazuju da je najniža uočena BMD bila za nivoe testosterona u serumu,  $1,1e-06 \text{ mg Pb/kg t.m./dan}$ . Prikazani rezultati se mogu dalje koristiti kao polazna tačka u proceni rizika po zdravlje ljudi za olovo kako bi se izvele referentne vrednosti pri izloženošću niskim dozama olova.

## 5.7. Tosični efekti olova na tiroidne hormone

Jedan od najviše proučavanih toksičnih efekata olova u novije vreme je svakako dejstvo na endokrini sistem među kojima se izdvaja dejstvo na štitastu žlezdu i efekat na nivoe tiroidnih hormona. Kako u epidemiološkim tako i u eksperimentalnim studijama, dozna zavisnost između izloženosti olovu i nivoa tiroidnih hormona još uvek nije utvrđena (17). Mehanizmi kojima olovo deluje toksično na tiroidnu žlezdu, a posledično i na nivoe hormona, još uvek nisu dovoljno

razjašnjeni. Dosadašnja ispitivanja ukazuju da su za toksične efekte olova najverovatnije odgovorni oksidativni stres, jonska dishomeostaza, indukcija apoptoze i inflamacije, epigenetski mehanizmi (43,53,56,242). Pored navedenih mehanizama, istraživanja su pokazala da bi indukcija autoimunog odgovora posredovanog olovom koja rezultuje povećanim nivoom antitela na tiroidnu peroksidazu mogla biti uključena (243). Pored toga, ne može se ni zanemariti uticaj olova na hipotalamus-hipofiza-tiroidnu osu (106).

Kod studija na životinjama, uočeno je smanjenje jodotironin dejodinaze tipa I u jetri kao mogući mehanizam toksičnog dejstva olova koji vodi ka nižim nivoima T3 hormona u serumu (244). Imajući u vidu da olovo može uticati na homeostazu esencijalnih jona uključenih u funkciju štitaste žlezde (jod i selen), poremećaj njihove homeostaze može biti značajan mehanizam za tireo-toksične efekte olova (192,245–247).

U ovoj studiji, rezultati su pokazali više vrednosti T4 i fT4 nakon tretmana olovom. Navedena promena u hormonima je bila dozno zavisna sa dobijenom BMDL vrednošću od 0,00026 mg Pb/kg t.m./dan za T4 i 4,6e-05 mg Pb/kg t.m./dan za fT4. Povišene vrednosti datih hormona mogu ukazivati na hipertireoidizam indukovano izloženošću olovu. Olovo može interferirati sa hipofiznom regulacijom rada štitaste žlezde te više vrednosti tiroidnih hormona mogu biti posledica nedostatak značajnog odgovora TSH na nivoe T4 i T3 u serumu sa jedne strane (izostanak negativne sprege hipofize od strane hormona tiroidee), ali i direktne stimulacije sinteze hormona vezivanjem za TSH receptore, s obzirom na ulogu olova kao metalohormona, sa druge strane (17,248).

Nasuprot dobijenim rezultatima u ovoj studiji, primena viših doza olova u pojedinim studijama su indukovale smanjenje vrednosti T3 i T4, a razlika u rezultatima se može pripisati različitim uslovima u eksperimentu pre svega doznim nivoima i dužinom izloženosti (249).

## 5.8. Toksični efekti olova na slezinu

Slezina je glavni imuni organ ljudskog tela, uključen u imuni odgovor telesnih tečnosti i ćelija, a takođe i jedan od organa na koje olovo može delovati toksično. Pored ispitivanih mehanizama u ovoj disertaciji, literaturnom pretragom, uočeno je da izlaganje olovu može dovesti do indukcije oksidativnog oštećenja slezine eksperimentalnih životinja koje je praćeno oksidativnim stresom i u drugim organima uz inhibiciju rasta i razvoja jedinki (250). U studiji sprovedenoj na pacovima oksidativni stres izazvan ekspozicijom olovo-acetatu 0,2%, doveo je do prekomerne ekspresije proteina nuklearnog faktora eritroidnog izvedenog-2 i hem oksigenaze-1 u slezini (251).

Pojedina *in vitro* ispitivanja na kulturi ćelija splenocita ukazuju na efekte olova na inhibiciju produkcije azot-monoksida u makrofagama, što posledično može voditi ka supresiji imunog odgovora (252). Interakcija olova sa Ca je još jedan od detektovanih mehanizama toksičnosti u limfocitima slezine miša, gde je primenom koncentracije od 1 mM Pb utvrđeno da povećava nivo  $Ca^{2+}$ , sa periodima inkubacije od 10 minuta (253). Međutim, u ovoj studiji, primenom niskih doza olova peroralnim putem tokom 4 nedelje, nisu zapaženi efekti olova na nivo Cu, Zn, Mn i Fe u slezini, kao ni na histološku građu ovog organa.

## **5.9. Toksični efekti olova na status bioeleminata u femuru**

Poznato je da su kosti glavni organ deponovanja olova te i u ovoj studiji je potvrđeno da se olovo akumulira predominantno u kostima. U svim grupama tretiranim olovom je primećeno smanjenje nivoa Cu u femuru u odnosu na vrednost u kontrolnoj grupi. Modelovanjem odnosa doza-odgovor dozna zavisnost uočena je za povećanje nivoa Cu i smanjenje nivoa Fe. Fe se apsorbira u gastrointestinalnom traktu vezujući se za DMT-1, koji posreduje u transportu Fe i drugih metala, a eksprimiran je na apikalnoj membrani enterocita. Kompeticija olova za navedeni transporter može biti jedan od mehanizama kojima olovo deluje na sniženje raspoloživosti Fe u organizmu usled smanjenja apsorpcije. Pored toga, dozno zavisno smanjenje ekspresije proteina eflukasa Fe pod dejstvom olova je pokazano na PC12 ćelijskoj kulturi (254). Olovo može zameniti Fe pri vezivanju za Fe helatazu u mitohondrijama, enzim odgovoran za helaciju Fe protoporfirinom (156). U ovoj studiji olovo je dovelo do anemije i sniženih nivoa Fe u krvi te posledično i smanjenog dopremanja ka organima, čime se mogu objasniti snižene vrednosti Fe u femuru. U akutnoj studiji sprovedenoj na miševima, rastuće doze olova su dovele do dozno zavisnog sniženja nivoa Fe u kostima miševa (156). U navedenoj studiji interakcija sa bioelementima u femuru se takođe može objasniti na osnovu hemijskih osobina olova koje mu omogućavaju da kompetitivno istiskuje dvovalentne katjone iz različitih kompleksa u fiziološkim procesima. Cu igra ulogu u sintezi prekursora kolagena, te njegova koncentracija u kostima utiče na strukturni integritet kolagena (255). Na osnovu rezultata koncentracija Cu u drugim organima može se pretpostaviti da je došlo do redistribucije Cu u femur.

## **5.10. Toksični efekti olova na status bioeleminata u pankreasu**

U navedenoj studiji ekspozicija olovu je dozna zavisnost za povišen nivo Zn u pankreasu (BMD: 3,84e-06 mg Pb/kg t.m./dan). Zink ima brojne ključne uloge u funkcionisanju pankreasa. Zn aktivira antioksidativne proteine i smanjuje inflamaciju u ćelijama u pankreasu kao i u drugim organima. Pored toga Zn takođe može aktivirati GPR39receptor na površinama ćelija koji moduliraju signalizaciju Ca i može uticati lučenje insulina. Pošto se GPR39 takođe nalazi u mnogim drugim tkivima, njegova aktivacija može uticati na druge važne ćelijske odgovore kao što je antiinflamatorni odgovor makrofaga. Nedostatak Zn može povećati rizik od razvoja akutnog pankreatitisa (256). Stoga, povišene vrednosti Zn u pankreasu, u ovoj studiji, mogu biti adaptivni, tj. protektivni mehanizam organizma aktiviran kao odbrana od štetnih efekata olova.

## **5.11. Toksični efekti olova na status bioeleminata u timusu**

U ovoj studiji pokazano je da tretman olovom u svim grupama dovodi do sniženja nivoa Fe u timusu koje nije bilo dozno zavisno. Malo je dostupnih podataka koji ukazuju na potencijalnu interferencu olova sa bioelementima u timusu. Interakcije Pb sa Fe su opisane u mnogobrojnim studijama, što je i ranije razmatrano u ovoj studiji. Istraživanja na PC12 ćelijskoj kulturi su pokazala dozno-zavisno smanjenje ekspresije proteina eflukasa Fe pod dejstvom olova. Olovo može zameniti Fe pri vezivanju za Fe helatazu u mitohondrijama, enzim (254) odgovoran za helaciju Fe protoporfirinom (156). U ovoj studiji olovo je dovelo do anemije i sniženih nivoa Fe u krvi te posledično i smanjenog dopremanja ka organima, čime se potencijalno mogu objasniti snižene vrednosti Fe u timusu.

## 5.12. Kritični toksični efekat

Imajući u vidu da olovo može izazvati toksične efekte čak i pri niskim vrednostima BLL, Centar za kontrolu i prevenciju bolesti donosi odluku o snižavanju referentne vrednosti BLL sa 5 na 3,5  $\mu\text{g/dL}$ , za decu kao vulnerabilnu grupu (90,257). I druga regulatorna tela preduzimaju mere, pa je i Evropska agencija za bezbednost hrane 2013. godine odlučila da povuče ranije prihvaćenu vrednost tolerišućeg nedeljnog unosa olova koji je iznosio 25  $\mu\text{g/kg t.m.}$  jer je bio povezan sa porastom sistolnog krvnog pritiska kod odraslih i sniženjem inteligencije kod dece. Na osnovu svih raspoloživih podataka zaključeno je da uspostavljanje nove vrednosti tolerišućeg nedeljnog unosa za olovo koja bi se mogla smatrati bezbednom nije moguće (258).

U ovoj studiji ispitani su toksični efekti niskih doza olova sa ciljem dostizanja BLL vrednosti sličnih kao kod opšte populacije. Šest doznih grupa, omogućilo je idealne statističke uslove za analizu *Benchmark* doze. Određivanje *Benchmark* doze se koristi kao regulatorno prihvaćen metod za utvrđivanje referentne tačke, odnosno polazne tačke, u proceni rizika po zdravlje ljudi (121,122,259,260). Dobija se statističkim modelovanjem, matematički naprednom metodom, posebno u poređenju sa tradicionalnim pristupom *NOAEL* (118). U ovoj studiji je utvrđeno da izloženost olovu pri niskim dozama utiče na skoro sve vitalne organe, menjajući njihovu fiziološku funkciju. Modelovanjem odnosa doza-odgovor dobijena je dozna zavisnost pri modelovanju eksterne doze-odgovora za ukupno 25 parametara od koji je 13 mereno u krvi/serumu, 4 u mozgu, po 2 u jetri i femuru i po 1 u bubrezima, srcu, testisima i pankreasu. Od parametara oksidativnog statusa dozno-zavisno povećanje su dali AOPP u jetri i mozgu, MDA u srcu,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  u mozgu, dok je u bubrezima primećena dozno-zavisna inhibicija aktivnosti SOD enzima. U slučaju bioelemenata Cu je pokazao dozno-zavisno sniženje u krvi i jetri a dozno-zavisno povećanje u femuru. U slučaju Zn dozno-zavisno povećanje je zapaženo u krvi, mozgu i pankreasu.

Poređenjem BMD vrednosti za dobijene odnose doza-odgovor, došlo se do najnižih vrednosti BMD za efekte u pojedinačnim organima/sistemima koji predstavljaju kritični toksični efekat. Generalno posmatrajući ove rezultate može se reći da su uticaji na homeostazu Zn i Cu kao i indukcija oksidativnog stresa toksični efekti koji su najčešće dali doznu zavisnost, posmatrajući celokupan organizam. Kritični toksični efekat za krv i jetru je smanjenje nivoa Cu. Povišene vrednosti Cu u femuru indukovane olovom predstavljaju kritičan toksični efekat u ovom organu. Može se pretpostaviti da je došlo do preraspodele Cu u kosti usled suprotnosti trenda poremećaja Cu u organima. Povećanje vrednosti Zn u testisima i pankreasu predstavlja kritičan efekat olova u ovoj studiji koji ne moraju nužno biti i toksični. U bubrezima inhibicija SOD se može smatrati kritičnim toksičnim efektom, što bi dalje za posledicu imalo smanjenje antioksidativne zaštite u bubrezima. U srcu, kritični toksični efekat je povećanje vrednosti MDA što odražava oksidativno oštećenje lipida. U mozgu, kritični toksični efekat je povećanje vrednosti TOS, tj. povišene vrednosti prooksidanasa. Za endokrini sistem sniženje nivoa testosterona predstavlja kritični toksični efekat. Kako je za pojedine efekte već najniža doza dala odgovor (smanjenje Cu u krvi, inhibicija SOD u bubrezima i povećanje Cu u femuru), tj. *NOAEL* vrednost se nije mogla odrediti, prilikom modelovanja odnosa doza-odgovor BMD sa BMR 5% je bila u rasponu od 0-0,1 mg Pb/kg t.m./dan. Ovo je doprinelo postojanju potencijalnih nesigurnosti prilikom modelovanja odnosa doza-odgovor, jer informacije o efektima ispod nivoa 0,1 mg/kg t.m./dan nisu bili poznati jer nisu bili predmet istraživanja. Navedeni rezultati impliciraju da bi se dalja istraživanja mogla usmeriti na ispitivanje odnosa doza-odgovor pri još nižim doznim nivoima olova koji bi obuhvatili navedeni opseg vrednosti doza nižih od 0,1 mg Pb/kg t.m./dan.

Najniža BMDL vrednost dobijena u studiji iznosi  $1,07 \times 10^{-6}$  mg Pb/kg t.m./dan za efekat smanjenja nivoa testosterona u serumu pacova. Stoga, smanjenje nivoa testosterona indukovano olovom predstavlja kritični toksični efekat studije.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti:

1. Najviše vrednosti internih doza olova su zapažene u femuru, zatim bubrezima i jetri pacova, potvrđujući tendenciju olova da se deponuje u navedenim organima u najvećem procentu. Dodatno, pokazana je korelacija između primenjenih eksternih doza olova i izmerenih internih doza olova.
2. Niske doze olova su dovele do sniženja nivoa hemoglobina koje je bilo dozno zavisno, zatim sniženja nivoa hematokrita i broja eritrocita za koje nije utvrđen dozno-zavisni efekat.
3. Posmatrajući markere funkcije jetre primenjene doze nisu dovele do statistički značajnog povećanja transaminaza u serumu, ali je došlo do disbalansa lipidnog profila.
4. Sagledavajući najznačajnije biohemijske markere funkcije bubrega u serumu može se zaključiti da nije bilo značajnih promena u njihovim nivoima.
5. Niske doze olova su dovele do dozno zavisnog sniženja nivoa Fe u krvi i femuru. Dozno zavisno povećanje nivoa Zn zapaženo je u krvi, testisima, mozgu i pankreasu. U slučaju Cu, dozno zavisno povećanje zapaženo je u femuru, dok je dozno zavisno smanjenje zapaženo u krvi i jetri, ukazujući na preraspodelu Cu u organizmu.
6. Sagledavajući parametre oksidativnog statusa, dozno zavisna inhibicija SOD zapažena je u serumu i bubrezima, dok je nasuprot tome aktivnost SOD indukovana niskim dozama olova u jetri. Tretman olovom je doveo do dozno-zavisnog povećanja vrednosti  $O_2^-$  i AOPP u mozgu ukazujući na indukciju oksidativnog oštećenja. Pri navedenim eksperimentalnim uslovima olovo je dovelo do dozno zavisnog povećanja AOPP u jetri, dok je u srcu zabeležen rast MDA koji je bio dozno zavisno, ukazujući na oksidativno oštećenje proteina u jetri i lipida u srcu pri primeni niskih doza olova.
7. Tretman olovom je doveo do histoloških promena u mozgu kod najviše dozne grupe, dok je histološka struktura jetre, bubrega, testisa i slezine bila očuvana.
8. Posmatrajući endokrine efekte, zapaženo je da su niske doze olova dovele do dozno zavisnog povećanja T4 i dozno-zavisnog sniženja nivoa testosterona, implicirajući potencijalni efekat niskih doza olova u ometanju funkcije endokrinog sistema.
9. Modelovanjem doza-odgovor dobijena je najniža doza koja je izazvala efekat na krv za smanjenje nivoa Cu. Za endokrini sistem to je sniženje nivoa testosterona, za jetru smanjenje nivoa Cu, u bubrezima inhibicija SOD, u srcu povećanje vrednosti MDA, u mozgu povećanje vrednosti TOS, u testisima i pankreasu povećanje nivoa Zn i u femuru povišeni nivoi Cu.
10. Najniža vrednost BMD dobijena u studiji je za efekat smanjenja nivoa testosterona u serumu pacova. Efekti koji su takođe izazvani veoma niskim dozama olova bili su indukcija SOD u bubrezima, povećanje MDA u srcu, povećanje nivoa Cu u femuru i sniženje Cu u krvi. Zatim, povećanje TOS u mozgu i povećanje Zn u pankreasu i sniženje Cu u jetri. Navedene doze su bile reda veličine  $e-06$  mg Pb/kg t.m./dan. U slučaju modelovanja internih doza Pb (BLL)-odgovor, najniža dobijena BMD dobijena je za efekat Pb na povećanje koncentracije Cu u femuru. Parametri koji su u dali odnos doza-odgovor pri modelovanju eksternih i internih doza su smanjenje nivoa Cu u jetri i povećanje nivoa Cu u femuru.

Rezultati predstavljene doktorske disertacije ukazuju da olovo pri niskim dozama/niskim BLL vrednostima, može ispoljiti toksične efekte skoro na svim ispitivanim organima. Izmenjeni profil hematoloških i biohemijskih parametara, zajedno sa izmenjenim nivoima bioelemenata, potencijalno nastalim oksidativnim stresom, izmenjenom aktivnošću acetilholinesteraze i histopatološkom analizom ispitivanih tkiva, ukazuju na moguće narušavanje građe i funkcije organa pacova nakon

subakutne oralne ekspozicije niskim dozama olova. Dobijeni rezultati daju uvid o distribuciji olova između krvi i tkiva kao i o internim dozama olova koje dovode do štetnih efekata. Podaci iz ove studije doprinose aktuelnim naučnim saznanjima o toksičnosti olova pri subakutnoj izloženosti niskim dozama.



## 7. LITERATURA

1. Boeckx RL. Lead poisoning in children. *Anal Chem* [Internet]. 1986 Feb 1;58(2):274A-288A. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00293a001>
2. Eisinger J. Lead and Wine Eberhard Gockel and the Colica Pictonum. *Med Hist.* 1982;26(3):279–302.
3. Chisolm JJ. Ancient sources of lead and lead poisoning in the United States today. *West J Med.* 1985;143(3):380–1.
4. Pohl HR, Ingber SZ, Abadin HG. Historical view on lead: Guidelines and regulations. Vol. 17, *Lead: Its Effects on Environment and Health.* 2017. 435–470 p.
5. Delile H, Blichert-Toft J, Goiran J-P, Keay S, Albarede F. Lead in ancient Rome's city waters. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014 May 6;111(18):6594–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1400097111>
6. Hernberg S. Lead poisoning in a historical perspective. *Am J Ind Med.* 2000;38(3):244–54.
7. Nriagu JO. A History of Global Metal Pollution. *Science* (80- ) [Internet]. 1996 Apr 12;272(5259):223–223. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.272.5259.223>
8. Patrick L. Lead toxicity, a review of the literature. Part I: Exposure, evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review.* 2006.
9. Guharoy Sarkar C. Tetraethyllead (TEL) in Gasoline as a Case of Contentious Science and Delayed Regulation: A Short Review. *Orient J Chem.* 2020;36(1):86–92.
10. UNEP. Era of leaded petrol over, eliminating a major threat to human and planetary health. *UN Environment Programme Transport* [Internet]. 2021; Available from: <https://www.unep.org/news-and-stories/press-release/era-leaded-petrol-over-eliminating-major-threat-human-and-planetary>
11. Mandić-Rajčević S, Bulat Z, Matović V, Popević M, Lepić M, Mandić B, et al. Environmental and take-home lead exposure in children living in the vicinity of a lead battery smelter in Serbia. *Environ Res* [Internet]. 2018;167:725–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.08.031>
12. O'Brien P, Siraki A, Shangari N. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. Vol. 35, *Critical Reviews in Toxicology.* 2005. p. 609–62.
13. Hunter D. *The diseases of occupations.* English Univ Press. 1957;
14. EFSA. Scientific opinion on lead in food. *EFSA J* [Internet]. 2010;8(4):1570 (1-146). Available from: [doi:10.2903/j.efsa.2010.1570](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1570)
15. Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: A review. *Interdiscip Toxicol.* 2015;8(2):55–64.
16. Murata K, Iwata T, Dakeishi M, Karita K. Lead toxicity: Does the critical level of lead

resulting in adverse effects differ between adults and children? *J Occup Health.* 2009;51(1):1–12.

17. ATSDR. Toxicological profile for Lead. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2020.
18. WHO. Global Health Risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. *Bull World Health Organ* [Internet]. 2009;87:646–646. Available from: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GlobalHealthRisks\\_report\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf)
19. ATSDR. Substance Priority List ATSDR ' s Substance Priority List [Internet]. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2019. p. 1–11. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>
20. World Health Organization. Preventing Disease through Healthy Environment. Exposure to Arsenic: A Major Public Health Concern. *Prev Dis through Heal Environ* [Internet]. 2019;1–5. Available from: <http://www.who.int/ipcs/features/arsenic.pdf?ua=1>
21. Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem.* 2018;119(1):157–84.
22. Sankhla MS, Kumari M, Nandan M, Kumar R, Agrawal P. Heavy Metals Contamination in Water and their Hazardous Effect on Human Health-A Review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2016;5(10):759–66.
23. Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulos A, Bezirtzoglou E. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Front Public Heal.* 2020;8.
24. Repić A, Bulat P, Antonijević B, Antunović M, Džudović J, Buha A, et al. The influence of smoking habits on cadmium and lead blood levels in the Serbian adult people. *Environ Sci Pollut Res.* 2020;27(1):751–60.
25. Patterson C, Ericson J, Manea-Krichten M, Shirahata H. Natural skeletal levels of lead in *Homo sapiens sapiens* uncontaminated by technological lead. *Sci Total Environ.* 1991;107(C):205–36.
26. Mitra P, Sharma S, Purohit P, Sharma P. Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2017;54(7–8):506–28. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1408562>
27. Rahman A, Khan KM, Rao MS. Exposure to low level of lead during preweaning period increases metallothionein-3 expression and dysregulates divalent cation levels in the brain of young rats. *Neurotoxicology* [Internet]. 2018;65:135–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.008>
28. Grand View Research. Battery Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Lead Acid, Li-ion, Nickle Metal Hydride, Ni-cd), By Application (Automotive, Industrial, Portable), By Region, And Segment Forecasts, 2020 - 2027 [Internet]. 2019. p. 1–4. Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/battery-market>
29. Obeng-Gyasi E. Sources of lead exposure in various countries. *Rev Environ Health.* 2019;34(1):25–34.

30. Jarvis P, Quy K, Macadam J, Edwards M, Smith M. Intake of lead (Pb) from tap water of homes with leaded and low lead plumbing systems. *Sci Total Environ.* 2018;644:1346–56.
31. Heusinkveld D, Ramírez-Andreotta MD, Rodríguez-Chávez T, Sáez AE, Betterton E, Rine K. Assessing Children’s Lead Exposure in an Active Mining Community Using the Integrated Exposure Uptake Biokinetic Model. *Expo Heal.* 2021;13(3):517–33.
32. Friberg L, Nordberg GF, Vouk VB. *Handbook of toxicology of metals*, vol. 2. 1986. 9–11 p.
33. Panel E, Chain F. Lead dietary exposure in the European population. *EFSA J* [Internet]. 2012 Jul;10(7):1351. Available from: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2009.1351>
34. Lauren R, López EB, Marquez. E. Hobbies with Lead Factsheet: Hunting and Fishing. *Nevada Child Lead Poisoning Prev Progr.* 2020;1–6.
35. Schupp T, Damm G, Foth H, Freyberger A, Gebel T, Gundert-Remy U, et al. Long-term simulation of lead concentrations in agricultural soils in relation to human adverse health effects. *Arch Toxicol.* 2020;94(7):2319–29.
36. Liu P, He K, Li Y, Wu Q, Yang P, Wang D. Exposure to mercury causes formation of male-specific structural deficits by inducing oxidative damage in nematodes. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012;79:90–100.
37. Kumar A, Pastore P. Lead and cadmium in soft plastic toys. *Curr Sci.* 2007;93(6):818–22.
38. Turner A, Filella M. Lead in plastics – Recycling of legacy material and appropriateness of current regulations. *J Hazard Mater.* 2021;404.
39. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT. *Handbook on the Toxicology of Metals* [Internet]. *Handbook on the Toxicology of Metals.* Elsevier; 2007. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123694133X50526>
40. Liu J, Gao D, Chen Y, Jing J, Hu Q, Chen Y. Lead exposure at each stage of pregnancy and neurobehavioral development of neonates. *Neurotoxicology.* 2014;44:1–7.
41. Kumar A, Cabral-Pinto M, Chaturvedi AK, Shabnam AA, Subrahmanyam G, Mondal R, et al. Lead toxicity: Health hazards, influence on food Chain, and sustainable remediation approaches. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(7).
42. Klotz K, Göen T. 6. Human Biomonitoring of Lead Exposure. In: *Lead – Its Effects on Environment and Health* [Internet]. De Gruyter; 2017. p. 99–122. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/9783110434330-006/html>
43. Wallace DR, Taalab YM, Heinze S, Tariba Lovaković B, Pizent A, Renieri E, et al. Toxic-Metal-Induced Alteration in miRNA Expression Profile as a Proposed Mechanism for Disease Development. *Cells.* 2020;9(4).
44. Patra RC, Rautray AK, Swarup D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet Med Int.* 2011;2011.
45. Zielhuis RL. Dose-response relationships for inorganic lead - I. Biochemical and haematological responses. *Int Arch Occup Environ Health.* 1975;35(1):1–18.

46. Abdel-Moneim AE, Dkhil MA, Al-Quraishy S. The redox status in rats treated with flaxseed oil and lead-induced hepatotoxicity. *Biol Trace Elem Res.* 2011;143(1):457–67.
47. Nwobi NL, Adedapo SK, Olukolade O, Oyinlade OA, Lagunju IA, Atulomah NO, et al. Positive and inverse correlation of blood lead level with erythrocyte acetylcholinesterase and intelligence quotient in children: Implications for neurotoxicity. *Interdiscip Toxicol.* 2019;12(3):136–42.
48. Mason LH, Harp JP, Han DY. Pb neurotoxicity: Neuropsychological effects of lead toxicity. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
49. Antonijevic E, Kotur-Stevuljevic J, Musilek K, Kosvancova A, Kuca K, Djukic-Cosic D, et al. Effect of six oximes on acutely anticholinesterase inhibitor-induced oxidative stress in rat plasma and brain. *Arch Toxicol.* 2018;92(2):745–57.
50. Reddy GR, Devi BC, Chetty CS. Developmental lead neurotoxicity: Alterations in brain cholinergic system. Vol. 28, *NeuroToxicology.* 2007. p. 402–7.
51. Ferlemi AV, Avgoustatos D, Kokkosis AG, Protonotarios V, Constantinou C, Margarity M. Lead-induced effects on learning/memory and fear/anxiety are correlated with disturbances in specific cholinesterase isoform activity and redox imbalance in adult brain. *Physiol Behav* [Internet]. 2014;131:115–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.04.033>
52. Sergio Casas J, Sordo J, Vidarte MJ. Lead(II) coordination chemistry in the solid state. In: *Lead* [Internet]. Elsevier; 2006. p. 41–99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444529459500026>
53. Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip Toxicol.* 2012;5(2):47–58.
54. Zoroddu MA, Aaseth J, Crisponi G, Medici S, Peana M, Nurchi VM. The essential metals for humans: a brief overview. *J Inorg Biochem.* 2019;195:120–9.
55. U.S. EPA. Integrated Science Assessment (ISA) for Lead (Final Report, Jul 2013). US Environ Prot Agency. 2013;EPA/600/R-10/075F,2013.
56. Matović V, Buha A, Dukić-Ćosić D, Bulat Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys [Internet]. Vol. 78, *Food and Chemical Toxicology.* 2015. p. 130–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.011>
57. Ahamed M, Siddiqui MKJ. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clin Chim Acta.* 2007;383(1–2):57–64.
58. Lopes AA, Peixe T, Mesas A, Paoliello M. Lead exposure and oxidative stress. A systematic review. Vol. 236, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 2016. 194–234 p.
59. Wolonciej M, Milewska E, Roszkowska-Jakimiec W. Trace elements as an activator of antioxidant enzymes. *Postepy Hig Med Dosw.* 2016;70:1483–98.
60. Wang L, Zhou X, Yang D, Wang Z. Effects of lead and/or cadmium on the distribution

patterns of some essential trace elements in immature female rats. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 2011 Dec 18;30(12):1914–23. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327111405865>

61. Ijomone OM, Ijomone OK, Iroegbu JD, Ifenatuoha CW, Olung NF, Aschner M. Epigenetic influence of environmentally neurotoxic metals. *Neurotoxicology*. 2020;81:51–65.
62. Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. Vol. 12, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
63. Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2016;23(9):8244–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>
64. Dressier J, Kim KA, Chakraborti T, Goldstein G. Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem Res*. 1999;24(4):595–600.
65. Andjelkovic M, Djordjevic AB, Antonijevic E, Antonijevic B, Stanic M, Kotur-Stevuljevic J, et al. Toxic effect of acute cadmium and lead exposure in rat blood, liver, and kidney. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(2).
66. National Toxicology Program (NTP). Health Effects of Low-Level Lead. *Natl Toxicol Progr Monogr Heal Eff Low-Level Lead* [Internet]. 2012; Available from: [https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/ohat/lead/final/monographhealtheffectslowlevellead\\_newissn\\_508.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/ohat/lead/final/monographhealtheffectslowlevellead_newissn_508.pdf)
67. Wild CP. The exposome: From concept to utility. *Int J Epidemiol*. 2012;41(1):24–32.
68. Mateo R, Beyer WN, Spann JW, Hoffman DJ, Ramis A. Relationship between oxidative stress, pathology, and behavioral signs of lead poisoning in mallards. *J Toxicol Environ Heal - Part A*. 2003;66(14):1371–89.
69. Yuan G, Dai S, Yin Z, Lu H, Jia R, Xu J, et al. Toxicological assessment of combined lead and cadmium: Acute and sub-chronic toxicity study in rats. *Food Chem Toxicol*. 2014;65:260–8.
70. Patočka J, Kuča K. Lead Exposure and Environmental Health. *Mil Med Sci Lett*. 2016;85(4):147–63.
71. Mas-Oliva J. Effect of lead on the erythrocyte (Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>)-ATPase activity Calmodulin involvement. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 1989 Aug;89(1):87–93. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00228283>
72. Abam E, Okediran BS, Odukoya OO, Adamson I, Ademuyiwa O. Reversal of ionoregulatory disruptions in occupational lead exposure by vitamin C. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2008;26(3):297–304.
73. Buc H annie, Kaplan J claude. Red-cell pyrimidine 5'-nucleotidase and lead poisoning. *Clin Chim Acta*. 1978;87(1):49–55.

74. Barman T, Kalahasthi R, Rajmohan HR. Effects of lead exposure on the status of platelet indices in workers involved in a lead-acid battery manufacturing plant. *J Expo Sci Environ Epidemiol* [Internet]. 2014 Nov 21;24(6):629–33. Available from: <https://www.nature.com/articles/jes20144>
75. Huang W-H, Hsu C-W, Weng C-H, Lin-Tan D-T, Yen T-H. Negative Relationship between Erythropoietin Dose and Blood Lead Level in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Dec 29;6(1):34313. Available from: [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports)
76. Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2000 Nov;29(10):927–45. Available from: [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L30838816%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00413-5](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L30838816%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00413-5)
77. Mudipalli A. Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian J Med Res*. 2007;126(6):518–27.
78. Patil AJ, Bhagwat VR, Patil JA, Dongre NN, Ambekar JG, Das KK. Occupational lead exposure in battery manufacturing workers, silver jewelry workers, and spray painters in western Maharashtra (India): effect on liver and kidney function. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* [Internet]. 2007;18(2):87–100. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed8&NEWS=N&AN=2007382449>
79. Meredith PA, Campbell BC, Moore MR, Goldberg A. The effects of industrial lead poisoning on cytochrome P450 mediated phenazone (antipyrine) hydroxylation. *Eur J Clin Pharmacol*. 1977;12(3):235–9.
80. Abdelhamid FM, Mahgoub HA, Ateya AI. Ameliorative effect of curcumin against lead acetate–induced hemato-biochemical alterations, hepatotoxicity, and testicular oxidative damage in rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2020;27(10):10950–65.
81. Tatli Seven P, Iflazoglu Mutlu S, Seven I, Arkali G, Ozer Kaya S, Kanmaz OE. Protective role of yeast beta-glucan on lead acetate-induced hepatic and reproductive toxicity in rats. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2021 Oct 25;28(38):53668–78. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11356-021-14398-0>
82. Rastogi S. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Indian J Occup Environ Med*. 2008;12(3):103–6.
83. Orr S, Bridges C. Chronic Kidney Disease and Exposure to Nephrotoxic Metals. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 May 12;18(5):1039. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/5/1039>
84. Navarro-Moreno LG, Quintanar-Escorza MA, González S, Mondragón R, Cerbón-Solorzano J, Valdés J, et al. Effects of lead intoxication on intercellular junctions and biochemical alterations of the renal proximal tubule cells. *Toxicol Vitr* [Internet]. 2009;23(7):1298–304. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.020>
85. Ruckart PZ, Jones RL, Courtney JG, LeBlanc TT, Jackson W, Karwowski MP, et al. Update

of the Blood Lead Reference Value — United States, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2021 Oct 29 [cited 2022 May 18];70(43):1509–12. Available from: <https://www.cdc.gov/nceh/lead/faqs/lead-faqs>.

86. Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou PB. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: A review. *Rev Environ Health*. 2009;24(1):15–45.
87. Dominguez S, Flores-Montoya MG, Sobin C. Early chronic exposure to low-level lead alters total hippocampal microglia in pre-adolescent mice. *Toxicol Lett* [Internet]. 2019;302:75–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.10.016>
88. Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(APR):1–22.
89. Safruk AM, McGregor E, Whitfield Aslund ML, Cheung PH, Pinsent C, Jackson BJ, et al. The influence of lead content in drinking water, household dust, soil, and paint on blood lead levels of children in Flin Flon, Manitoba and Creighton, Saskatchewan. *Sci Total Environ*. 2017;593–594:202–10.
90. Rocha A, Trujillo KA. Neurotoxicity of low-level lead exposure: History, mechanisms of action, and behavioral effects in humans and preclinical models. *Neurotoxicology* [Internet]. 2019 Jul;73(March):58–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.02.021>
91. Skerfving S, Löfmark L, Lundh T, Mikoczy Z, Strömberg U. Late effects of low blood lead concentrations in children on school performance and cognitive functions. *Neurotoxicology*. 2015;49:114–20.
92. Orisakwe OE. The role of lead and cadmium in psychiatry. *N Am J Med Sci*. 2014;6(8):370–6.
93. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*. 2010;345(1–2):91–104.
94. Sevim Ç, Doğan E, Comakli S. Cardiovascular disease and toxic metals. *Curr Opin Toxicol*. 2020;19:88–92.
95. Simões MR, Preti SC, Azevedo BF, Fiorim J, Freire DD, Covre EP, et al. Low-level Chronic Lead Exposure Impairs Neural Control of Blood Pressure and Heart Rate in Rats. *Cardiovasc Toxicol*. 2017;17(2):190–9.
96. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead exposure and cardiovascular disease - A systematic review. *Environ Health Perspect*. 2007;115(3):472–82.
97. Chen C, Wang N, Zhai H, Nie X, Sun H, Han B, et al. Associations of blood lead levels with reproductive hormone levels in men and postmenopausal women: Results from the SPECT-China Study. *Sci Rep*. 2016;6(July):2–10.
98. Doumouchtsis KK, Doumouchtsis SK, Doumouchtsis EK, Perrea DN. The effect of lead intoxication on endocrine functions. *J Endocrinol Invest* [Internet]. 2009 Feb 22;32(2):175–83. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF03345710>

99. Gennart JP, Buchet JP, Roels H, Ghyselen P, Ceulemans E, Lauwerys R. Fertility of male workers exposed to cadmium, lead, or manganese. *Am J Epidemiol.* 1992;135(11):1208–19.
100. Lin S, Hwang S-A, Marshall EG, Stone R, Chen J. Fertility rates among lead workers and professional bus drivers: A comparative study. *Ann Epidemiol [Internet].* 1996 May;6(3):201–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/1047279796000105>
101. Famurewa AC, Ugwuja EI. Association of Blood and Seminal Plasma Cadmium and Lead Levels With Semen Quality in Non-Occupationally Exposed Infertile Men in Abakaliki, South East Nigeria. *J Fam Reprod Heal [Internet].* 2017;11(2):97–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29282417> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5742670>
102. Hernández-Ochoa I, García-Vargas G, López-Carrillo L, Rubio-Andrade M, Morán-Martínez J, Cebrián ME, et al. Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico. *Reprod Toxicol.* 2005;20(2):221–8.
103. Braunstein GD, Dahlgren J, Loriaux DL. Hypogonadism in chronically lead-poisoned men. *Infertility.* 1978;1(1):33–51.
104. Balachandar R, Bagepally BS, Kalahasthi R, Haridoss M. Blood lead levels and male reproductive hormones: A systematic review and meta-analysis. *Toxicology [Internet].* 2020 Oct;443(May):152574. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152574>
105. Fortin MC, Cory-Slechta DA, Ohman-Strickland P, Nwankwo C, Yanger TS, Todd AC, et al. Increased lead biomarker levels are associated with changes in hormonal response to stress in occupationally exposed male participants. *Environ Health Perspect.* 2012;120(2):278–83.
106. Singh B, Chandran V, Bandhu HK, Mittal BR, Bhattacharya A, Jindal SK, et al. Impact of lead exposure on pituitary-thyroid axis in humans. *BioMetals.* 2000;13(2):187–92.
107. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Inorganic and organic lead compounds. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans [Internet].* 2006;87:1–471. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17191367>
108. Barry V, Steenland K. Lead exposure and mortality among U.S. workers in a surveillance program: Results from 10 additional years of follow-up. *Environ Res [Internet].* 2019;177(August):108625. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108625>
109. Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA). Safety evaluation of certain food additives: Seventy-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2012.
110. Vorvolakos T, Arseniou S, Samakouri M. There is no safe threshold for lead exposure: A literature review. *Psychiatrike [Internet].* 2016 Jul;27(3):204–14. Available from: [http://www.psychiatriki-journal.gr/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1306&Itemid=851](http://www.psychiatriki-journal.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=1306&Itemid=851)
111. Pravilnik o preventivnim merama za bezbedan i zdrav rad pri izlaganju hemijskim materijama (“Sl. glasnik RS”, br. 106/2009, 117/2017 i 107/2021).



112. Pravilnik o prethodnim i periodičnim lekarskim pregledima zaposlenih na radnim mestima sa povećanim rizikom ("Sl. glasnik RS", br. 120/2007, 93/2008 i 53/2017).
113. World Health Organization. WHO guideline for the clinical management of exposure to lead. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Cataloguing-in-Publication. 2021.
114. Pediatric Environmental Health Specialty Units. Recommendations on Management of Childhood Lead Exposure. 2021;1–6. Available from: [https://www.pehsu.net/\\_Library/facts/PEHSU\\_Fact\\_Sheet\\_Lead\\_Management\\_Health\\_Professionals\\_9\\_2021.pdf](https://www.pehsu.net/_Library/facts/PEHSU_Fact_Sheet_Lead_Management_Health_Professionals_9_2021.pdf)
115. Holland MG, Cawthon D. Workplace Lead Exposure. *J Occup Environ Med* [Internet]. 2016 Dec;58(12):e371–4. Available from: <https://journals.lww.com/00043764-201612000-00022>
116. Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger MJ, Knutsen KH, More S, et al. Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA J* [Internet]. 2017 Jan;15(1):1–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2017.4658>
117. Programme E. Principles for modelling dose-response for the risk assessment of chemicals. *Environ Heal Criteria*. 2009;(239):1–137.
118. Barlow S, Chesson A, Collins J, Flynn A, Hardy A, Klaus-Dieter J, et al. Use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA J*. 2009;1150:1–72.
119. Crump KS. A new method for determining allowable daily intakes. *Toxicol Sci*. 1984;4(5):854–71.
120. Slob W. Benchmark dose and the three Rs. Part I. Getting more information from the same number of animals. *Crit Rev Toxicol*. 2014;44(7):557–67.
121. Slob W. Benchmark dose and the three Rs. Part II. Consequences for study design and animal use. *Crit Rev Toxicol* [Internet]. 2014 Aug 7;44(7):568–80. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408444.2014.925424>
122. Haber LT, Dourson ML, Allen BC, Hertzberg RC, Parker A, Vincent MJ, et al. Benchmark dose (BMD) modeling: current practice, issues, and challenges. *Crit Rev Toxicol* [Internet]. 2018;48(5):387–415. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1430121>
123. Varewyck M, Verbeke T. Software for Benchmark Dose Modelling. *EFSA Support Publ*. 2019;16(1).
124. Ademuyiwa O, Agarwal R, Chandra R, Raj Behari J. Effects of sub-chronic low-level lead exposure on the homeostasis of copper and zinc in rat tissues. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. 2010;24(3):207–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.01.002>
125. Apaydin FG, Baş H, Kalender S, Kalender Y. Subacute effects of low dose lead nitrate and mercury chloride exposure on kidney of rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;41:219–24.
126. Wang T, Tu Y, Wang K, Gong S, Zhang G, Zhang Y, et al. Associations of blood lead levels with multiple genotoxic biomarkers among workers in China: A population-based study. *Environ Pollut*. 2021;273.

127. Chen Z, Huo X, Zhang S, Cheng Z, Huang Y, Xu X. Relations of blood lead levels to echocardiographic left ventricular structure and function in preschool children. *Chemosphere* [Internet]. 2021;268(xxxx):128793. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128793>
128. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.
129. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. *Handb Methods Oxyg Radic Res*. 1985;123-32.
130. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-11.
131. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70-7.
132. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma - Inj Infect Crit Care*. 1991;31(1):32-5.
133. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170-5.
134. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996;49(5):1304-13.
135. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7(2).
136. RIVM. Dutch National Institute for Public Health and the Environment, PROAST Available at: <https://www.rivm.nl/en/proast>. 2021.
137. Wang G, Fowler BA. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2008;233(1):92-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.01.017>
138. Fowler BA. Roles of lead-binding proteins in mediating lead bioavailability. *Environ Health Perspect*. 1998;106(SUPPL. 6):1585-7.
139. Permyakov EA. Metal Binding Proteins. *Encyclopedia* [Internet]. 2021 Mar 15;1(1):261-92. Available from: <https://www.mdpi.com/2673-8392/1/1/24>
140. Sherlock J, Smart G, Forbes GI, Moore MR, Patterson WJ, Richards WN, et al. Assessment of Lead Intakes and Dose-response for a Population in Ayr Exposed to a Plumbosolvent Water Supply. *Hum Exp Toxicol*. 1982;1(2):115-22.
141. Sherlock JC, Ashby D, Delves HT, Forbes GI, Moore MR, Patterson WJ, et al. Reduction in Exposure to Lead from Drinking Water and its Effect on Blood Lead Concentrations. *Hum Toxicol* [Internet]. 1984 Sep 6;3(5):383-92. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/096032718400300503>

142. Pocock SJ, Shaper AG, Walker M, Wale CJ, Clayton B, Delves T, et al. Effects of tap water lead, water hardness, alcohol, and cigarettes on blood lead concentrations. *J Epidemiol Community Health*. 1983;37(1):1–7.
143. Aungst BJ, Dolce JA, Fung HL. The effect of dose on the disposition of lead in rats after intravenous and oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1981;61(1):48–57.
144. Wright RO, Schwartz J, Wright RJ, Bollati V, Tarantini L, Park SK, et al. Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons. *Environ Health Perspect*. 2010;118(6):790–5.
145. Hsieh NH, Chung SH, Chen SC, Chen WY, Cheng YH, Lin YJ, et al. Anemia risk in relation to lead exposure in lead-related manufacturing. *BMC Public Health* [Internet]. 2017 May 5 [cited 2021 Mar 15];17(1). Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12889-017-4315-7>
146. Alasia DD, Emem-Chioma PC, Wokoma FS. Association of lead exposure, serum uric acid and parameters of renal function in Nigerian lead-exposed workers. *Int J Occup Environ Med*. 2010;1(4):182–90.
147. Shah F, Kazi TG, Afridi HI, Baig JA, Khan S, Kolachi NF, et al. Environmental exposure of lead and iron deficit anemia in children age ranged 1-5years: A cross sectional study. *Sci Total Environ* [Internet]. 2010 [cited 2021 Mar 15];408(22):5325–30. Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969710008326?casa\\_token=3dAIuJICPKwAAAAA:fgUI1SHno2Ui9L\\_XNYBs66cRQ8mmtqm3tdVPf8ySeNjoTqo5ct2oUZcUJYExEGQIJQS0UIgY4xs](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969710008326?casa_token=3dAIuJICPKwAAAAA:fgUI1SHno2Ui9L_XNYBs66cRQ8mmtqm3tdVPf8ySeNjoTqo5ct2oUZcUJYExEGQIJQS0UIgY4xs)
148. Zubero MB, Aurrekoetxea JJ, Ibarluzea JM, Arenaza MJ, Rodríguez C, Sáenz JR. Heavy metal levels (Pb, Cd, Cr and Hg) in the adult general population near an urban solid waste incinerator. *Sci Total Environ*. 2010;408(20):4468–74.
149. Nava-Ruiz C, Alcaraz-Zubeldia M, Méndez-Armenta M, Vergara P, Díaz-Ruiz A, Ríos C. Nitric oxide synthase immunolocalization and expression in the rat hippocampus after sub-acute lead acetate exposure in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2010;62(3):311–6.
150. Jain NB, Laden F, Guller U, Shankar A, Kasani S, Garshick E. Relation between blood lead levels and childhood anemia in India. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2005 [cited 2021 Mar 15];161(10):968–73. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-abstract/161/10/968/104880>
151. Dewanjee S, Sahu R, Karmakar S, Gangopadhyay M. Toxic effects of lead exposure in Wistar rats: Involvement of oxidative stress and the beneficial role of edible jute (*Corchorus olitorius*) leaves. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2021 Mar 15];55:78–91. Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512009131?casa\\_token=kt6w56R\\_vf0AAAAA:C\\_b2rAzl\\_OYnnoq9jHMglazOSU7LrvTDt1I1BSBV0auGWQ\\_GDI6oFp\\_wCGc6TdDclOYVmbBkwmi0](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512009131?casa_token=kt6w56R_vf0AAAAA:C_b2rAzl_OYnnoq9jHMglazOSU7LrvTDt1I1BSBV0auGWQ_GDI6oFp_wCGc6TdDclOYVmbBkwmi0)
152. Flora SJS, Saxena G, Gautam P, Kaur P, Gill KD. Response of lead-induced oxidative stress and alterations in biogenic amines in different rat brain regions to combined administration of DMSA and MiADMSA. *Chem Biol Interact*. 2007;170(3):209–20.

153. Fan Y, Zhao X, Yu J, Xie J, Li C, Liu D, et al. Lead-induced oxidative damage in rats/mice: A meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. 2020;58(December 2019):126443. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.126443>
154. Farmand F, Ehdaie A, Roberts CK, Sindhu RK. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ Res*. 2005;98(1):33–9.
155. Mylroie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986;82(3):512–20.
156. Yu Y, Yu L, Zhou X, Qiao N, Qu D, Tian F, et al. Effects of acute oral lead exposure on the levels of essential elements of mice: a metallomics and dose-dependent study. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. 2020;62(June):126624. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126624>
157. Hartwig A. Metal interaction with redox regulation: An integrating concept in metal carcinogenesis? Vol. 55, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier; 2013. p. 63–72.
158. Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci*. 2013;18(2):144–57.
159. Richetti SK, Rosemberg DB, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, Bonan CD. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology* [Internet]. 2011;32(1):116–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2010.11.001>
160. Bulat Z, Dukić-Ćosić D, Antonijević B, Buha A, Bulat P, Pavlović Z, et al. Can zinc supplementation ameliorate cadmium-induced alterations in the bioelement content in rabbits? *Arh Hig Rada Toksikol*. 2017;68(1):38–45.
161. Mazumdar M, Bellinger DC, Gregas M, Abanilla K, Bacic J, Needleman HL. Low-level environmental lead exposure in childhood and adult intellectual function: A follow-up study. *Environ Heal A Glob Access Sci Source*. 2011;10(1).
162. Wang S, Jin Y, Chen J, Lu L, Li Y, Zhao Q, et al. Blood lead levels of Chinese children from 1991 to 2020: Based on Monte Carlo simulation. *Environ Pollut* [Internet]. 2021 Jun;278:116823. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749121004036>
163. Wang B, Wan H, Cheng J, Chen Y, Wang Y, Chen Y, et al. Blood lead, vitamin D status, and albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Environ Pollut* [Internet]. 2021 May;276:116653. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749121002311>
164. Alya A, Ines DB, Montassar L, Najoua G, Saloua EF. Oxidative stress, biochemical alterations, and hyperlipidemia in female rats induced by lead chronic toxicity during puberty and post puberty periods. *Iran J Basic Med Sci*. 2015;18(10):1034–43.
165. Todorović T, Dožić I, Vujanović D, Pejovic J, Marjanović M. The influence of chronic lead poisoning on the activity of some serum enzymes in rats. *Acta Vet Brno*. 2005;55(5–6):471–

166. Giknis M., Clifford C. Clinical Laboratory Parameters For Crl:WI(Han) Rats. Charles River Lab. 2008;1–14.
167. Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, et al. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem [Internet]*. 2007 Jan 1;388(11):1255–6. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/BC.2007.161/html>
168. Kojima M, Sekikawa K, Nemoto K, Degawa M. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -independent downregulation of hepatic cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice treated with lead nitrate. *Toxicol Sci [Internet]*. 2005 Oct [cited 2021 Mar 15];87(2):537–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16049268/>
169. Skoczyńska A, Smolik R, Jeleń M. Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Arch Toxicol*. 1993;67(3):200–4.
170. Obeng-Gyasi E, Armijos RX, Weigel MM, Filippelli GM, Sayegh MA. Cardiovascular-related outcomes in U.S. adults exposed to lead. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(4).
171. Bener A, Obineche E, Gillett M, Pasha MAH, Bishawi B. Association between blood levels of lead, blood pressure and risk of diabetes and heart disease in workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 2001;74(5):375–8.
172. Lu X, Xu X, Zhang Y, Zhang Y, Wang C, Huo X. Elevated inflammatory Lp-PLA2 and IL-6 link e-waste Pb toxicity to cardiovascular risk factors in preschool children. *Environ Pollut [Internet]*. 2018;234:601–9. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L619541303%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.094>
173. Balint GS, Iovanescu G, Stanca H, Popoiu CM, Boia E, Popovici RA, et al. The protective effect of HDL-cholesterol in patients with essential hypertension. *Rev Chim*. 2017;68(5):949–52.
174. Ademuyiwa O, Ugbaja RN, Idumebor F, Adebawo O. Plasma lipid profiles and risk of cardiovascular disease in occupational lead exposure in Abeokuta, Nigeria. *Lipids Health Dis*. 2005;4.
175. Morrell A, Tallino S, Yu L, Burkhead JL. The role of insufficient copper in lipid synthesis and fatty-liver disease. *IUBMB Life [Internet]*. 2017 Apr;69(4):263–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.1613>
176. Sternlieb I. Copper and the Liver. *Gastroenterology [Internet]*. 1980 Jun;78(6):1615–28. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(19\)30524-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(19)30524-4)
177. Klauder DS, Petering HG. Anemia of lead intoxication: a role for copper. *J Nutr*. 1977;107(10):1779–85.
178. Klevay LM. Copper Deficiency, Lead, and Paraoxonase. *Environ Health Perspect [Internet]*. 2007 Jul;115(7). Available from: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.10151>

179. Flora SJS, Coulombe RA, Sharma RP, Tandon SK. Influence of dietary protein deficiency on lead-copper interaction in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 1989 Aug;18(1):75–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0147651389900936>
180. Zhao Y, Zhang L, Ouyang X, Jiang Z, Xie Z, Fan L, et al. Advanced oxidation protein products play critical roles in liver diseases. *Eur J Clin Invest* [Internet]. 2019 Jun 20;49(6):e13098. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eci.13098>
181. Jin Y, Liao Y, Lu C, Li G, Yu F, Zhi X, et al. Health effects in children aged 3-6 years induced by environmental lead exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2006;63(2):313–7.
182. Annabi Berrahal A, Nehdi A, Hajjaji N, Gharbi N, El-Fazâa S. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comptes Rendus - Biol*. 2007;330(8):581–8.
183. Abdel Moneim AE. *Indigofera oblongifolia* prevents lead acetate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, fibrosis and apoptosis in rats. *PLoS One*. 2016;11(7):1–18.
184. Elrasoul ASA, Mousa AA, Orabi SH, Mohamed MAEG, Gad- allah SM, Almeer R, et al. Antioxidant, anti- inflammatory, and anti- apoptotic effects of *azolla pinnata* ethanolic extract against lead- induced hepatotoxicity in rats. *Antioxidants*. 2020;9(10):1–19.
185. Satarug S, Gobe GC, Ujgin P, Vesey DA. A Comparison of the Nephrotoxicity of Low Doses of Cadmium and Lead. *Toxics* [Internet]. 2020 Mar 2 [cited 2021 Mar 15];8(1):18. Available from: [www.mdpi.com/journal/toxics](http://www.mdpi.com/journal/toxics)
186. Gargouri M, Soussi A, Akrouti A, Magné C, El Feki A. Ameliorative effects of *spirulina platensis* against lead-induced nephrotoxicity in newborn rats: Modulation of oxidative stress and histopathological changes. *EXCLI J* [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 15];17:215–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5938537/>
187. Albarakati AJA, Baty RS, Aljoudi AM, Habotta OA, Elmahallawy EK, Kassab RB, et al. Luteolin protects against lead acetate-induced nephrotoxicity through antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 15];47(4):2591–603. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05346-1>
188. Satarug S, C. Gobe G, A. Vesey D, Phelps KR. Cadmium and Lead Exposure, Nephrotoxicity, and Mortality. *Toxics* [Internet]. 2020 Oct 13 [cited 2021 Mar 15];8(4):86. Available from: [www.mdpi.com/journal/toxics](http://www.mdpi.com/journal/toxics)
189. Amin KA, Abdel Hameid H, Abd Elsttar AH. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem Toxicol*. 2010 Oct 1;48(10):2994–9.
190. Bowman GL, Shannon J, Frei B, Kaye JA, Quinn JF. Uric acid as a CNS antioxidant. *J Alzheimer's Dis*. 2010;19(4):1331–6.
191. Verma M, Schneider JS. Strain specific effects of low level lead exposure on associative learning and memory in rats. *Neurotoxicology* [Internet]. 2017;62:186–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.07.006>

192. Javorac D, Đorđević AB, Anđelković M, Tatović S, Baralić K, Antonijević E, et al. Redox and essential metal status in the brain of Wistar rats acutely exposed to a cadmium and lead mixture. *Arch Ind Hyg Toxicol* [Internet]. 2020 Sep 1;71(3):197–204. Available from: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/aiht-2020-71-3425>
193. Milovanovic V, Buha A, Matovic V, Curcic M, Vucinic S, Nakano T, et al. Oxidative stress and renal toxicity after subacute exposure to decabrominated diphenyl ether in Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2018;25(8):7223–30.
194. Kwon S-Y, Bae O-N, Noh J-Y, Kim K, Kang S, Shin Y-J, et al. Erythrophagocytosis of Lead-Exposed Erythrocytes by Renal Tubular Cells: Possible Role in Lead-Induced Nephrotoxicity. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2015 Feb;123(2):120–7. Available from: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.1408094>
195. Baş H, Kalender Y. Nephrotoxic effects of lead nitrate exposure in diabetic and nondiabetic rats: Involvement of oxidative stress and the protective role of sodium selenite. *Environ Toxicol* [Internet]. 2016 Oct;31(10):1229–40. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.22130>
196. Mansouri MT, Naghizadeh B, López-Larrubia P, Cauli O. Behavioral deficits induced by lead exposure are accompanied by serotonergic and cholinergic alterations in the prefrontal cortex. *Neurochem Int* [Internet]. 2013 Feb;62(3):232–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019701861200407X>
197. Fibiger HC. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci*. 1991;14(6):220–3.
198. Ademuyiwa O, Ugbaja RN, Rotimi SO, Abam E, Okediran BS, Dosumu OA, et al. Erythrocyte acetylcholinesterase activity as a surrogate indicator of lead-induced neurotoxicity in occupational lead exposure in Abeokuta, Nigeria. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2007;24(2):183–8.
199. Ghareeb DA, Hussien HM, Khalil AA, El-Saadani MA, Ali AN. Toxic effects of lead exposure on the brain of rats: Involvement of oxidative stress, inflammation, acetylcholinesterase, and the beneficial role of flaxseed extract. *Toxicol Environ Chem*. 2010;92(1):187–95.
200. Reddy GR, Basha MR, Devi CB, Suresh A, Baker JL, Shafeek A, et al. Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. *Int J Dev Neurosci*. 2003;21(6):347–52.
201. Basha DC, Rani MU, Devi CB, Kumar MR, Reddy GR. Perinatal lead exposure alters postnatal cholinergic and aminergic system in rat brain: Reversal effect of calcium co-administration. *Int J Dev Neurosci*. 2012;30(4):343–50.
202. Bressler JP, Goldstein GW. Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 1991;41(4):479–84.
203. Antonio MT, Corredor L, Leret ML. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicol Lett*. 2003;143(3):331–40.

204. Hossain S, Bhowmick S, Jahan S, Rozario L, Sarkar M, Islam S, et al. Maternal lead exposure decreases the levels of brain development and cognition-related proteins with concomitant upsurges of oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in the offspring rats. *Neurotoxicology* [Internet]. 2016;56:150–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.07.013>
205. Voorhees JR, Rohlman DS, Lein PJ, Pieper AA. Neurotoxicity in preclinical models of occupational exposure to organophosphorus compounds. *Front Neurosci*. 2017;10(JAN).
206. Bali YA, Kaikai N eddine, Ba-M'hamed S, Bennis M. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology*. 2019;415:18–25.
207. Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Marchlewicz M, Marchetti C, Kurzawski M, Dziechajko V, et al. Disrupted pro- and antioxidative balance as a mechanism of neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead. *Brain Res*. 2012;1435:56–71.
208. Abdulmajeed WI, Sulieman HB, Zubayr MO, Imam A, Amin A, Biliaminu SA, et al. Honey prevents neurobehavioural deficit and oxidative stress induced by lead acetate exposure in male wistar rats- a preliminary study. *Metab Brain Dis*. 2015;31(1):37–44.
209. Chui D, Yang H, Wang H, Ji T, Yu J, Zhang S, et al. The dishomeostasis of metal ions plays an important role for the cognitive impairment. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2013 Sep 13;8(S1):P13. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71245130%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1186/1750-1326-8-S1-P13%5Cnhttp://resolver.lib.washington.edu/resserv?sid=EMBASE&issn=17501326&id=doi:10.1186%2F1750-1326-8-S1-P13&atitle=The+dishom>
210. Karri V, Schuhmacher M, Kumar V. Heavy metals (Pb, Cd, As and MeHg) as risk factors for cognitive dysfunction: A general review of metal mixture mechanism in brain. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2016;48:203–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.016>
211. Ben Mimouna S, Boughammoura S, Chemek M, Haouas Z, Banni M, Messaoudi I. Disruption of the zinc metabolism in rat foetal brain after prenatal exposure to cadmium. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2018;286(January):88–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.03.005>
212. Sandstead HH, Frederickson CJ, Penland JG. History of zinc as related to brain function. *J Nutr*. 2000;130(2 SUPPL.).
213. Sandstead HH. Zinc is Essential for Brain Development and Function. *J Trace Elem Exp Med*. 2003;16(4):165–73.
214. Fu X, Zeng A, Zheng W, Du Y. Upregulation of zinc transporter 2 in the blood-CSF barrier following lead exposure. *Exp Biol Med*. 2014;239(2):202–12.
215. Reshma Anjum M, Madhu P, Pratap Reddy K, Sreenivasula Reddy P. The protective effects of zinc in lead-induced testicular and epididymal toxicity in Wistar rats. *Toxicol Ind Health*. 2017;33(3):265–76.



216. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med.* 2005;26(4-5 SPEC. ISS.):340–52.
217. Porta A, Rienzo M Di, Wessel N, Kurths J. Addressing the complexity of cardiovascular regulation. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci.* 2009;367(1892):1215–8.
218. Chevion M, Jiang Y, Har-El R, Berenshtein E, Uretzky G, Kitrossky N. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 1993 Feb 1;90(3):1102–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.90.3.1102>
219. Xiao Y, Wang T, Song X, Yang D, Chu Q, Kang YJ. Copper promotion of myocardial regeneration. *Exp Biol Med.* 2020;245(10):911–21.
220. Finney L, Vogt S, Fukai T, Glesne D. Copper and angiogenesis: Unravelling a relationship key to cancer progression. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36(1):88–94.
221. Chen Z, Huo X, Chen G, Luo X, Xu X. Lead (Pb) exposure and heart failure risk. *Environ Sci Pollut Res.* 2021;28833–47.
222. Sun J, Cai X, Wang C, Du K, Chen W, Feng F, et al. Cascade Reactions by Nitric Oxide and Hydrogen Radical for Anti-Hypoxia Photodynamic Therapy Using an Activatable Photosensitizer. *J Am Chem Soc.* 2021;143(2):868–78.
223. Guidarelli A, Catalani A, Spina A, Varone E, Fumagalli S, Zito E, et al. Functional organization of the endoplasmic reticulum dictates the susceptibility of target cells to arsenite-induced mitochondrial superoxide formation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Food Chem Toxicol [Internet].* 2021 Oct;156:112523. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691521005561>
224. Başaran N, Duydu Y, Bacanlı M, Gül Anlar H, DİLSİZ SA, Üstündağ A, et al. Evaluation of oxidative stress and immune parameters of boron exposed males and females. *Food Chem Toxicol [Internet].* 2020 Aug;142:111488. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691520303781>
225. Roshan VD, Assali M, Moghaddam AH, Hosseinzadeh M, Myers J. Exercise training and antioxidants: Effects on rat heart tissue exposed to lead acetate. *Int J Toxicol.* 2011;30(2):190–6.
226. Ray SD, Farris FF, Hartmann AC. Hormesis. In: *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition [Internet].* Elsevier; 2014. p. 944–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543003985>
227. Tsatsakis AM, Docea AO, Calina D, Buga AM, Zlatian O, Gutnikov S, et al. Hormetic Neurobehavioral effects of low dose toxic chemical mixtures in real-life risk simulation (RLRS) in rats. *Food Chem Toxicol.* 2019;125:141–9.
228. Protsenko YL, Katsnelson BA, Klinova S V., Lookin ON, Balakin AA, Nikitina L V., et al. Effects of subchronic lead intoxication of rats on the myocardium contractility [Internet]. Vol. 120, *Food and Chemical Toxicology.* Elsevier Ltd; 2018. 378–389 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.034>

229. Lai B, Murthy RC, Anand M, Chandra S V., Kumar R, Tripathi O, et al. Cardiotoxicity and hypertension in rats after oral lead exposure. *Drug Chem Toxicol.* 1991;14(3):305–18.
230. Obeng-Gyasi E, Obeng-Gyasi B. Blood Pressure and Oxidative Stress among U.S. Adults Exposed to Lead in Military Environments—A Preliminary Study. *Diseases.* 2018;6(4):97.
231. Jing J, Thapa S, Delhey L, Abouelenein S, Morad W, Delongchamp R, et al. The relation of blood lead and QRS-T angle in American adults. *Arch Environ Occup Heal.* 2019;74(5):287–91.
232. Sharma P, Purohit P. Lead exposure exacerbates cardiovascular risk. *Indian J Clin Biochem.* 2014;29(2):117–8.
233. Rotter I, Kosik-Bogacka DI, Dołęgowska B, Safranow K, Kuczyńska M, Laszczyńska M. Analysis of the relationship between the blood concentration of several metals, macro- and micronutrients and endocrine disorders associated with male aging. *Environ Geochem Health.* 2016;38(3):749–61.
234. López-Botella A, Velasco I, Acién M, Sáez-Espinosa P, Todolí-Torró J-L, Sánchez-Romero R, et al. Impact of Heavy Metals on Human Male Fertility—An Overview. *Antioxidants* [Internet]. 2021 Sep 15;10(9):1473. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/9/1473>
235. Ahmed HA, Ali HA, Mutar TF. Protective effects of olive leaf extract against reproductive toxicity of the lead acetate in rats. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2021 Nov 3;28(44):63102–10. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11356-021-15240-3>
236. Reshma Anjum M, Madhu P, Pratap Reddy K, Sreenivasula Reddy P, Anjum MR, Madhu P, et al. The protective effects of zinc in lead-induced testicular and epididymal toxicity in Wistar rats. *Toxicol Ind Health* [Internet]. 2017 Mar 9;33(3):265–76. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233716637543>
237. SAXENA DK, LAL B, MURTHY RC, CHANDRA SV. Lead induced histochemical changes in the testes of rats. *Ind Health* [Internet]. 1984;22(4):255–60. Available from: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/indhealth1963/22/4/22\\_4\\_255/\\_article](http://www.jstage.jst.go.jp/article/indhealth1963/22/4/22_4_255/_article)
238. Lakshmi Priya MD, Geetha A. Level of trace elements (copper, zinc, magnesium and selenium) and toxic elements (lead and mercury) in the hair and nail of children with autism. *Biol Trace Elem Res.* 2011;142(2):148–58.
239. Ayinde OC, Ogunnowo S, Ogedegbe RA. Influence of Vitamin C and Vitamin E on testicular zinc content and testicular toxicity in lead exposed albino rats. *BMC Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2012 Dec 14;13(1):17. Available from: <https://bmcpharmacoltoxicol.biomedcentral.com/articles/10.1186/2050-6511-13-17>
240. Reddy A, Kumar P, Reddy Y, Rao T, Haritha C, Kumar B. Protective role of N-Acetyl L-Cysteine against reproductive toxicity due to interaction of lead and cadmium in male Wistar rats. *J Nat Sci Biol Med* [Internet]. 2013;4(2):414. Available from: <http://www.jnsbm.org/text.asp?2013/4/2/414/117021>
241. Tvrdá E, Lukáč N, Schneidgenová M, Lukáčová J, Szabó C, Goc Z, et al. Impact of Seminal Chemical Elements on the Oxidative Balance in Bovine Seminal Plasma and Spermatozoa. *J*

Vet Med [Internet]. 2013 Sep 9;2013:1–8. Available from:  
<https://www.hindawi.com/journals/jvm/2013/125096/>

242. Javorac D, Antonijević B, Anđelković M, Repić A, Bulat P, Djordjevic AB, et al. Oxidative stress, metallomics and blood toxicity after subacute low-level lead exposure in Wistar rats: Benchmark dose analyses. *Environ Pollut* [Internet]. 2021 Dec 15 [cited 2021 Sep 15];291:118103. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749121016857>
243. Nie X, Chen Y, Chen Y, Chen C, Han B, Li Q, et al. Lead and cadmium exposure, higher thyroid antibodies and thyroid dysfunction in Chinese women. *Environ Pollut* [Internet]. 2017 Nov;230:320–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.052>
244. Chaurasia SS, Kar A. Protective effects of vitamin E against lead-induced deterioration of membrane associated type-I iodothyronine 5'-monodeiodinase (5'D-I) activity in male mice. *Toxicology*. 1997;124(3):203–9.
245. Benvenega S, Feldt-Rasmussen U, Bonofiglio D, Asamoah E. Nutraceutical Supplements in the Thyroid Setting: Health Benefits beyond Basic Nutrition. *Nutrients* [Internet]. 2019 Sep 13;11(9):2214. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/9/2214>
246. Zimmermann MB, Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2015 Apr;3(4):286–95. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213858714702256>
247. Stojšavljević A, Rovčanin B. Impact of Essential and Toxic Trace Metals on Thyroid Health and Cancer: A Review. *Expo Heal* [Internet]. 2021 Dec 1;13(4):613–27. Available from:  
<https://link.springer.com/10.1007/s12403-021-00406-8>
248. Yousif A, Ahmed A. Effects of cadmium (Cd) and lead (Pb) on the structure and function of thyroid gland. *African J Environ Sci Technol*. 2009;3(3):78–85.
249. Ibrahim NM, Eweis EA, El-Beltagi HS, Abdel-Mobdy YE. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2012;2(1):41–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60187-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60187-1)
250. He X, Lin F, Li Y, Chen Y, Li J, Guo L, et al. Effect of LA on the Growth and Development of the Main Organs in Female Mice. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2017 Jan 1;175(1):169–76. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12011-016-0757-5>
251. Li N, Zhao Y, Shen Y, Cheng Y, Qiao M, Song L, et al. Protective effects of folic acid on oxidative damage of rat spleen induced by lead acetate. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2021 Mar;211:111917. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651321000282>
252. Tian L, Lawrence DA. Lead inhibits nitric oxide production in vitro by murine splenic macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995;132(1):156–63.
253. Li S, Zhao Z, Zhou X, Liu S. The effect of lead on intracellular Ca<sup>2+</sup> in mouse lymphocytes. *Toxicol Vitro*. 2008;22(8):1815–9.
254. Zhou F, Chen Y, Fan G, Feng C, Du G, Zhu G, et al. Lead-induced iron overload and

- attenuated effects of ferroportin 1 overexpression in PC12 cells. *Toxicol Vitr* [Internet]. 2014;28(8):1339–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.07.005>
255. Hidioglou M. Zinc, Copper and Manganese Deficiencies and the Ruminant Skeleton: a Review. *Can J Anim Sci* [Internet]. 1980 Sep 1;60(3):579–90. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.4141/cjas80-068>
256. Wang M, Phadke M, Packard D, Yadav D, Gorelick F. Zinc: Roles in pancreatic physiology and disease. *Pancreatology* [Internet]. 2020 Oct;20(7):1413–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1424390320306657>
257. CDC. What do Parents Need To Know to Protect Their Children? Retrieved from [http://www.cdc.gov/nceh/lead/ACCLPP/blood\\_lead\\_levels.htm](http://www.cdc.gov/nceh/lead/ACCLPP/blood_lead_levels.htm). 2017;
258. EFSA CONTAM Panel. Scientific opinion on lead in food. *EFSA J* [Internet]. 2010 Apr;8(4):1570 (1-146). Available from: doi:10.2903/j.efsa.2010.1570
259. Antonijevic E, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Andjelkovic M, Djordjevic AB, et al. Comparison of oximes K203 and K027 based on Benchmark dose analysis of rat diaphragmal acetylcholinesterase reactivation. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2019;308:385–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.034>
260. Antonijevic E, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Curcic M, Miladinovic DC, et al. Dose-response modeling of reactivating potency of oximes K027 and K203 against a direct acetylcholinesterase inhibitor in rat erythrocytes. *Food Chem Toxicol*. 2018;121:224–30.

# PRILOZI

## Prilog 1. Sveobuhvatan prikaz rezultata dobijenih *Benchmark* modelovanjem

**Tabela 1.** Rezultati dobijeni modelovanja odnosa eksterne doze olova-odgovor za efekte olova u krvi upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	Model	Loglik.	No.par.	AIC	Model weights	BMDL (mg Pb/kg)	BMDU (mg Pb/kg)
<b>HGB</b>	full model	63.33	8	-110.66	-	-	-
	null model	52.81	2	-101.62	-	-	-
	Expon. m3-	58.51	4	-109.02	0.25	6.76	15.2
	Expon. m5-	58.51	5	-107.02	-	-	-
	Hill m3-	58.51	4	-109.02	0.25	6.78	15.2
	Hill m5-	55.51	5	-101.02	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	58.51	4	-109.02	0.25	6.9	15.2
	Inv.Expon. m5-	58.49	5	-106.98	-	-	-
	LN m3-	58.51	4	-109.02	0.25	6.88	15.2
	LN m5-	58.5	5	-107	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	6.41	15.1
<b>Holesterol</b>	full model	23.61	8	-31.22	-	-	-
	null model	14.69	2	-25.38	-	-	-
	Expon. m3-	18.19	4	-28.38	0.2639	-	-
	Expon. m5-	18.19	5	-26.38	-	-	-
	Hill m3-	18.19	4	-28.38	0.2639	-	-
	Hill m5-	18.19	5	-26.38	-	-	-
	<b>Inv.Expon. m3-</b>	18.19	4	-27.86	0.2666	0.0079	13.5
	Inv.Expon. m5-	18.2	5	-26.4	-	-	-
	LN m3-	18.2	4	-28.4	0.2056	-	-
	LN m5-	18.2	5	-26.4	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	0.00405	11.3
<b>CRE</b>	full model	72.57	8	-129.14	-	-	-
	null model	58.42	2	-112.84	-	-	-
	Expon. m3-	62.35	4	-116.7	0.3042	11.9	17.3
	Expon. m5-	62.35	5	-114.7	-	-	-
	Hill m3-	62	4	-116	0.2144	-	-
	Hill m5-	62	5	-114	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	62.16	4	-116.32	0.2516	-	-
	Inv.Expon. m5-	60.41	5	-110.82	-	-	-
	LN m3-	62.07	4	-116.14	0.2299	-	-
	LN m5-	61.96	5	-113.92	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	7.72	16.9
<b>HDL</b>	full model	26.22	8	-36.44	-	-	-
	null model	19.27	2	-34.54	-	-	-
	Expon. m3-	22.52	4	-37.04	0.2556	0.0242	14.5
	Expon. m5-	22.52	5	-35.04	-	-	-
	Hill m3-	22.52	4	-37.04	0.2556	0.0241	15
	Hill m5-	22.52	5	-35.04	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	22.47	4	-36.94	0.2432	-	-
	Inv.Expon. m5-	22.5	5	-35	-	-	-
	LN m3-	22.48	4	-36.96	0.2456	-	-
	LN m5-	22.5	5	-35	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	0.0937	12.5
<b>UA</b>	full model	25.31	8	-34.62	-	-	-
	null model	11.07	2	-18.14	-	-	-
	<b>Expon. m3-</b>	15.65	4	-23.3	0.3371	6.7	12.8
	Expon. m5-	15.65	5	-21.3	-	-	-
	Hill m3-	15.28	4	-22.56	0.2329	-	-
	Hill m5-	13.61	5	-17.22	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	15.19	4	-22.38	0.2128	-	-
	Inv.Expon. m5-	14.81	5	-19.62	-	-	-
	LN m3-	15.21	4	-22.42	0.2171	-	-
	LN m5-	15.03	5	-20.06	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	0.725	11.3
<b>SOD</b>	full model	50.85	8	-85.7	-	-	-

Parametar	Model	Loglik.	No.par.	AIC	Model weights	BMDL (mg Pb/kg)	BMDU (mg Pb/kg)
	null model	43.02	2	-82.04	-	-	-
	Expon. m3-	46.8	4	-85.6	0.1407	-	-
	Expon. m5-	47.13	5	-84.26	-	-	-
	Hill m3-	47.46	4	-86.92	0.2723	-	-
	Hill m5-	47.87	5	-85.74	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	47.55	4	-87.1	0.2979	0.000315	4.85
	Inv.Expon. m5-	47.36	5	-84.72	-	-	-
	LN m3-	47.52	4	-87.04	0.2891	-	-
	LN m5-	47.9	5	-85.8	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	0.000493	12.3
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	full model	7.51	8	0.98	-	-	-
	null model	-1.51	2	7.02	-	-	-
	Expon. m3-	3.68	4	0.64	-	-	-
	Expon. m5-	5.14	5	-0.279	0.2784	2.19e-06	0.527
	Hill m3-	3.96	4	0.080	0.2326	-	-
	Hill m5-	4.96	5	0.080	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	4.01	4	-0.019	0.2445	-	-
	Inv.Expon. m5-	4.73	5	0.539	-	-	-
	LN m3-	3.99	4	0.019	-	-	-
	LN m5-	5.01	5	-0.019	0.2445	-	-
Model averaging	-	-	-	-	2.13e-06	0.385	
<b>Zn</b>	full model	1.04	8	13.92	-	-	-
	null model	-14.57	2	33.14	-	-	-
	Expon. m3-	-11.43	4	30.86	-	-	-
	Expon. m5-	-5.19	5	20.38	0.8201	0.788	1.85
	Hill m3-	-11.43	4	30.86	-	-	-
	Hill m5-	-6.82	5	23.64	0.1607	-	-
	Inv.Expon. m3-	-11.34	4	30.68	0.0048	-	-
	Inv.Expon. m5-	-10.52	5	31.04	-	-	-
	LN m3-	-11.38	4	30.76	0.0144	-	-
	LN m5-	-9.23	5	28.46	-	-	-
Model averaging	-	-	-	-	0.00203	1.37	
<b>Cu</b>	full model	-17.99	8	51.98	-	-	-
	null model	-25.59	2	55.18	-	-	-
	Expon. m3-	-22.17	4	52.34	0.2359	-	-
	Expon. m5-	-22.63	5	55.26	-	-	-
	Hill m3-	-22.08	4	52.16	0.2581	4.55e-09	4.53
	Hill m5-	-22.96	5	55.92	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	-22.11	4	52.22	0.2505	-	-
	Inv.Expon. m5-	-22.12	5	54.24	-	-	-
	LN m3-	-22.09	4	52.18	0.2555	-	-
	LN m5-	-23.01	5	56.02	-	-	-
Model averaging	-	-	-	-	1.38e-06	3.91	
<b>Fe</b>	full model	25.64	8	-35.28	-	-	-
	null model	16.41	2	-28.82	-	-	-
	Expon. m3-	20.08	4	-32.16	0.2437	-	-
	Expon. m5-	20.34	5	-30.68	-	-	-
	Hill m3-	20.08	4	-32.16	0.2437	-	-
	Hill m5-	20.59	5	-31.18	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	20.15	4	-32.3	0.2614	0.000325	8.98
	Inv.Expon. m5-	20.55	5	-31.1	-	-	-
	LN m3-	20.11	4	-32.22	0.2511	-	-
	LN m5-	20.64	5	-31.28	-	-	-
Model averaging	-	-	-	-	0.0108	11	

Verovatnoća (Loglik.), Broj parametara (No.par.), *Akaike information criterion* (AIC), Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), Gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), Nivoi olova u krvi (BLL), hemoglobin (HGB), kreatinin (CRE), HDL holesterol (HDL), superoksid dismutaza (SOD), superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

**Tabela 2.** Rezultati dobijeni modelovanja odnosa interne doze olova (BLL,  $\mu\text{g/dL}$ )-odgovor za efekte olova u krvi pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Parametar	Model	Loglik.	No.par.	AIC	Model weights	BMDL ( $\mu\text{g Pb/dL}$ )	BMDU ( $\mu\text{g Pb/dL}$ )
<b>HGB</b>	full	NA	NA	NA	-	-	-
	null model	52.81	2	-101.62	-	-	-
	Expon. m3-	57.99	4	-107.98	0.2587	4.99	18.4
	Expon. m5-	57.99	5	-105.98	-	-	-
	Hill m3-	57.99	4	-107.98	0.2587	4.99	18.3
	Hill m5-	57.99	5	-105.98	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	57.9	4	-107.8	0.2365	-	-
	Inv.Expon. m5-	57.88	5	-105.76	-	-	-
	LN m3-	57.94	4	-107.88	0.2461	-	-
	LN m5-	57.93	5	-105.86	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	5.77	17.9
<b>Holesterol</b>	full	NA	NA	NA	-	-	-
	null model	14.69	2	-25.38	-	-	-
	Expon. m3-	17.73	4	-27.46	-	-	-
	Expon. m5-	18.76	5	-27.52	0.2417	-	-
	Hill m3-	17.73	4	-27.46	0.2345	-	-
	Hill m5-	18.47	5	-26.94	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	17.87	4	-27.74	0.2698	1.68	14.7
	Inv.Expon. m5-	18.01	5	-26.02	-	-	-
	LN m3-	17.81	4	-27.62	0.2541	-	-
	LN m5-	18.03	5	-26.06	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	0.223	14
<b>CRE</b>	full	NA	NA	NA	-	-	-
	null model	58.42	2	-112.84	-	-	-
	Expon. m3-	61.55	4	-115.1	0.2506	0.172	353
	Expon. m5-	61.55	5	-113.1	-	-	-
	Hill m3-	61.55	4	-115.1	0.2506	0.00405	418
	Hill m5-	61.55	5	-113.1	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	61.54	4	-115.08	0.2481	-	-
	Inv.Expon. m5-	61.54	5	-113.08	-	-	-
	LN m3-	61.55	4	-115.1	0.2506	0.00188	526
	LN m5-	61.55	5	-113.1	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	0.000561	31
<b>HDL</b>	full	NA	NA	NA	-	-	-
	null model	19.27	2	-34.54	-	-	-
	Expon. m3-	22.61	4	-37.22	-	-	-
	Expon. m5-	23.75	5	-37.5	0.2644	3.91	11.1
	Hill m3-	22.61	4	-37.22	0.2299	-	-
	Hill m5-	23.46	5	-36.92	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	22.73	4	-37.46	0.2592	-	-
	Inv.Expon. m5-	22.89	5	-35.78	-	-	-
	LN m3-	22.68	4	-37.36	0.2465	-	-
	LN m5-	22.93	5	-35.86	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	1.29	12.8
<b>Urea</b>	full	NA	NA	NA	-	-	-
	null model	37.17	2	-70.34	-	-	-
	Expon. m3-	40.18	4	-72.36	0.3485	11.6	20.1
	Expon. m5-	40.18	5	-70.36	-	-	-
	Hill m3-	39.75	4	-71.5	0.2267	-	-
	Hill m5-	39.74	5	-69.48	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	39.68	4	-71.36	0.2114	-	-
	Inv.Expon. m5-	39.44	5	-68.88	-	-	-
	LN m3-	39.69	4	-71.38	0.2135	-	-
	LN m5-	39.56	5	-69.12	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	3.68	29.7
<b>AOPP</b>	full	NA	NA	NA	-	-	-
	null model	13.58	2	-23.16	-	-	-
	Expon. m3-	16.81	4	-25.62	0.2463	-	-
	Expon. m5-	16.82	5	-23.64	-	-	-
	Hill m3-	16.83	4	-25.66	0.2512	0.00	10.4
	Hill m5-	16.83	5	-23.66	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	16.83	4	-25.66	0.2512	6.29e-10	8.32

Parametar	Model	Loglik.	No.par.	AIC	Model weights	BMDL (µg Pb/dL)	BMDU (µg Pb/dL)
	Inv.Expon. m5-	16.83	5	-23.66	-	-	-
	LN m3-	16.83	4	-25.66	0.2512	0.00	8.89
	LN m5-	16.83	5	-23.66	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	3.69e-06	9.15
<b>Fe</b>	full	NA	NA	NA	-	-	-
	null model	16.41	2	-28.82	-	-	-
	Expon. m3-	20.99	4	-33.98	0.2306	-	-
	Expon. m5-	21.67	5	-33.34	-	-	-
	Hill m3-	21	4	-34	0.233	-	-
	Hill m5-	21.75	5	-33.5	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	21.18	4	-34.36	0.2789	0.585	9.21
	Inv.Expon. m5-	21.51	5	-33.02	-	-	-
	LN m3-	21.1	4	-34.2	0.2575	-	-
	LN m5-	21.65	5	-33.3	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	0.00596	11.3

Verovatnoća (Loglik.), Broj parametara (No.par.), *Akaike information criterion* (AIC), Donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), Gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), Nivoi olova u krvi (BLL), hemoglobin (HGB), kreatinin (CRE), HDL holesterol (HDL), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP)



**Tabela 3.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksterne i interne doze olova-odgovor za efekte olova na hormone u serumu pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Eksterna doza-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (mgPb/kg)	BMDU (mgPb/kg)
Testosteron	full model	-19.91	8	55.82	/	/	/
	null model	-35.99	2	75.98	/	/	/
	Expon. m3-	-25.6	4	59.2	0.2406	0	0.0141
	Expon. m5-	-25.01	5	60.02	/	/	/
	Hill m3-	-25.59	4	59.18	0.2431	0	0.0142
	Hill m5-	-25.27	5	60.54	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	-25.51	4	59.02	0.2633	0	0.0465
	Inv.Expon. m5-	-25.34	5	60.68	/	/	/
	LN m3-	-25.55	4	59.1	0.253	0	0.0296
	LN m5-	-25.31	5	60.62	/	/	/
	Model averaging					1.07e-06	0.243
T4	full model	22.33	8	-28.66	/	/	/
	null model	15.55	2	-27.1	/	/	/
	Expon. m3-	18.92	4	-29.84	0.2462	0.000652	4.86
	Expon. m5-	18.93	5	-27.86	/	/	/
	Hill m3-	18.92	4	-29.84	0.2462	1.01e-05	4.87
	Hill m5-	18.97	5	-27.94	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	17.53	4	-27.06	0.2563	4.49e-06	4.34
	Inv.Expon. m5-	19.04	5	-28.08	/	/	/
	LN m3-	18.93	4	-29.86	0.2512	5.29e-06	4.58
	LN m5-	18.98	5	-27.96	/	/	/
	Model averaging					0,00256	7.4
ft4	full model	-2.57	8	21.14	/	/	/
	null model	-17.49	2	38.98	/	/	/
	Expon. m3-	-10.1	4	28.2	0.292	0.00093	8,71
	Expon. m5-	-10.13	5	30.26	/	/	/
	Hill m3-	-10.11	4	28.22	0.292	9.55e-06	8,61
	Hill m5-	-10.12	5	30.24	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	-10.32	4	28.64	0.1211	/	/
	Inv.Expon. m5-	-10.39	5	30.78	/	/	/
	LN m3-	-10.23	4	28.46	0.2949	3.34e-06	7.06
	LN m5-	-10.27	5	30.54	/	/	/
	Model averaging					4.6e-05	9.92
Interna doza (BLL, µg/dL)-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (µgPb/dL)	BMDU (µgPb/dL)
Testosteron	full	NA	NA	NA	NA	/	/
	null model	-35.99	2	75.98	/	/	/
	Expon. m3-	-30.45	4	68.9	0.0201	0	2.24
	Expon. m5-	-30.3	5	70.6	/	/	/
	Hill m3-	-30.45	4	68.9	0.0035	0	2.67
	Hill m5-	-30.3	5	70.6	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	-30.4	4	68.8	0.2576	0	2.96
	Inv.Expon. m5-	-30.3	5	70.6	/	/	/
	LN m3-	-30.42	4	68.84	0.2525	0	2.26
	LN m5-	-30.28	5	70.56	/	/	/
	Model averaging					1.82e-06	3.45

Verovatnoća (Loglik.), broj parametara (No.par.), *akaike information criterion* (AIC), donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), nivoi olova u krvi (BLL)

**Tabela 4.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksterne i interne doze olova-odgovor za efekte olova na jetru pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Eksterna doza-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (mgPb/kg)	BMDU (mgPb/kg)
AOPP	full model	33.74	8	-51.48	/	/	/
	null model	26.74	2	-49.48	/	/	/
	Expon. m3-	29.24	4	-50.48	0.1671	/	/
	Expon. m5-	29.62	5	-49.24	/	/	/
	Hill m3-	29.69	4	-51.38	0.2621	/	/
	Hill m5-	29.99	5	-49.98	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	29.79	4	-51.58	0.2897	1.16e-05	6,18
	Inv.Expon. m5-	30	5	-50	/	/	/
	LN m3-	29.76	4	-51.52	0.2811	2.19e-05	7,29
	LN m5-	29.99	5	-49.98	/	/	/
Model averaging						0.000248	13.4
Cu	full model	-1.2	8	18.4	/	/	/
	null model	-13.5	2	31	/	/	/
	Expon. m3-	-2.22	4	12.44	0.2612	9.66e-05	0.342
	Expon. m5-	-2.22	5	14.44	/	/	/
	Hill m3-	-2.22	4	12.44	0.2612	0.0014	4.87
	Hill m5-	-2.23	5	14.46	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	-2.34	4	12.68	0.2317	4.49e-06	4.34
	Inv.Expon. m5-	-2.38	5	14.76	/	/	/
	LN m3-	-2.28	4	12.56	0.246	5.29e-06	4.58
	LN m5-	-2.31	5	14.62	/	/	/
Model averaging						2.66e-06	0.327
Interna doza (BLL, µg/dL)-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (µgPb/dL)	BMDU (µgPb/dL)
Cu	full	NA	NA	NA	/	/	/
	Expon. m3-	-7.45	4	22.9	0.2582	4.3e-05	4.33
	Expon. m5-	-7.25	5	24.5	/	/	/
	Hill m3-	-7.44	4	22.88	0.2456	0	4.32
	Hill m5-	-7.3	5	24.6	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	-7.39	4	22.78	0.2582	0.000215	4.94
	Inv.Expon. m5-	-7.33	5	24.66	/	/	/
	LN m3-	-7.41	4	22.82	0.2531	1.81e-05	4.7
	LN m5-	-7.31	5	24.62	/	/	/
	Model averaging						1.39e-05
Interna doza (ng/g)-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (ngPb/g)	BMDU (ngPb/g)
Cu	full	NA	NA	NA	/	/	/
	null model	-13.21	2	30.42	/	/	/
	Expon. m3-	-7.03	4	22.06	/	/	/
	Expon. m5-	-5.65	5	21.3	0,2913	0,0001	182
	Hill m3-	-7.03	4	22.06	/	/	/
	Hill m5-	-5.62	5	21.24	0,302	0,0087	134
	Inv.Expon. m3-	-7.01	4	22.02	0,2032	0	69.6
	Inv.Expon. m5-	-6.58	5	23.16	/	/	/
	LN m3-	-7.02	4	22.04	/	/	/
	LN m5-	-6	5	22	0,2053	0	90.4
Model averaging						2.37e-06	102

Verovatnoća (Loglik.), broj parametara (No.par.), *akaike information criterion* (AIC), donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), nivoi olova u krvi (BLL), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP)

**Tabela 5.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksterne doze olova-odgovor za efekte olova na bubrege pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

<b>Eksterna doza-odgovor</b>							
<b>Parametar</b>	<b>Model</b>	<b>Loglik.</b>	<b>No.par</b>	<b>AIC</b>	<b>Model weights</b>	<b>BMDL (mgPb/kg)</b>	<b>BMDU (mgPb/kg)</b>
<b>SOD</b>	full model	-23.06	8	62.12	/	/	/
	null model	-28.58	2	61.16	/	/	/
	Expon. m3-	-25.63	4	59.26	0.2322	0	0
	Expon. m5-	-24.82	5	59.64	/	/	/
	Hill m3-	-25.37	4	58.82	0.2893	0	0.050
	Hill m5-	-24.95	5	59.9	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	-26.25	4	60.5	0.162	0	0
	Inv.Expon. m5-	-24.99	5	59.98	/	/	/
	LN m3-	-25.28	4	58.64	0.3165	0	0.054
	LN m5-	-24.93	5	59.86	/	/	/
	Model averaging						1.27e-06

Verovatnoća (Loglik.), broj parametara (No.par.), *akaike information criterion* (AIC), donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), nivoi olova u krvi (BLL), superoksid dismutaza (SOD)

**Tabela 6.** Rezultati dobijeni modelovanja odnosa eksterne i interne doze olova-odgovor za efekte olova u mozgu pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Eksterna doza-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (mg Pb/kg)	BMDU (mg Pb/kg)
<b>AOPP</b>	full model	26.45	8	-36.9	-	-	-
	null model	22.35	2	-40.7	-	-	-
	Expon. m3-	26.13	4	-44.26	0.2462	-	-
	Expon. m5-	26.23	5	-42.46	-	-	-
	Hill m3-	26.13	4	-44.26	0.2462	-	-
	Hill m5-	26.29	5	-42.58	-	-	-
	<b>Inv.Expon. m3-</b>	26.17	4	-44.34	0.2563	3.76e-05	5.99
	Inv.Expon. m5-	26.3	5	-42.6	-	-	-
	LN m3-	26.15	4	-44.3	0.2512	-	-
	LN m5-	26.28	5	-42.56	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	0.000822	6.96
<b>TOS</b>	full	NA	NA	NA	-	-	-
	null model	-79.26	2	162.52	-	-	-
	Expon. m3-	-73.12	4	154.24	-	-	-
	<b>Expon. m5-</b>	-70.6	5	151.2	0.2817	0	0.129
	Hill m3-	-73.07	4	154.14	-	-	-
	Hill m5-	-71.64	5	153.28	0.2706	-	-
	Inv.Expon. m3-	-72.96	4	153.92	0.2216	-	-
	Inv.Expon. m5-	-72.73	5	155.46	-	-	-
	LN m3-	-73.02	4	154.04	0.2261	-	-
	LN m5-	-72.41	5	154.82	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	4.49e-06	0.48
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	full model	-9.16	8	34.32	-	-	-
	null model	-16.37	2	36.74	-	-	-
	Expon. m3-	-9.97	4	27.94	0.24	-	-
	Expon. m5-	-9.51	5	29.02	-	-	-
	Hill m3-	-9.97	4	27.94	0.24	-	-
	Hill m5-	-9.45	5	28.9	-	-	-
	<b>Inv.Expon. m3-</b>	-9.87	4	27.74	0.2652	0	0.485
	Inv.Expon. m5-	-9.41	5	28.82	-	-	-
	LN m3-	-9.91	4	27.82	0.2548	-	-
	LN m5-	-9.44	5	28.88	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	5.17e-06	1.51
<b>Zn</b>	full model	36.55	8	-57.1	-	-	-
	null model	23.79	2	-43.58	-	-	-
	Expon. m3-	26.68	4	-45.36	0.2251	-	-
	Expon. m5-	27.39	5	-44.78	-	-	-
	<b>Hill m3-</b>	27.18	4	-46.36	0.3712	2.89e-05	1.75
	Hill m5-	27.55	5	-45.1	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	23.79	4	-39.58	0.2099	-	-
	Inv.Expon. m5-	27.61	5	-45.22	-	-	-
	LN m3-	23.79	4	-39.58	0.1938	-	-
	LN m5-	27.53	5	-45.06	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	6.27e-06	12.6
Interna doza (BLL, µg/dL)-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (µg Pb/dL)	BMDU <sub>5</sub> (µg Pb/dL)
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	full	NA	NA	NA	-	-	-
	null model	-16.37	2	36.74	-	-	-
	<b>Expon. m3-</b>	-12.52	4	33.04	0.2512	1.15e-05	5.85
	Expon. m5-	-12.52	5	35.04	-	-	-
	<b>Hill m3-</b>	-12.52	4	33.04	0.2512	0	5.87
	Hill m5-	-12.52	5	35.04	-	-	-
	Inv.Expon. m3-	-12.53	4	33.06	0.2488	-	-
	Inv.Expon. m5-	-12.54	5	35.08	-	-	-
	LN m3-	-12.53	4	33.06	0.2488	-	-
	LN m5-	-12.53	5	35.06	-	-	-
	Model averaging	-	-	-	-	3.05e-06	5.37

Verovatnoća (Loglik.), broj parametara (No.par.), akaike information criterion (AIC), donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), nivoi olova u krvi (BLL), uznapredovali produkti oksidacije proteina (AOPP), superoksid anjon radikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), totalni oksidativni status (TOS)

**Tabela 7.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksterne i internih doza olova-odgovor za efekte olova u srcu pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Eksterna doza-odgovor								
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (mgPb/kg)	BMDU (mgPb/kg)	
MDA	full model	-2.57	8	21.14	/	/	/	
	null model	-17.49	2	38.98	/	/	/	
	Expon. m3-	-10.1	4	28.2	0.2724	7.14e-06	9.25	
	Expon. m5-	-10.13	5	30.26	/	/	/	
	Hill m3-	-10.11	4	28.22	0.2697	0	4.54	
	Hill m5-	-10.12	5	30.24	/	/	/	
	Inv.Expon. m3-	-10.32	4	28.64	0.2186	0	6.56	
	Inv.Expon. m5-	-10.39	5	30.78	/	/	/	
	LN m3-	-10.23	4	28.46	0.2392	0	4.96	
	LN m5-	-10.27	5	30.54	/	/	/	
	Model averaging						2.23e-06	1.76
	Interna doza (BLL, µg/dL)-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (µgPb/dL)	BMDU (µgPb/dL)	
MDA	full	NA	NA	NA	/	/	/	
	null model	-17.49	2	38.98	/	/	/	
	Expon. m3-	-13.96	4	35.92	/	/	/	
	Expon. m5-	-11.66	5	33.32	0.5009	3.45	8.68	
	Hill m3-	-13.95	4	35.9	/	/	/	
	Hill m5-	-12.73	5	35.46	0.1718	1.63	7.86	
	Inv.Expon. m3-	-13.73	4	35.46	0.1718	0.521	9.57	
	Inv.Expon. m5-	-13.53	5	37.06	/	/	/	
	LN m3-	-13.83	4	35.66	0.1555	1.63	7.86	
	LN m5-	-13.46	5	36.92	/	/	/	
	Model averaging						0.398	8.89
	Cu	full	NA	NA	NA	/	/	/
null model		7.74	2	-11.48	/	/	/	
Expon. m3-		11.2	4	-14.4	0.4838	10.3	16.5	
Expon. m5-		11.19	5	-12.38	/	/	/	
Hill m3-		10.34	4	-12.68	0.2047	/	/	
Hill m5-		10.32	5	-10.64	/	/	/	
Inv.Expon. m3-		10.01	4	-12.02	0.1472	/	/	
Inv.Expon. m5-		9.54	5	-9.08	/	/	/	
LN m3-		10.12	4	-12.24	0.1643	/	/	
LN m5-		9.83	5	-9.66	/	/	/	
Model averaging							0.081	14.8
Interna doza (nivoi olova u srcu, ng/g)-odgovor								
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (ngPb/g)	BMDU (ngPb/g)	
SHG	full	NA	NA	NA	/	/	/	
	null model	-13.02	2	30.04	/	/	/	
	Expon. m3-	-10.87	4	29.74	/	/	/	
	Expon. m5-	-7.53	5	25.06	0.6221	0.0201	21.9	
	Hill m3-	-10.86	4	29.72	/	/	/	
	Hill m5-	-8.73	5	27.46	0.1874	0.0035	15.8	
	Inv.Expon. m3-	-10.79	4	29.58	/	/	/	
	Inv.Expon. m5-	-10.31	5	30.62	/	/	/	
	LN m3-	-10.82	4	29.64	/	/	/	
	LN m5-	-9.13	5	28.26	/	/	/	
	Model averaging						1e-0.6	5.31

Verovatnoća (Loglik.), broj parametara (No.par.), akaike information criterion (AIC), donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), nivoi olova u krvi (BLL), malondialdehid (MDA), bakar (Cu), sulfhidrilne grupe (SHG)

**Tabela 8.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa internih doza olova-odgovor za efekte olova u testisima pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Interna doza (BLL, µg/dL)-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (µg Pb/dL)	BMDU (µg Pb/dL)
Zn	full	NA	NA	NA	/	/	/
	null model	50.48	8	-84.96	/	/	/
	Expon. m3-	45.86	2	-87.72	0.1533	/	/
	Expon. m5-	48.7	4	-89.4	/	/	/
	Hill m3-	48.96	5	-87.92	0.2711	0.0015	71.8
	Hill m5-	49.27	4	-90.54	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	49.34	4	-90.68	0.2907	0.00058	42.7
	Inv.Expon. m5-	49.77	5	-89.54	/	/	/
	LN m3-	49.32	4	-90.64	0.285	0.0008	53.9
	LN m5-	49.77	5	-89.54	/	/	/
	Model averaging						0.004

Verovatnoća (Loglik.), broj parametara (No.par.), akaike information criterion (AIC), donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), cink (Zn)

**Tabela 9.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksternih i internih doze olova-odgovor za efekte olova na femur pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Eksterna doza-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (mgPb/kg)	BMDU (mgPb/kg)
Fe	full model	33.74	8	-51.48	/	/	/
	null model	26.74	2	-49.48	/	/	/
	Expon. m3-	29.24	4	-50.48	0.1671	/	/
	Expon. m5-	29.62	5	-49.24	/	/	/
	Hill m3-	29.69	4	-51.38	0.2621	/	/
	Hill m5-	29.99	5	-49.98	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	29.79	4	-51.58	0.2897	1,16e-0,5	6,18
	Inv.Expon. m5-	30	5	-50	/	/	/
	LN m3-	29.76	4	-51.52	0.2811	2.19e-05	7.29
	LN m5-	29.99	5	-49.98	/	/	/
Model averaging						0.000248	13.4
Cu	full model	-1.2	8	18.4	/	/	/
	null model	-13.5	2	31	/	/	/
	Expon. m3-	-2.22	4	12.44	0.2612	9.66e-05	0.342
	Expon. m5-	-2.22	5	14.44	/	/	/
	Hill m3-	-2.22	4	12.44	0.2612	0.0014	4.87
	Hill m5-	-2.23	5	14.46	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	-2.34	4	12.68	0.2317	4.49e-06	4,34
	Inv.Expon. m5-	-2.38	5	14.76	/	/	/
	LN m3-	-2.28	4	12.56	0.246	5.29e-06	4.58
	LN m5-	-2.31	5	14.62	/	/	/
Model averaging						2.66e-06	0.327
Interna doza (BLL, µg/dL)-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (µgPb/dL)	BMDU (µgPb/dL)
	null model	-13.5	2	31	/	/	/
	Expon. m3-	-7.45	4	22.9	0.2582	4.3e-05	4.33
	Expon. m5-	-7.25	5	24.5	/	/	/
	Hill m3-	-7.44	4	22.88	0.2456	0	4.32
	Hill m5-	-7.3	5	24.6	/	/	/
	Inv.Expon. m3-	-7.39	4	22.78	0.2582	0.000215	4.94
	Inv.Expon. m5-	-7.33	5	24.66	/	/	/
	LN m3-	-7.41	4	22.82	0.2531	1.81e-05	4,7
	LN m5-	-7.31	5	24.62	/	/	/
Model averaging						1.39e-05	6.39
Interna doza (ng/g)-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (ngPb/dL)	BMDU (ngPb/dL)
Cu	full	NA	NA	NA	/	/	/
	null model	-13.21	2	30.42	/	/	/
	Expon. m3-	-7.03	4	22.06	/	/	/
	Expon. m5-	-5.65	5	21.3	0,2913	0.0001	182
	Hill m3-	-7.03	4	22.06	/	/	/
	Hill m5-	-5.62	5	21.24	0,302	0.0087	134
	Inv.Expon. m3-	-7.01	4	22.02	0,2032	0	69.6
	Inv.Expon. m5-	-6.58	5	23.16	/	/	/
	LN m3-	-7.02	4	22.04	/	/	/
	LN m5-	-6	5	22	0,2053	0	904
Model averaging						2.37e-06	102

Verovatnoća (Loglik.), broj parametara (No.par.), *akaike information criterion* (AIC), donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), nivoi olova u krvi (BLL)

**Tabela 10.** Rezultati dobijeni modelovanjem odnosa eksternih doza olova-odgovor za efekte olova u pankreasu pacova upotrebom PROASTweb 70.1 softvera uz korišćenje metode usrednjavanja modela (*model averaging*)

Interna doza (mg Pb/kg t.m./dan)-odgovor							
Parametar	Model	Loglik.	No.par	AIC	Model weights	BMDL (µg Pb/dL)	BMDU (µg Pb/dL)
Zn	full	-21.63	8	59.26	/	/	/
	null model	-29.77	2	63.54	/	/	/
	Expon. m3-	-26.69	4	61.38	/	/	/
	Expon. m5-	-24.04	5	58.08	0.3251	9.2e-06	0.254
	Hill m3-	-26.65	4	61.3	/	/	/
	Hill m5-	-24.05	5	58.1	0.3218	0.00537	0.369
	Inv.Expon. m3-	-26.54	4	61.08	/	/	/
	Inv.Expon. m5-	-25.22	5	60.44	0.0999	0.00166	0.397
	LN m3-	-26.59	4	61.18	/	/	/
	LN m5-	-24.29	5	58.58	0.2532	0.00381	0.28
	Model averaging						3.84e-06

Verovatnoća (Loglik.), broj parametara (No.par.), akaike information criterion (AIC), donji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDL), gornji nivo pouzdanosti *Benchmark* doze (BMDU), cink (Zn)



## **Prilog 2. Rezultati istraživanja iz doktorske disertacije publikovani i štampani u celini u časopisima kategorije M20**

### **Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a)**

1. **Javorac D**, Antonijević B, Anđelković M, Repić A, Bulat P, Djordjevic AB, Baralić K, Đukić-Ćosić D, Antonić T, Bulat Z. Oxidative stress, metallomics and blood toxicity after subacute low-level lead exposure in Wistar rats: Benchmark dose analyses. *Environmental Pollution*. 2021 Dec 15; 291:118103. IF (2020) 8.071
2. **Javorac D**, Tatović S, Anđelković M, Repić A, Baralić K, Djordjevic AB, Mihajlović M, Stevuljević JK, Đukić-Ćosić D, Čurčić M, Antonijević B, Bulat Z. Low-lead doses induce oxidative damage in cardiac tissue: Subacute toxicity study in Wistar rats and Benchmark dose modelling. *Food and Chemical Toxicology*. 2022 Jan 16:112825. IF (2020) 6.025

### **Rad objavljen u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)**

3. **Javorac D**, Anđelković M, Repić A, Tatović S, Djordjevic AB, Miljaković EA, Batinić B, Boričić N, Đukić-Ćosić D, Antonijević B, Bulat Z. Comprehensive insight into the neurotoxic mechanisms of low dose Pb exposure in Wistar rats: Benchmark dose analysis. *Chemico-Biological Interactions*. 2022 Jun 1;360:109932. IF (2020) 5.192

## Biografija autora

Mag. farm. Dragana Javorac je rođena 22. avgusta 1992. godine u Priboju, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu „Desanka Maksimović“ kao nosilac „Vukove diplome“. Srednju medicinsku školu završila je u Beogradu sa odličnim uspehom. Integrisane akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, studijski program Farmacija, obima 300 bodova ESPB, upisala je školske 2011/2012. godine a završila 13. jula 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,53 i ocenom 10 na odbranjenom završnom radu na Katedri za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“. Tokom studija bila je stipendista Zadužbine Dragoljuba Marinkovića, od 2012. do 2016. godine. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, modul Toksikologija, upisala je školske 2017/2018. godine. Položila je sve ispite na doktorskim studijama sa prosečnom ocenom 9,80. Dobitnik je Godišnje nagrade najboljim studentima završne godine doktorskih akademskih studija za školsku 2019/20. koja se dodeljuje povodom godišnjice osnivanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Dobitnica je nagrada za izuzetne rezultate za naučnoistraživački rad i objavljivanje rada u časopisu kategorije M21a za školsku 2020/2021. godinu, koja se dodeljuje povodom godišnjice osnivanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, kao i nagrade Zadužbine Đoke Vlajkovića za najbolji naučni rad mladih naučnih radnika Univerziteta u Beogradu za 2021. godinu. Školske 2019/2020. upisala je specijalističke akademske studije modula Toksikološka procena rizika na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, a završila septembra 2020. godine sa prosečnom ocenom 9,88. Trenutno je zaposlena kao istraživač-pripravnik na nacionalnim i međunarodnim projektima Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Dragana Javorac je autor jednog poglavlja u knjizi vodećeg međunarodnog značaja (M14). Objavila je preko 43 bibliografske jedinice (radova i saopštenja) od kojih 16 radova u časopisima kategorije M20 (9 radova u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti-M21a, 4 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima-M21, 3 rada u istaknutim međunarodnim časopisima-M22). Bila je član Komisija za odbranu završnih radova i komentor studentskih naučno-istraživačkih radova. Recenzent je u međunarodnim časopisima.

## **Izjave autora doktorske disertacije**

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Драгана Јаворац \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ 1/2017 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Токсични ефекти ниских доза олова на моделу субакутне изложености пацова“

---

- 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, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_ Драгана Јаворац \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ 1/2017 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ докторске академске студије, модул Токсикологија \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ „Токсични ефекти ниских доза олова на моделу субакутне изложености пацова“ \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_ Проф. др Зорица Булат \_\_\_\_\_

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:

„Токсични ефекти ниских доза олова на моделу субакутне изложености пацова“

---

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у 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.