

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Ana Đurić

**EFEKAT DISULFIRAMA NA MEHANIZME REPRODUKTIVNE
SUBAKUTNE TOKSIČNOSTI ETANOLA I/ILI KADMIJUMA KOD
MUŽJAKA PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Ana Djuric

**THE EFFECT OF DISULFIRAM ON ETHANOL AND/OR CADMIUM
SUBACUTE REPRODUCTIVE TOXICITY MECHANISMS IN MALE RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske teze u sastavu:

Mentor:

Dr sc. Mirjana Đukić, redovni profesor, mentor i predsjednik Komisije
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

Dr sc. Ivana Stevanović - mentor rada, viši naučni saradnik,
Univerzitet odbrane – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Beograd

Dr sc. Marijana Ćurčić - docent,
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Marina Nikolić Đurović - vanredni profesor,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Miloš Petković - docent,
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Izjava zahvalnosti

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije urađena su najvećim delom na Institutu za medicinska istraživanja VMA Odeljenja za kliničku i eksperimentalnu patofiziologiju, Odeljenja za kliničku i eksperimentalnu imunologiju, kao i Institutu za toksikologiju i farmakologiju ove visokoškolske zdravstvene ustanove. Srećna sam što sam prilikom realizacije eksperimenta upoznala i saradivala sa puno divnih ljudi kojima dugujem veliku zahvalnost.

- Prof. Mirjani Đukić, mentoru, učitelju i iskrenom prijatelju - zahvaljujem na stalnoj podršci i istrajnosti u kompletnom naučnom istraživanju, strpljivosti, razumevanju, pomoći i najviše poverenju koje mi je godinama pružala;
- Višem naučnom saradniku Ivani Stevanović, komentoru i istinskom prijatelju – zahvaljujem što mi je nesebično otvorila vrata svoje laboratorije i učinila da se tu osetim kao kod kuće, na ogromnom vremenu i savetima koje mi je bezgranično davala svih ovih godina;
- Dr sc. Marina Nikolić Đurović, vanrednom profesoru sa Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu zahvaljujem na članstvu u Komisiji kao i dr sc. Milošu Petkoviću, docentu Katedre za organsku hemiju, i dr sc. Marijana Ćurčić, docentu Katedre za toksikologiju Farmaceutskog fakulteta,
- Koleginici Aidi Begić, drugarici i saradnici - hvala za zdrav i topao timski rad koji smo ostvarile radom u laboratoriji, pažnju, strpljivost i upornost koju si imala u toku zajedničkih istraživanja,
- Prof. Milici Ninković – zahvaljujem na profesionalnoj i prijateljskoj saradnji tokom izrade disertacije;
- Dr Bojani Mančić – iskreno hvala na zajedničkom vremenu i trudu provedenom u laboratoriji, kao i korisnim savetima u toku pisanja rada;
- Laboratorijskim tehničarima Marini Đuričić i Vesni Savić, kao i molekularnom biologu Veri Prokić, sa Instituta za medicinska istraživanja VMA - hvala za svu pomoć u pripremi i laboratorijskoj obradi uzoraka u toku izvođenja eksperimenta;
- Dr Ivanu Stanojeviću i prof. Danilu Vojvodiću, načelniku Odeljenja za kliničku i eksperimentalnu imunologiju Instituta za medicinska istraživanja VMA, u čijim je laboratorijama urađen jedan deo analiza;
- Veri Lukić, načelnici toksikološke laboratorije Instituta za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta, kao i Dušici, Anđelki, Mariji i Nađi, koje su učinile sve da rezultati iz njihove laboratorije budu brzi i kvalitetni;
- Bratislavu Dejanoviću, načelniku biohemijske laboratorije u Vojnomedicinskom centru Karaburma - hvala za sav trud prilikom analize i obrade jednog dela uzoraka;
- Profesorkama Ivani Stojanović i Dušici Pavlović sa Instituta za biohemiju, Medicinskog fakulteta u Nišu zahvaljujem na poverenju koje su mi ukazale kada su me pozvale da budem deo njihovog Projekta i zapravo mi omogućile da realizujem izradu ove doktorske disertacije;

- Profesorki Aleksandri Topić sa Instituta za biohemiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu - zahvaljujem na stručnoj pomoći oko statističke obrade rezultata;
- Kolicicama sa Instituta za toksikologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu - zahvaljujem na savetima i razgovorima, posebno profesorki Dragani Vujanović na stručnim savetima i tehničarki Ljilji Lukić na pomoći oko izrade dela eksperimenta;
- I na kraju, a u stvari na početku svega, neizmernu zahvalnost dugujem svojoj divnoj mnogobrojnoj porodici: svom suprugu, deci, roditeljima, baki i deki, roditeljima moga supruga, sestrama, bratu, sestri moga supruga i njihovim porodicama. Hvala vam što postojite i što ste mi vašom ljubavlju i verom u moj rad davali snagu da istrajem i učinili da postanem ovo što jesam.

Efekat disulfirama na mehanizme reproduktivne subakutne toksičnosti etanola i/ili kadmijuma kod mužjaka pacova

Sažetak

Dosadašnja istraživanja mehanizama toksičnosti alkohola i kadmijuma (Cd) pri pojedinačnoj i udruženoj izloženosti eksperimentalnih životinja potvrđuju da oba agensa dovode do reproduktivne toksičnosti. Brojne epidemiološke studije su takođe ukazale da su pušenje i alkoholizam uzročnici poremećaja u spermatogenezi i neplodnosti kod muškaraca. S obzirom na činjenicu da je duvanski dim značajan izvor izloženosti Cd, kao i da su alkoholičari uglavnom i pušači, potrebno je utvrditi kako disulfiram (DSF), lek koji se koristi u averzivnoj terapiji alkoholizma, utiče na reproduktivnu toksičnost izazvanu pomenutim toksikantima. Cilj ove studije je bio da se ispita efekat DSF na narušenu homeostazu bioelemenata, redoks i androgeni status u testisima pacova prethodno izloženih alkoholu i/ili Cd kao i tokom koekspozicije sa Cd. Slobodna sulfhidrilna grupa (–SH) u hemijskoj strukturi metabolita DSF, dietilditiokarbamata (DDTC), ukazuje na redukcionu i helirajuću potencijal DSF koji umnogome može da promeni metabolizam kako ispitivanih toksičnih agenasa (alkohola i Cd), tako i esencijalnih bioelemenata, kao i endogenih jedinjenja koja poseduju –SH grupe zbog mogućih reakcija tiolnog ukrštanja.

Studija na životinjama (mužjaci pacova *Wistar* soja, $n = 288$) je dizajnirana sa ciljem da se imitiraju navike alkoholičara-pušača pre i nakon uvođenja DSF. Životinje su bile izložene ispitivanim supstancama subakutno (alkoholu i DSF), odnosno subhronično (Cd). Alkohol, DSF i maslinovo ulje (MU) kao rastvarač za DSF, su davani putem oralne sonde (*per os*), a Cd intraperitonealno (*i.p.*), svakodnevno u jednoj dozi. Životinje su slučajnim odabirom podeljene na kontrolne grupe i 7 eksperimentalnih grupa, od kojih je svaka grupa podeljena u 4 ili 6 podgrupa ($n = 6$) u odnosu na dužinu izloženosti svakoj od ispitivanih supstanci pojedinačno ili njihovoj kombinovanoj primeni. Podela eksperimentalnih životinja na grupe u odnosu na trajanje ekspozicije (1, 3, 10, 21 i 42 dana) je sledeća: tri kontrolne grupe (K_{1-42} , MU_{1-21} , i K_{1-21}/MU_{22-42}); tri grupe koje su individualno bile izložene ispitivanim agensima (A_{1-21} , Cd_{1-42} i DSF_{1-21}); i četiri grupe koje su bile paralelno izložene ispitivanim agensima (A_{1-21}/Cd_{1-21} , A_{1-21}/DSF_{22-42} , Cd_{1-42}/DSF_{22-42} i $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$).

U homogenatima testisa mereni su parametri oksidativnog stresa (OS): superoksidni anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), malondialdehid (MDA), aktivnosti ukupne superoksidne dismutaze (tSOD), katalaze (CAT), glutation reduktaze (GR) i glutation-S-transferaze (GST), redukovani glutation (GSH) i oksidovani glutation (GSSG) i sadržaj esencijalnih metala: gvožđa (Fe), bakra (Cu), cinka (Zn) i magnezijuma (Mg) i toksičnog metala Cd. Zatim su u testisima i plazmi merene koncentracije testosterona za određivanje funkcionalnog statusa testisa, dok su histopatološkom analizom ustanovljene morfološke promene u testisima pacova izloženih dejstvu ispitivanih agenasa.

Primena DSF nakon subakutne izloženosti alkoholu (podrazumeva se prestanak unosa A) povećava Fe i smanjuje Cu u testisima izloženih pacova. Nivo Zn u testisima je ispod kontrolnih vrednosti u svim A/DSF eksperimentalnim grupama, ali je u kasnijim terminima blago povišen (bez značaja) u poređenju sa A₂₁ grupom. Koekspozicija DSF i Cd u trajanju od 21 dana, kod pacova koji su prethodno subakutno bili izloženi pojedinačnom tretmanu Cd rezultirala je smanjenjem koncentracije Cd u testisima tretiranih pacova, što implicira da DSF ispoljava zaštitni efekat na testise, vezujući i uklanjajući Cd iz pomenutog tkiva. U pogledu narušene homeostaze bioeleminata, koja se javlja usled subakutne i subhronične izloženosti Cd, DSF je ispoljio pozitivan efekat na sadržaje Fe i Cu u testisima tretiranih životinja. Takođe, DSF je uspeo da poveća koncentraciju Zn (ali ne statistički značajno), koja je prethodno smanjena usled subakutnog davanja Cd. Tretman DSF je ostvario pozitivan efekat na narušenu homeostazu Fe, Cu i Zn izazvanu paralelnim davanjem alkohola i Cd, vraćajući vrednosti pomenutih bioeleminata na kontrolne.

Uvođenje DSF nakon završene subakutne ekspozicije alkoholu je ispoljilo povoljan efekat na neke parametre OS ($O_2^{\bullet-}$, MDA i GSH), dok su aktivnosti tSOD, CAT i GR u testisima značajno veće, a koncentracija $O_2^{\bullet-}$ i MDA, kao i GSSG/GSH odnos značajno manji u Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ grupi u odnosu na Cd₄₂ grupu. Disulfiram je ostvario protektivni efekat na narušen oksidativni status u testisima usled paralelne ekspozicije alkoholu i Cd, pri čemu je vratio vrednosti MDA, GSSG i GSSG/GSSH odnosa kao i aktivnosti CAT i GR na kontrolne, dok su vrednosti ostalih merenih parametara pomerene ka kontrolnim.

Subakutni tretman DSF nije pokazao protektivni efekat na produkciju testosterona u testisima, koja je prethodno narušena subakutnim izlaganjem alkoholu i/ili Cd. Uvođenje DSF po završetku subakutnog davanja alkohola pokazalo je trend daljeg smanjenja nivoa testosterona u

plazmi, dok je u homogenatima testisa zabeležen blagi porast testosterona u odnosu na A₂₁ grupu. Udružena izloženost Cd i DSF dovela je do povećanja nivoa testosterona u plazmi u grupi Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ u odnosu na Cd₄₂, ali su te vrednosti i dalje daleko ispod kontrolnih vrednosti. Očigledno da primena DSF u trajanju od 21 dana nije uspela da otkloni posledice OS, pre svega pokretanje procesa LPO, na endokrinu funkciju testisa izazvanog prethodnim izlaganjem alkoholu i/ili Cd.

Histopatološom analizom je utvrđeno da DSF nema potencijal da popravi negativne efekte na morfološke promene do kojih je dovela subakutna upotreba alkohola i/ili subakutna/subhronična upotreba Cd.

Ovo istraživanje predstavlja doprinos razjašnjenju određenih antioksidativnih efekata DSF posle izlaganja alkoholu i/ili Cd. Ovaj fenomen se može objasniti izraženim helirajućim svojstvima DSF i antioksidativnim kapacitetom DSF/DDTC redoks para koji imitira endogeni GSH/GSSG redoks par.

Ključne reči: alkohol, kadmijum, disulfiram, testisi, oksidativni stres, esencijalni bioelementi

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Toksikologija

UDK broj: 615.9:615.279(043.3)

The effect of disulfiram on ethanol and/or cadmium reproductive subacute toxicity mechanisms in male rats

Abstract

Previous animal studies on the mechanisms of toxicity after exposure or co-exposure to alcohol and cadmium (Cd) confirmed that both agents induce reproductive toxicity. Numerous epidemiological studies have also suggested that smoking and alcoholism cause disturbances in spermatogenesis and infertility in men. Due to the fact that tobacco smoke is an important source of Cd exposure, as well as alcoholics are usually smokers too, it is necessary to determine if disulfiram (DSF), a drug used in aversive therapy of alcoholism, affects the reproductive toxicity induced by the abovementioned toxicants. The aim of this study was to examine the effect of DSF on disturbed bioelements' homeostasis, redox and androgen status in the testes of rats previously exposed to alcohol and / or Cd and during co-exposure with Cd. Free sulfhydryl group (-SH) in the chemical structure of the DSF's metabolite, diethyldithiocarbamate (DDTC), indicates the reducing and chelating potential of DSF, which in many ways can change the metabolism of tested toxic agents (A and Cd), as well as essential bioelements, and endogenous compounds containing -SH groups due to possible reactions of thiol linking.

The animal study (male Wistar rats, n = 288) was designed in order to imitate the conditions of alcoholics-smokers before and after the introduction of DSF. The animals were exposed to the tested substances subacute (alcohol and DSF) and subchronic (Cd). Alcohol, DSF, and olive oil (OL), as a solvent for DSF, were administered via oral gavage (*per os*), and Cd intraperitoneally, in a single daily dose. Animals were randomly divided into control groups and 7 experimental groups, each group was divided into 4 or 6 subgroups (n = 6) according to the duration of exposure to the tested substances alone or in combination. The division of the groups of the experimental animals with respect to the exposure time (1, 3, 10, 21 and 42 days) was as follows: three control groups (C₁₋₄₂, OL₁₋₂₁ and C₁₋₂₁ / OL₂₂₋₄₂); three groups which were independently exposed to the tested agents (A₁₋₂₁, Cd₁₋₄₂ and DSF₁₋₂₁); and four groups that were subjected parallelly to the tested agents (A₁₋₂₁ / Cd₁₋₂₁, A₁₋₂₁ / DSF₂₂₋₄₂, Cd₁₋₄₂ / DSF₂₂₋₄₂ and A₁₋₂₁ / Cd₁₋₄₂ / DSF₂₂₋₄₂).

In the homogenates of testes were measured parameters of oxidative stress (OS): superoxide anion radical (O₂^{•-}), malondialdehyde (MDA), the activities of: total superoxide

dismutase (tSOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione-S-transferase (GST), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) and the content of essential metals: iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn) and magnesium (Mg) and toxic metal Cd. Then, testosterone concentrations were measured in the testes and plasma to determine the functional status of the testes, while the histopathological analysis evaluated morphological changes in the testes of rats exposed to the tested agents.

Application of DSF after subacute exposure to alcohol (cessation of alcohol is meant) increased Fe and decreased Cu content in the testes of exposed rats. The testicular Zn levels were under the control values in all the A/DSF experimental groups, but it was slightly elevated (non-significantly) when compared to the A₂₁ group. Co-exposure of DSF and Cd for 21 days, of rats that have previously been exposed to subacute Cd treatment resulted in a reduction of Cd concentration in the testes of treated rats, which implies that DSF exerts a protective effect on the testes, by binding and removing the Cd from the abovementioned tissue. Concerning the disturbance in homeostasis of bioelements, which occurred after subacute and subchronic exposure to Cd, DSF has shown a positive effect on the contents of Fe and Cu in the testes of the treated animals. Also, DSF has managed to increase the concentration of Zn (but not statistically significant), which was previously reduced due to subacute administration of Cd. Disulfiram treatment has achieved a positive effect on the disturbed homeostasis of Fe, Cu and Zn caused by co-administration of alcohol and Cd, restoring the values of these bioelements to the control.

The introduction of DSF after subacute exposure to alcohol showed a beneficial effect on some parameters of OS ($O_2^{\bullet-}$, MDA and GSH), while the activities of tSOD, CAT and GR were significantly higher, and the concentrations of $O_2^{\bullet-}$ and MDA, and GSSG/GSH ratio were significantly lower in Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ group compared to Cd₄₂ group. Disulfiram achieved a protective effect on the oxidative status in the testes that was disrupted due to previous parallel exposure to alcohol and Cd. Administration of DSF returned values of MDA, GSSG and GSSG/GSSH ratios and the activities of CAT and GR to the control, while values of other measured parameters shifted towards the control values.

Subacute treatment with DSF has not demonstrated a protective effect on the production of testosterone in the testes, which has been previously impaired by subacute exposure to alcohol and/or Cd. The introduction of DSF following subacute alcohol administration showed further

reduction in plasma testosterone level, while testosterone level in the testicular homogenates was slightly increased compared to A₂₁ group. Associated exposure to Cd and DSF has led to an increase in plasma testosterone levels in Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ group compared to Cd₄₂ group, but these values are still below the control values. Obviously the use of DSF for a period of 21 days has failed to repair the consequences of the OS, primarily LPO, on the endocrine function of the testes caused by previous exposure to alcohol and / or Cd.

Histopathological analysis has shown that DSF has no potential to correct the negative effects on the morphological changes in testes previously caused by subacute exposure to alcohol and / or subacute / subchronic exposure to Cd.

The contribution of this research is the clarification of certain antioxidant effects of DSF after exposure to alcohol and / or Cd. This phenomenon can be explained by an extensive chelating properties of DSF and antioxidant capacity of DSF/DDTC redox couple that mimics endogenous GSH/GSSG redox couple.

Key words: alcohol, cadmium, disulfiram, testes, oxidative stress, essential bioelements

Academic Expertise: Pharmacy

Major in: Toxicology

UDK No: 615.9:615.279(043.3)

Skraćenice

A – alkohol

ADH – alkohol dehidrogenaza

ALDH – aldehydna dehidrogenaza

AOS – antioksidativni odbrambeni sistem

ATP – adenzin trifosfat

CAT – katalaza

Cd – kadmijum

Cu – bakar

CuZnSOD – bakar, cink superoksid dizmutaza

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

DDC – dietilditiokarbamidna kiselina

DDTC – dietilditiokarbamat

DDTC-Cu – bis (diethilditiokarbamatni) bakar kompleks

DER – disulfiram-alkoholna reakcija

DETC – N-dietilditiokarbamat

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DSF – disulfiram

ECSOD – ekstracelularna superoksid dizmutaza

Fe – gvožđe

FSH – folikulostimulirajući hormon

G6PDH – Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza

GPx – glutation peroksidaza

GR – glutation reduktaza

GS – glutation sintetaza

GSH – glutation

GSSG – oksidovani glutation

GST – glutation S-transferaza

H₂O₂ – vodonik peroksid

HO• – hidroksilni radikal

IARC – Međunarodna agencija za istraživanje raka

ICAA – Međunarodni savet za alkohol i bolesti zavisnosti

KTB – krvno-testisna barijera

LH – luteinizirajući hormon

LPO – lipidna peroksidacija

MDA – malondialdehid

Me-DDC – dietilditionimetilkarbamat

MEOS – mikrozomski-etanol-oksidujući sistem

Mg – magnezijum

MIF – Milerov inhibitorni faktor

MnSOD – mangan superoksid dizmutaza

MT – metalotioneini

NADH – *nikotinamid adenin dinukleotid*

Ni – nikal

NO^{*} – azot oksid

O₂ – molekularni kiseonik

O₂^{*-} – superoksid anjon radikal

ONOO⁻ – peroksinitrit

OS – oksidativni stres

RNK – ribonukleinska kiselina

RNS – reaktivne azotne vrste

ROS – reaktivne kiseonične vrste

SOD – superoksid dizmutaza

SR – slobodni radikali

Zn – cink

γ-GCS – γ-glutamilcistein-sintetaza

Sadržaj

1.	UVOD	19
1.1.	Alkohol	19
1.1.1.	Istorijat upotrebe etanola.....	19
1.1.2.	Osobine i metabolizam etanola	19
1.1.3.	Toksični efekti etanola	20
1.2.	Disulfiram	22
1.2.1.	Istorijat upotrebe disulfirama	22
1.2.2.	Osobine i metabolizam disulfirama.....	23
1.3.	Kadmijum	25
1.3.1.	Kadmijum u životnoj sredini.....	25
1.3.2.	Izloženost kadmijumu	26
1.3.3.	Toksični efekti kadmijuma.....	27
1.4.	Esencijalni metali - biolementi	28
1.5.	Oksidativni stres.....	29
1.5.1.	Oksidativna modifikacija biomolekula	30
1.5.2.	Antioksidativni sistem zaštite	31
1.6.	Reproduktivna anatomija i funkcija testisa sisara.....	36
1.7.	Oksidativni stres i testisi	42
2.	HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA.....	45
3.	MATERIJAL I METODE.....	47
3.1.	Eksperimentalne životinje.....	47
3.2.	Dizajn eksperimenta.....	47
3.2.1.	Eksperimentalne grupe pacova.....	48
3.2.2.	Priprema reagenasa i režim doziranja je bio sledeći:	49
3.3.	Histopatološka analiza testisa pacova	50

3.3.1.	Priprema tkiva testisa za histopatološku analizu.....	50
3.4.	Određivanje sadržaja metala u testisima.....	50
3.4.1.	Reagensi i standardi	50
3.4.2.	Priprema uzoraka.....	51
3.4.3.	Merenje koncentracije metala	51
3.5.	Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u homogenatima tkiva testisa.....	51
3.5.1.	Hemikalije	51
3.5.2.	Priprema homogenata za merenje parametara oksidativnog stresa.....	52
3.5.3.	Određivanje koncentracije proteina u homogenatima tkiva testisa.....	53
3.5.4.	Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.....	54
3.6.	Određivanje sadržaja testosterona.....	58
3.6.1.	Priprema homogenata za određivanje testosterona	58
3.6.2.	Određivanje koncentracije testosterona	58
3.7.	Statistička analiza.....	59
4.	REZULTATI.....	60
4.1.	Zbirni prikazi efekata svih primenjenih tretmana na pojedinačne izmerene parametre u testisima pacova	60
4.1.1.	Efekti primenjenih tretmana na status bioelemenata u testisima pacova.....	60
4.1.2.	Efekti primenjenih tretmana na status oksidativnog stresa u testisima pacova.....	63
4.1.3.	Efekti primenjenih tretmana na status testosterona u plazmi i testisima pacova	68
4.2.	Prikazi uticaja individualne izloženosti alkoholu, kadmijumu i disulfiramu na ispitivane parametre u testisima pacova	69
4.2.1.	Izloženost alkoholu	69
4.2.2.	Izloženost kadmijumu	71
4.2.3.	Izloženost disulfiramu	74
4.3.	Uticaj kombinovane izloženosti alkoholu i/ili kadmijumu i disulfiramu na testise pacova	77
4.3.1.	Parelelna izloženost alkoholu i kadmijumu (1-21 dana).....	77

4.3.2.	Nadovezana izloženost alkoholu (1-21 dana) pa disulfiramu (22-42 dana).....	79
4.3.3.	Udružena izloženost kadmijumu (1-42 dana) i disulfiramu (22-42 dana)	82
4.3.4.	Udružena izloženost disulfiramu (22-42 dana), kadmijumu (1-42 dana) i alkoholu (1-21 dana)	85
5.	DISKUSIJA.....	89
5.1.	Uticaj individualne subakutne izloženosti etanolu na status bioelemenata, oksidativni stres, testosterona i morfološke promene u testisima pacova	90
5.2.	Uticaj subhronične izloženosti kadmijumu na status bioelemenata, oksidativni stres, testosterona i morfološke promene u testisima pacova.....	95
5.3.	Uticaj individualne subakutne izloženosti disulfiramu na status bioelemenata, oksidativni stres, testosterona i morfološke promene u testisima pacova	105
5.4.	Uticaj kombinovane subakutne izloženosti alkoholu i kadmijumu na status bioelemenata, oksidativni stres, testosterona i morfološke promene u testisima pacova	108
5.4.1.	Uticaj nadovezane subakutne izloženosti alkoholu (1-21 dana) pa disulfiramu (22-42 dana) na status bioelemenata, oksidativni stres, testosterona i morfološke promene u testisima pacova	110
5.4.2.	Uticaj paralelne subakutne izloženosti kadmijumu i disulfiramu na status bioelemenata, oksidativni stres, testosterona i morfološke promene u testisima pacova	112
5.4.3.	Uticaj udružene izloženosti disulfiramu (22-42 dana), kadmijumu (1-42 dana) i alkoholu (1-21 dana) na status bioelemenata, oksidativni stres, testosterona i morfološke promene u testisima pacova.....	117
6.	ZAKLJUČAK	120
7.	LITERATURA.....	122
8.	PRILOZI.....	144
8.1.	Prilog - status metala.....	144
8.2.	Prilog - parametri oksidativnog stresa	147
8.3.	Prilog - prirast mase testisa	152
8.4.	Prilog - korelacije.....	153
8.4.1.	Korelacije između metala i parametara oksidativnog statusa u testisima pacova.....	153
8.4.2.	Korelacije između parametara oksidativnog statusa u testisima wistar pacova.....	157

Biografija autora	163
Изјава о ауторству	165
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	166
Изјава о коришћењу.....	167

1. UVOD

1.1. ALKOHOL

Alkoholizam je globalni društveni i zdravstveni problem, jedna od najrasprostranjenijih bolesti zavisnosti, odnosno toksikomanija. Iako se javlja još od davnina kao velika pretnja čovečanstvu, alkoholizam predstavlja jedan od najtežih problema savremene medicine. U cilju smanjenja smrtnih ishoda izazvanih alkoholom, Međunarodni savet za alkohol i bolesti zavisnosti (ICAA) iz Ženeve i Svetska zdravstvena organizacija (SZO) preduzimaju niz aktivnosti s ciljem da se njegova potrošnja smanji. U današnje vreme većina zemalja ima aktivnu politiku prema alkoholu, trudeći se da minimiziraju učinak alkohola limitirajući konzumaciju sa pravilima, taksama, tretmanom i prevencijom.

1.1.1. Istorijat upotrebe etanola

Smatra se da su alkohol prvi put sintetisale bakterije prerađujući ćelije biljnog porekla pre 1,5 biliona godina. Ostaci alkohola u porama grnčarije stare oko 7000 godina nam svedoče o počecima upotrebe alkohola u humanoj populaciji. Najraniji poznati pisani zakon o alkoholu je Hamurabijev zakonik iz Vavilona, napisan 2000. godine p.n.e., kojim je bila regulisana prodaja alkoholnih pića, a odnosila se na zaštitu potrošača i odgovornost prodavaca. Kod Srba se prvi pisani trag o alkoholnim pićima pojavljuje u jednom pismu kralja Vladislava iz 13. veka u kome se pravno reguliše proizvodnja piva (Ćorović, 2001).

Danas alkohol ima veoma široku primenu u industriji i laboratorijama kao rastvarač, odnosno u medicini i farmaciji kao dezificijens. U alkoholnim pićima se nalazi etil alkohol ili etanol. Prirodno se dobija alkoholnim vrenjem u procesu fermentacije iz plodova voća i žitarica koje sadrže šećer (Quertemont i sar. 2005; Rukkumani i sar., 2004).

1.1.2. Osobine i metabolizam etanola

Etanol je mala, nejonizovana molekula, hemijske formule C_2H_5OH , relativne molekulske mase (M_r) 46, hidrofilnih i lipofilnih osobina. Kroz ćelijske membrane prolazi mehanizmom proste difuzije i distribuira se u svim telesnim tečnostima i tkivima organizma (Goseel i Bricker,

1984). Etanol se bolje rastvara u vodi nego u mastima i njegov parcijalni koeficijent između masti i vode je 0,1, što znači da je koncentracija etanola u telesnim tečnostima 10 puta veća nego u depoima masti (Goldstein i sar., 1983).

Metabolizam etanola je enzimski kontrolisan višefazni sekvencijalni proces koji se odvija u tri faze:

1. metabolisanje etanola do acetaldehida delovanjem triju enzima (enzimskih sistema): NAD^+ zavisne alkohol dehidrogenaze (ADH), katalaze (CAT) i mikrozomskog-etanol-oksidujućeg sistema (MEOS);
2. oksidacija acetaldehida do sirćetne kiseline delovanjem NAD^+ zavisne aldehidne dehidrogenaze (ALDH);
3. završna faza metabolisanja sirćetne kiseline do ugljen dioksida i vode uz pomoć acetil-KoA sintetaze i acetil-KoA liaze.

1.1.3. Toksični efekti etanola

Mehanizam toksičnosti etanola je direktno povezan sa njegovim metabolizmom. Sam acetaldehid, koji nastaje u prvoj fazi katalizovane oksidacije etanola, je izuzetno reaktivni aldehid koji se vezuje za ćelijske proteine i dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) dovodeći do njihovih oksidativnih promena (Cederbaum 2010). Prilikom svakog od tri moguća metabolička puta oksidacije alkohola do acetaldehida nastaju slobodni radikali (SR) koji mogu da ugroze ćelijski antioksidativni odbrambeni sistem (AOS) i dovedu do nastanka oksidativnog stresa (OS) (Das i sar., 2005; Cederbaum, 1991)

Kada se alkohol konzumira u umerenim količinama, u njegov metabolizam je uključena prevashodno ADH i tada su zabeležene promene nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) nivoa kao i promene NADH/NAD^+ (Das i sar., 2005; Cederbaum, 1991). Hronično konzumiranje alkohola indukuje MEOS, zapravo tada oksidaciju alkohola katalizuju izoenzimi citohroma P450, prevashodno 2E1 izoforma (Cederbaum, 1991). Izoenzim 2E1 može u značajnoj meri da katalizuje formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *Reactive oxygen species-ROS*) kod alkoholičara, tako da je dokazano povećano stvaranje vodonik peroksida (H_2O_2), koje je u jetri alkoholičara povezano sa povećanom proizvodnjem hidroksilnog radikala (HO^{\bullet}) (Nordsblom i Coon, 1997; Klein i sar, 1983). Peroksizomalna aktivnost, odnosno katalazni enzimski sistem,

takođe doprinosi oksidaciji alkohola u jetri. Ovaj mehanizam je izraženiji kod teških alkoholičara gde postoji akumulacija masnih kiselina u jetri, usled njihove povećane oksidacije (Rubin i sar., 1972).

Druga faza metabolizma etanola, oksidacija acetaldehida, se odvija u jetri posredstvom ALDH. Mitohondrijalna ALDH igra ključnu ulogu u održavanju niskih koncentracija acetaldehida. Nastali acetat na kraju aktivira acetil-CoA-sintetaza do acetil-CoA (Cunningham i Bailey, 2001).

Rezultat oksidacije etanola posredstvom ADH i naknadne oksidacije acetaldehida posredstvom ALDH je značajno povećanje hepatičnog NADH/NAD⁺ odnosa u citoplazmi i mitohondrijama. Mitohondrijalna ALDH proizvodi najveći deo NADH unutar mitohondrija, što posledično dovodi do transporta citoplazmatičnih NADH redukujućih ekvivalenata pre svega preko malat-aspartat šatlja. Ukoliko se radi o aerobnom tkivu, povećan nivo NADH se trenutno reoksiduje posredstvom mitohondrijanog sistema za transport elektrona, tako da oksidacija etanola povećava dostupnost NADH u mitohondrijama (Cunningham i Bailey, 2001).

Pored toga što je direktno uključen u proizvodnju ROS, metabolizam etanola, dovodi i do promena u mikrokruženju povoljnih za nastanak OS kao što su hipoksija, endotoksemija i oslobađanje citokina. Takođe, alkohol može izmeniti nivoe nekih metala u telu, čime se olakšava proizvodnja ROS. Konačno, alkohol utiče i na smanjenje nivoa antioksidanasa koji eliminišu ROS (Sergent i sar, 2001).

Preveliki unos alkohola oštećuje normalan razvoj i funkcionisanje gotovo svih organskih sistema (Altura i Altura, 1999; Thurman i sar., 1999; Trevisiol i sar., 2007). Štetni uticaji prolongirane konzumacije alkohola na organizam su višestruki. Direktnim destruktivnim dejstvom, alkohol oštećuje sve ćelije i tkiva u organizmu, dok indirektnim dejstvom izaziva poremećaje metabolizma ugljenih hidrata, lipida, smanjuje sintezu proteina, vitamina i minerala, posebno vitamina iz grupe B (Zahr i sar., 2011). Alkohol takođe dovodi do oštećenja jetre (ciroza), može se javiti ulkusna bolest (čir, koji kod nastavljene konzumacije može dovesti do tumora). Takođe postoji opasnost od masne infiltracije srca (alkoholna miokardiopatija), polineuropatije, fibroze miokarda, oštećenja bubrega, kože, retine oka, zapaljenja pankreasa, šećerne bolesti, povišenog krvnog pritiska, stvaranja epileptoidnog žarišta, proširenja moždanih komora, kao i difuzne kortikalne atrofije (Li i sar., 2014). Može se javiti zapaljenje nervnog

stabla (alkoholni polineuritis), kao i štetan uticaj alkohola na reproduktivne funkcije u vidu impotencije, atrofije testisa, ginekomastije i gubitka seksualnog interesa (Blanco i Guerri, 2007; Gottesfeld, 1998). Alkoholni sindrom kod fetusa predstavlja poseban efekat etanola na funkcije reproduktivnih organa i karakterišu ga prenatalna i postnatalna retardacija rasta, mikrocefalija, motorna disfunkcija i mentalna retardacija. Uzimanje velikih količina alkohola, posebno u prva tri meseca trudnoće dovodi do najtežih malformacija i razvijanja kompletnog alkoholnog sindroma (Welch-Carre, 2005; Chiriboga, 2003; Chaudhuri, 2000).

Alkohol kod žena povećava sintezu estrogena u organizmu, što rezultuje izostankom ovulacije, poremećajem faze luteinizacije i amenorejom (Longnecker i Tseng, 1998). Brojne studije su pokazale povezanost između produženog konzumiranja alkohola i neplodnosti kod muškaraca povezane sa smanjenim nivoom testosterona i povećanim OS (Emanuele i Emanuele, 2001; Maneesh i sar., 2005; Oliva i sar., 2006; Uygur i sar., 2014).

1.2.DISULFIRAM

1.2.1. Istorijat upotrebe disulfirama

Disulfiram (tetraetiltiuram disulfid, bis [dietiltiokarbamil] disulfid) (DSF) je prvi put sintetisan osmadesetih godina XIX veka, ali je njegov neprijatan efekat nakon konzumiranja alkohola otkriven četrdesetih godina XX veka od strane dva naučnika, Halda i Jacobsen-a, koji su ispitivali antiparazitike (Barth i sar, 2010; Hald i Jacobsen, 1948). Više od 60 godina DSF se primenjuje za lečenje alkoholizma i još uvek je najčešće primenjivan lek za ovo oboljenje. Kod averzivne terapije zavisnosti odalkohola DSF se koristi dugi niz godina (Eneanya i sar., 1981). Ova metoda lečenja zasniva se na inhibiciji citozolne aldehid dehidrogenaze (ALDH1A1, više nego ALDH2), što dovodi do akumulacije acetaldehida u krvi i praćeno je brojnim neprijatnim simptomima (Koppaka i sar., 2012). Nastale promene označavaju se DSF-alkoholnom reakcijom (DER) i uključuju: crvenilo, lupanje srca, dispneju, hipertenziju, mučninu, povraćanje, cijanozu i smanjenje krvnog pritiska (Djukić i sar., 1999; Marcato i sar., 2011).

1.2.2. Osobine i metabolizam disulfirama

Disulfiram je kristalan prašak, bele do svetlo sive boje, relativne molekulske mase (M_r) 296,54. U vodi je praktično nerastvoran, dok je rastvorljiv u alkoholu, etru, acetonu, etilacetatu, benzenu, hloroformu i ugljendisulfidu.

Slobodni DSF nikada nije detektovan u plazmi, jetri ili urinu, što ukazuje da ovo jedinjenje *in vivo* odmah nakon unošenja u organizam podleže brojnim hemijskim reakcijama i redukciji na dva molekula dietilditiokarbamata (DDTC). Formirani tioli se brzo dalje metabolišu u nekoliko pravaca: (1) konjuguju se sa glukuronskom kiselinom; (2) oksiduju se do sulfata; (3) razlažu do ugljen disulfida i dietilamina; i (4) reoksiduju u DSF (Deitrich i Erwin, 1971; Vallari i Pietruszko, 1982; Kitson, 1983; Lipsky i sar., 2001).

Nakon ingestije DSF se u stomaku brzo konvertuje u njegov bis (diethilditiokarbamatni) bakar (Cu) (DDTC-Cu) kompleks. Posledično, apsorpcija i distribucija preko gastrointestinalne mukoze u krv može uključiti sam lek i njegov kompleks sa Cu. U krvi se oba jedinjenja vrlo brzo razgrađuju u dietilditiokarbamidnu kiselinu (DDC), koja je veoma nestabilna i dodatno se razlaže na dietilamin i ugljen disulfid. Dietilditiokarbamidna kiselina je takođe supstrat u drugoj fazi metabolizma, koja uključuje formiranje dietilditiometilkarbamata (Me-DDC) i glukuronske kiseline-DDC. Međutim, Me-DDC takođe prolazi oksidativnu biotransformaciju u dietiltiometilkarbamat (Me-DTC), koji se dalje oksiduje u odgovarajući sulfoksid i sulfon metabolite. Dietiltiometilkarbamat može da deluje kao inhibitor mitohondrijalne ALDH1, izoenzim niske K_m vrednosti, dok su dva S-oksidovana metabolita, posebno sulfon metabolita, veoma snažni inhibitori ne samo ALDH1, već takođe i citozolne ALDH2, visoke K_m vrednosti. Inhibitorna reakcija između enzima i svakog od tri metabolita odlikuje se formiranjem kovalentnog adukta, verovatno sa cisteinskim ostatkom na aktivnom mestu enzima. Ispitivanja *in vivo* efekata DSF vršena su na volonterima koji su koristili etanol i dobijali rastuće doze DSF između svakog doznog perioda. Prosečne koncentracije Me-DTC u plazmi u stacionarnom stanju bile su proporcionalne datim dozama DSF. Takođe je bio blizak odnos između povećanog oksidativnog metaboličkog stvaranja Me-DTC, oksidativnog formiranja acetaldehida i DSF-etanol reakcije. Shodno tome, Me-DTC u plazmi ne može samo služiti kao marker oksidativne metaboličke funkcije u jetri, već takođe i terapijske efikasnosti tretmana kod subjekata u stabilnom stanju. Očigledno je da postoji potreba za individualnim doznim titracijama. Kod pacijenata koji su zavisni od alkohola i imaju teška hepatocelularna oštećenja, oksidativni P450

katalizuje formiranje Me-DTC i verovatno njenih sulfoksid i sulfon metabolita i na taj način odlaže ili potpuno blokira inaktivaciju ALDH aktivnosti u jetri. Kao posledica se kod pacijenata može javiti nedovoljna DER.

Molekularni mehanizam inhibicije ALDH je posredovan metaboličkim produktima DSF. Prvi od njih obuhvata raskidanje disulfidne veze i istovremeno oslobađanje DDTC, koji je inhibitor ALDH *in vivo*, ali ne i *in vitro* (Deitrich i Erwin, 1971; Kitson, 1975; Vallari i Pietruszko, 1982; Kitson, 1991; Lipsky i sar., 2001). Dietilditiokarbamat se konvertuje preko hepatične tiol metiltransferaze na S-metil-N, N-dietilditiokarbamat (DETC) i S-metil-N, N-dietilditiokarbamat (Me-DDTC), oba veoma jaka inhibitora ALDH2 u mitohondrijama *in vivo*. Naknadna P450-katalizovana oksidacija metabolita DETC i Me-DDTC, uključujući DETC-sulfoksid (DETC-SO) i S-metil-N, N-dietiltiokarbamat-sulfoksid (Me-DDTC-SO) i -sulfone (Me-DDTC-SO₂), takođe inhibira ALDH u mitohondrijama (Hart i Faiman, 1993; Mays i sar., 1996, 1998). Inhibicija ALDH indukovana ovim jedinjenjima je ireverzibilna zbog karbamilacije katalitičkog Cis302 ostatka (Lipsky i sar., 2001). Pokazano je da GSH ne utiče na snažnu inhibiciju ALDH2 izazvanu Me-DDTC-SO. Ovim je pokazano da Me-DDTC-SO poseduje izraženiji antagonistički potencijal prema ALDH2 u odnosu na ostale DDTC metabolite (Mays i sar., 1998).

Pored toga što se koristi kao antidipsotropski agens, DSF je preko ALDH nezavisnog mehanizma pronašao novu terapijsku primenu u lečenju kokainskih zavisnika. Mehanizam uključuje disulfiramsku inhibiciju dopamin-hidroksilaze, koja predstavlja Cu-zavisni enzim neophodan za prevođenje dopamina u norepinefrin u noradrenergičkim neuronima (Barth i Malcolm, 2010). Redukcija oslobađanja norepinefrina izazvana DSF u noradrenergičkim neuronima utiče na smanjenje ekscitacije dopaminergičkih neurona srednjeg mozga čime se ublažava euforija izazvana kokainom (Gaval-Cruz i Weinshenker, 2009). Ovi inhibitorni efekti su pripisani Cu-helatnoj aktivnosti DDTC.

Disulfiram inhibira brojne Cu-zavisne enzime, uključujući karboksilestarazu i holinesterazu (Zemaitis i Greene, 1976). Smatra se da poznato Cu-helatno dejstvo indukuje inhibiciju proteazoma i posledičnu apoptozu ćelija kancera (Wang i sar., 2011), što kandiduje DSF za korišćenje u antikancerskoj terapiji (Lin i Lin, 2011; Nagy i sar., 2012; Barth i sar., 2010). Dobro je poznata sposobnost DSF da deluje kao DNK-demetilisući agens i postoje rezultati koji opisuju

inhibiciju rasta ćelija kancera prostate u prisustvu DSF (Lin i sar., 2011). Trenutno su u toku klinička ispitivanja koja procenjuju sposobnost DSF da suzbije rast ćelija kancera (Kona i sar., 2011; Lin i Lin, 2011). Ditiokarbamati su snažni helirajući agensi metala koji se koriste u terapiji nakon trovanja niklom (Ni) i Cu (Sunderman, 1964).

1.3.KADMIJUM

1.3.1. Kadmijum u životnoj sredini

Kadmijum (Cd) su otkrili nemački naučnici Strohmeyer i Hermann davne 1817. godine. Ime Cd potiče od starogrčkog naziva cink-karbonata, jer je najpre izolovan kao nečistoća cinka (Zn) (Aylett, 1979). Prve literaturne dokaze za toksičnost Cd objavili su Alsberg i Schwartze 1919. godine nakon istraživanja na životinjama, dok su štetni efekti na humanoj populaciji uočeni mnogo godina kasnije posle profesionalnog izlaganja Cd (Bonnell, 1955; Bulmer i sar., 1938; Friberg, 1948), odnosno kao posledica zagađenja životne sredine Cd (Ishizaki, 1969). Od strane Međunarodnog registra potencijalno toksičnih hemikalija Programa za životnu sredinu Ujedinjenih nacija, Cd je kao zagađivač globalnih razmera ocenjen i uključen na listu hemijskih supstanci koje se smatraju potencijalno opasnim na globalnom nivou [IARC, 1993]. Preporuka je da izlaganje ljudi Cd mora biti svedeno na minimum, tako da poslednjih nekoliko godina međunarodne i vladine agencije čine napore da kontrolišu i smanje izloženost populacije Cd. Takođe, Cd i njegova jedinjenja su klasifikovani kao humani kancerogeni od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC) iz 1993. godine, na osnovu visokog rizika za nastanak tumora pluća koji je povezan sa izloženošću Cd (Kelley, 1999; ATSDR, 2012), tako da je Cd rangiran na 7. mestu otrova na listi prioriteta registra opasnih materija.

Kadmijum se javlja u zemljinoj kori u koncentraciji od 0,1-0,5 ppm, što se obično povezuje sa rudama Zn, olova i Cu. Takođe je prirodni sastojak vode okeana sa prosečnim nivoima između < 5 i 110 ng/l. Koncentracija Cd prirodno na površini i ispod vode je obično < 1 mikrog/l. Koncentracija Cd na površini zemlje će zavistiti od njene mobilnosti, prirodne geohemije i veličine zagađenja iz izvora (đubriva i atmosferskog taloženja). Prirodno oslobađanje Cd u životnu sredinu može poticati iz vulkanskih erupcija, šumskih požara, stvaranja

morskih aerosola ili drugih prirodnih pojava. U prirodi se Cd nalazi samo u jednom oksidacionom stanju (+2) i ne podleže reakcijama oksido-redukcije.

1.3.2. Izloženost kadmijumu

Kadmijum je neesencijalni teški metal koji je veoma široko rasprostranjen kao zagađivač životne sredine, povezan sa zagađenjem vazduha i vode (Waisberg i sar., 2003). Međutim, pored brojnih dokaza o njegovoj toksičnosti, upotreba jedinjenja Cd za antikorozivnu zaštitu i u elektronskoj industriji stalno raste. Industrijske aktivnosti, naročito topljenje i prerada metala, odnosno spaljivanje komunalnog otpada takođe oslobađaju Cd u atmosferu kao Cd oksid, hlorid ili sulfid. Najveći rizik od Cd kod profesionalne izloženosti ima izlaganje procesima topljenja materijala koji ga sadrže, dok stepen rizika varira u zavisnosti od radnog mesta. Glavni put izlaganja je udisanjem prašine, gasova ili slučajnim gutanjem putem kontaminiranih ruku, hrane ili cigareta.

Opasnost od unosa Cd iz vazduha se očekuje samo u naseljima blizu industrijskih zona koje direktno oslobađaju Cu atmosferu, dok opšta populacija nije izložena ovom riziku. Međutim, opisani su povišeni nivoi Cd u izvorima vode blizu industrijskih zona koje ga emituju. Kod vodenih organizama Cd se akumulira, a unosi se preko hrane. Nivo Cd u vazduhu i vodi za piće prema skorašnjim podacima nije alarmantan ($0,04 \text{ mikrog/m}^3$, odnosno manje od 1 mikrog/l) (ATSDR, 2008). Međutim, antropogene aktivnosti umnogome povećavaju njegovu koncentraciju u atmosferi i vodi (ATSDR, 2008; WHO, 2010).

Humana populacija koja nije profesionalno izložena Cd i njegovim jedinjenjima uglavnom ga unosi preko hrane, ali je jedan od glavnih izvora izlaganja i dim cigarete, imajući u vidu činjenicu da je apsorpcija Cd preko pluća skoro 10 puta veća od gastrointestinalne apsorpcije (Goering i sar., 1994; Waalkes, 2003; Satarug i Moore, 2004; McElroy i sar., 2006). Tako, prosečna osoba apsorbuje približno 1 mikrog Cd dnevno preko hrane, dok se dodatnih $1-3 \text{ mikrog Cd}$ u toku dana apsorbuje pušenjem jedne kutije cigareta (ATSDR, 2008). To je razlog zašto teški pušači imaju čak dva puta više nataloženog Cd i spadaju u posebno ugroženu kategoriju (Lewis i sar., 1972; Waalkes, 2003; ATSDR, 2008).

Studija Pana i saradnika (2010) je pokazala povezanost zagađenja životne sredine širom Evrope i izloženosti preko hrane sa incidencom raka prostate i dojke, što ilustruje stalnu brigu za

potencijalnim uticajima Cd na ljudsko zdravlje. Što se tiče izlaganja efektima životne sredine i potencijalu za ekološke efekte, smernice o kvalitetu vode i/ili kriterijumi za Cd uključuju njegove niske koncentracije u odnosu na neke druge materije, što ukazuje na nizak prag efekata (Wood i sar., 2011).

1.3.3. Toksični efekti kadmijuma

Emisija Cd u atmosferu je veliki zdravstveni problem zbog dugog biološkog poluživota u mnogim organizmima, uključujući i ljude (10-35 godina) (WHO, 2011). Slično radnicima direktno izloženim Cd, postoji i obimna baza podataka o toksičnosti Cd iz okoline na populaciju. Nakon oralnog izlaganja, na njegovu toksičnost su naročito osetljivi bubrezi i kosti, a posle inhalacionog izlaganja bubrezi i pluća. Oblik Cd i put unosa može umnogome uticati na njegovu apsorpciju i distribuciju, a samim tim i na koncentraciju na ciljnom mestu. Mehanizam delovanja podrazumeva uticaj katjona Cd na ciljnom mestu. Na apsorpciju i distribuciju kod inhalacije jedinjenja Cd, mogu uticati veličina čestica Cd, odnosno dima ili aerosola.

Kadmijum pokazuje raznovrsnu toksičnost u različitim organima poput oštećenja funkcija jetre, bubrega, testisa, kao i poremećaje respiratornog i nervnog sistema, kako kod čoveka, tako i kod životinja (IARC, 1993; Waalkes, 2000; Waisberg i Cap, 2003; Thompson i Bannigan, 2008). Veoma dug poluživot Cd nakon absorpcije, ukazuje na njegovu sposobnost da je otporan na mehanizme detoksikacije (Martelli i sar, 2006). Kadmijum se može akumulirati u mnogim organima, poput jetre i bubrega (Jihen i sar., 2008), zatim pluća (Klimisch, 1993; Luchese i sar., 2009) i testisa (Haouem i sar, 2008). Međutim, jetra i bubrezi su glavni organi akumulacije Cd, jer je u njima povećana ekspresija metalotioneina (MT), Cd-vezujućeg proteina (Pandey, 2006). Takođe, posebna osetljivost na izlaganje Cd praćena teškim strukturnim i funkcionalnim oštećenjima zabeležena je kod embriona i reproduktivnih organa kod odraslih, uključujući jajnike i testise, koji su posebno osetljivi na toksičnost Cd (Thompson i Bannigan, 2008). Pretpostavlja se da Cd učestvuje u kancerogenezi bubrega, prostate, jetre i pankreasa (Waalkes, 2003; Goyer i sar., 2004; Thompson i Bannigan, 2008). Pokazano je da Cd ima važnu ulogu u procesu kancerogeneze povećanjem brzine mutacija DNK i stimulacijom mitogenih signalnih puteva, kao i ekspresijom onkoproteina koji kontrolišu proliferaciju ćelije (Beyersmann i Hechtenberg, 1997).

Na animalnim modelima je kod oralne izloženosti najčešće testiran Cd hlorid, zbog svoje visoke rastvorljivosti u vodi i posledično visoke koncentracije na ciljnim mestima. Naročito su značajne studije Cd vezanog za MT, jer kompleksi Cd-MT mogu imati različite toksične profile i nalaze se u relativno visokim nivoima u jetri i bubrezima. Kadmijum oksid i Cd karbonat, koji su relativno nerastvorni u vodi (ali se mogu rastvoriti u želudačnom pH), po apsorpciji i toksičnosti slični su rastvorljivom Cd. Postoje neke manje studije koje pokazuju dostupnost drugih oblika Cd, uključujući nerastvorne oblike u vodi poput Cd sulfida (žuti pigment) i Cd selen sulfida (crveni pigment) i rastvorljivog oblika - Cd sulfata, koji je manje rastvoran u zatvorenom vazдушnom sistemu sa ograničenom količinom rastvorenog ugljen dioksida (ATSDR, 2012).

1.4.ESENCIJALNI METALI - BIOELEMENTI

Održavanje homeostaze esencijalnih metala je od posebnog značaja za normalan razvoj i funkcionisanje živih organizama, uključujući sve organske sisteme i tkiva (Rotter i sar., 2015). Bioelementi kao što su gvožđe (Fe), Cu, Zn i magnezijum (Mg) u ćelijama sisara imaju važnu ulogu u fiziološkim, metaboličkim, oksidativnim i signalnim putevima.

Najzastupljeniji element u tragovima kod ljudi je Fe (60-70 % se nalazi u hemoglobinu, dok se 20-30 % čuva u hepatocitima) (Lipiński, 2014).

Cink je posle Fe kod većine kičmenjaka drugi najzastupljeniji element u tragovima. Neophodan je za metabolizam proteina, nukleinskih kiselina, ugljenih hidrata i lipida, ali je uključen i u funkcionisanje imunskog sistema, neurotransmisiju, lučenje hormona i signalizaciju. Oko 10 % svih proteina u eukariotskim ćelijama vezuje Zn i kod ljudi postoji oko 3000 Zn proteina. Cink je uglavnom vezan za proteine, peptide i amino kiseline u ćelijama. Slobodan Zn^{2+} jon je uključen u ćelijsku signalizaciju kao intracelularni glasnik (Hogstrand i Fu, 2014).

Bakar je neophodan za funkcionisanje citohrom c oksidaze u mitohondrijama. U ostale Cu zavisne enzime spadaju peptidilglicin monoooksigenaza, dopamin-p-monokigenaza, monoamino oksidaza, superoksid dismutaza (SOD) 1 i 3 i tirozinaza (Blackburn i sar., 2014). Ceruloplazmin i hefaestin su članovi velike superfamilije Cu oksidaza i katalizuju oksidaciju Fe (II) do Fe (III), što je kritičan korak u ćelijskom skladištenju i transportu Fe (Kosman, 2010; Sargent, 2005). Metalošaperoni su mali proteini sa visokim afinitetom za Cu (I) i gotovo bez afiniteta za Cu (II).

Postoji nekoliko razloga zašto su takvi sistemi izabrani od strane eukariota. Prvo, transport Cu (I) mnogo pre Cu (II) može iskoristiti jedinstvenu koordinaciju hemije Cu (I) i Ag (I) i eliminisati kompetitivne reakcije sa drugim dvovalentnim katjonima (Mn (II), Fe (II), Co (II) i Zn (II)), koji imaju slične sklonosti ka vezivanju za Cu (II). Drugo, Cu (I) mora biti dobro vezan unutar ćelije kako bi se izbeglo formiranje radikala kiseonika u Fentonovoj reakciji. Kada je koncentracija GSH u citoplazmi ~ 5 mM, Cu (I) se može transportovati preko kompleksa male molekulske mase, kao što je Cu(I)(GSH)₂. Međutim, ovaj scenario može uzrokovati probleme unutar ćelije pošto se Cu (I) vezuje za GSH relativno slabo, što dovodi do mogućnosti neselektivnog ugrađivanja Cu (I) na mestima koja zahtevaju druge metale kao što su FeS centri ili mesta za vezivanje Zn. Pored toga, poznato je da Cu (I) (GSH)₂ reaguje sa molekulskim kiseonikom (O₂) i stvara superoksidne radikale (O₂^{•-}), koji bi bili štetni u ćeliji.

Magnezijum je neophodan u regulaciji i funkcionisanju enzima, jonskih kanala, metaboličkih ciklusa i signalnih puteva. Neki glikolitički enzimi, kao što su heksokinaze, fosfofruktokinaze, fosfoglicerat mutaze, fosfoglicerat kinaze, enolaze i piruvat kinaze, aktiviraju se pri niskim, a inhibiraju sa visokim koncentracijama Mg²⁺. Adenilil ciklaza je još jedan enzim direktno regulisan preko Mg²⁺ (Birnbaumer i Zurita, 2010).

1.5.OKSIDATIVNI STRES

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, sa jednim ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, što ih čini veoma reaktivnim. Slobodni radikali mogu reagovati međusobno ili sa drugim manje reaktivnim vrstama i dovesti do niza lančanih reakcija (Đorđević i sar., 2000). U malim količinama se kontinuirano stvaraju u ćelijama kao nusprodukti metabolizma tokom različitih fizioloških procesa, uključujući apsorpciju zračenja, enzimske reakcije koje katalizuju oksidaze, procese oksido-redukcije u prisustvu metala promenljive valence, procese oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, fagocitozu, biotransformaciju supstrata u endoplazmatskom retikulumu, sintezu eikosanoida ili lipidnu peroksidaciju (LPO) nezasićenih masnih kiselina.

Oksidativna moć molekularnog kiseonika (O₂) je postojanje dva nesparena elektrona sa paralelnim spinom i mogućnost vezivanja samo za strukture koje imaju elektrone sa antiparalelnim spinom (Scandalios, 2005). Dodavanjem elektrona ili transferom energije na O₂,

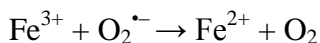
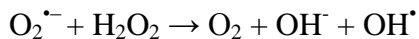
moгуće je ukloniti spinsku restrikciju, povećati reaktivnost O₂ i dobiti brojne ROS (Halliwell i Gutteridge, 1999, 2007; Droge, 2002). Jednoelektronskom redukcijom O₂ nastaje superoksidni anjon radikal (O₂^{•-}) dvoelektronskom vodonik peroksid (H₂O₂), a troelektronskom hidroksil radikal (OH[•]).

Glavno mesto stvaranja O₂^{•-} u ćeliji su kompleks I (NADH dehidrogenaza) i kompleks III (citohrom c reduktaza) respiratornog lanca mitohondrija, premda znatne količine O₂^{•-} nastaju i dejstvom različitih enzimskih sistema, kao što su peroksizomalna ksantin-oksidaza i membranski vezana redukovana nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH)-oksidaza (Buonocore i sar., 2010). Kao primarna ROS sa izuzetno visokim potencijalom stvaranja, O₂^{•-} je umereno reaktivan. Međutim, on može da interreaguje sa drugim molekulima, pri čemu stvara sekundarne reaktivne vrste, kada u reakciji između O₂^{•-} i azot oksida (NO[•]) nastaje reaktivni peroksinitrit (ONOO⁻) (Kruidenier i Verspaget, 2002).

Stvaranje H₂O₂ u ćeliji je omogućeno dvovalentnom redukcijom O₂ uz katalitičko dejstvo pojedinih enzima. Spontanom ili katalizovanom dismutacijom O₂^{•-} dolazi do nastanka H₂O₂, koji ima sposobnost da reaguje sa delimično redukovanim jonima metala (Fe²⁺ ili Cu⁺) u Fentonovoj reakciji (Valko i sar., 2007):



Na taj način formira se izuzetno reaktivan OH[•] koji ima poluživot samo oko 10 sekundi i reaguje blizu mesta formiranja dovodeći do velikih oštećenja ćelija. Hidroksilni radikal se formira i kad postoji povećano stvaranje O₂^{•-} i H₂O₂ u Haber-Weiss-ovoj reakciji u prisustvu prelaznog metala (Valko i sar., 2007):



Povećano stvaranje ROS uz smanjeni kapacitet AOS ćelije, može da pokrene OS i dovede do oksidativnih oštećenja ćelijskih konstituenata.

1.5.1. Oksidativna modifikacija biomolekula

Lipidna peroksidacija – predstavlja oksidaciju višestruko nezasićenih masnih kiselina sadržanih u ćelijskim membranama, tokom koje dolazi do oštećenja plazma membrane (Valko i

sar., 2007; Buonocore i sar., 2010). Krajnji proizvod lančane reakcije LPO je malondialdehid (MDA), biohemijski marker stepena oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana (Ayala i sar., 2014). Polinezasićene masne kiseline fosfolipidnog dvosloja ćelijskih membrana su ciljni molekuli za ROS koje dovode do promene propustljivosti membrane, narušavanja ćelijskog metabolizma, poremećaja homeostaze i konačno do ćelijske smrti (Kruidenier i Verspaget, 2002).

Oksidativna modifikacija DNK – ROS mogu da reaguju sa svim komponentama DNK molekula (purinske i pirimidinske baze, dezoksiribozna osnova) i dovedu do različitih oštećenja DNK (jednolančani i dvolančani prekidi, modifikacija purinskih i pirimidinskih baza i dezoksiriboze, delecija, mutacija i translokacija, unakrsna povezivanja u okviru jednog ili oba lanca DNK, kao i unakrsna povezivanja DNK i proteina). Oštećenja DNK pod dejstvom različitih ROS sprečavaju indukciju transkripcije, dovode do grešaka u replikaciji i genomske nestabilnosti, što predstavlja prvi korak u procesu mutageneze, karcinogeneze i starenja (Halliwell i Gutteridge, 1999; Buonocore i sar., 2010).

Oksidativna modifikacija proteina - male strukturne modifikacije proteina mogu dovesti do značajnih promena u ćelijskoj aktivnosti. Proces oksidacije proteina najčešće dovodi do nastanka novih funkcionalnih grupa (hidroksilnih i karbonilnih) (Kruidenier i Verspaget, 2002). Karbonilacija proteina je ireverzibilan proces u kome nastaju proteinski karbonili koji se koriste kao biomarkeri OS (Valko i sar., 2007; Almroth, 2008). Sekundarni efekti oksidacije proteina uključuju nastanak alkil, alkoksil i alkil-peroksil radikala, zatim fragmentaciju polipeptidnog lanca, promenu naelektrisanja proteina, povećanu osetljivost na proteolizu, protein-protein interakcije i agregaciju nastalih produkata (Scandalios, 2005). Narušavanje tercijarne strukture i funkcije različitih proteina (promene u aktivnosti enzima, receptora i transportnih proteina) može uzrokovati smrt ćelije (Almroth, 2008).

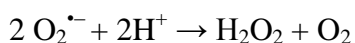
1.5.2. Antioksidativni sistem zaštite

Mehanizmi zaštite od povećane akumulacije ROS u ćeliji pre svega obuhvataju preventivne mehanizme, zatim reparativne mehanizme, mehanizme fizičke odbrane i mehanizme AOS (Buonocore i sar., 2010; Tandon i sar., 2003). Sa funkcionalnog aspekta AOS organizma obuhvataju tri nivoa delovanja:

- Sisteme AOS koji u potpunosti sprečavaju endogeno stvaranje SR i funkcionišu na osnovu prostorne razdvojenosti procesa u kojima se stvaraju SR;
- Angažovanje sistema u uslovima pojačanog stvaranja SR i prema prirodi i načinu delovanja se dele na enzimске i neenzimске. U enzimске sisteme zaštite spadaju primarni sistemi prve linije AOS, pre svega antioksidativni enzimi: SOD, CAT, glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR) i glutation S-transferaza (GST) (Halliwell i Gutteridge, 2007; Mates, 2000; Van der Oost i sar., 2003). Neenzimski sistemi AOS predstavljaju sekundarnu liniju odbrane (vitamini E i C, tiolova jedinjenja – GSH, lipoinjska kiselina, metionin, cistein, zatim koenzim Q, albumin, bilirubin, flavonoidi i druga fenolna jedinjenja biljnog porekla) i prema afinitetu i rastvorljivosti u lipidima dele na lipo- i hidrosolubilne (Griffith, 1999; Crane, 2001; Sevanian i sar., 1991). Neenzimsku AOS preko različitih mehanizama ostvaruju i farmakološki aktivne supstance (nesteroidni antiinflamatorni lekovi, blokatori Ca^{2+} , alopurinol, N-acetilcistein, ACE inhibitori, desferoksamin);
- Enzimski antioksidanti koji učestvuju u reparaciji nastalog oksidativnog oštećenja lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina (endo- i egzokleaze, DNK-ligaze, DNK polimeraze, klasična i fosfolipid-zavisna GPx, fosfolipaza A_2 , razni proteolitički enzimi, metionin-sulfoksid-reduktaza, glikozilaze i drugi) (Cadenas, 1989; Žikić i sar., 2000; Stajin i sar., 2007; Tandon i sar., 2003; Halliwell i Gutteridge, 2007; Chen i Tappel, 1995).

1.5.2.1. Enzimska antioksidativna zaštita

Superoksid-dizmutaza (SOD) - je metaloprotein (sa redoks aktivnim metalom) koji predstavlja prvu liniju odbrane od ROS i ima ključnu ulogu u zaštiti ćelije od oksidativnih oštećenja. Prevodi visoko reaktivni radikal $O_2^{\bullet-}$ u manje reaktivnu vrstu kiseonika H_2O_2 i molekularni O_2 prema jednačini:



Na osnovu metala koji je prisutan u aktivnom centru enzima i lokacije u ćeliji, ukupno su opisane tri različite izoforme ovog enzima kod sisara: SOD koja sadrži Cu i Zn (CuZnSOD) i nalazi se u citosolu eukariotskih ćelija, SOD koja sadrži mangan (MnSOD) i prisutna je kod prokariota i u mitohondrijama i peroksisomima eukariota kao homodimerna ili homotetramerna

izoforma i ekstracelularna SOD (ECSOD), koja u katalitičkom centru ima Cu i Zn (Alscher i sar., 2002).

Superoksid dismutaza (SOD1) je homodimerni protein koji vezuje jedan Cu i jedan Zn atom za monomer. U oksidovanom obliku Cu(II), Zn(II) jon se koordiniše preko monodentatnog karboksilata. Jedan od His liganda prelazi na Cu(II) jon, koji je dodatno koordinisan sa 3 His ostatka. U redukovanoj formi (Cu(I)) raskinuta je veza Cu sa histidinom. Malo se zna o tome kako apo-protein dobija Zn, ali se veruje da se ovaj korak dešava pre dodavanja Cu za formiranje EZn-SOD1 koji je monomer. Aktivni enzim zahteva formiranje kritične disulfidne veze između C57 i C146, koja omogućava da se prethodno formira aktivno mesto za vezivanje Cu i stabilizuje aktivni dimerni molekul. Aktiviranje apo-SOD1 stoga zahteva tri post-translacione modifikacije, za koje se veruje da prate redosled vezivanja Zn, zatim Cu(I) inkorporaciju i konačno formiranje disulfidne veze. Aktivacija SOD1 *in vivo* je prvo ispitivana na *S. cerevisiae*, gde je utvrđeno da je formiranje zrelog enzima 100 % zavisno od prisustva sporednog proteina LYS7, kasnije identifikovanog kao Cu šaperona za SOD (CCS). Novije studije su pokazale da je *S. cerevisiae* redak slučaj organizma koji pokazuje apsolutnu zavisnost i da većina sisara ima CCS-zavisne i nezavisne puteve za aktivaciju SOD1, koji su uslovljeni redukujućim potencijalom citoplazmatskog okruženja. Veruje se da je SOD1 jedan od retkih citoplazmatskih proteina koji ima oksidovani disulfid, a zavisnost sazrevanja proteina na CCS može biti povezan sa stepenom u kome tiol-disulfid ravnoteža može biti pokrenuta prema disulfidnom stanju na različitim redukcionim potencijalima citoplazme (Wedd and Maret, 2014).

Katalaza (CAT) - u aktivnom centru ima gvožđe Fe^{3+} vezano za porfirin hem grupu enzima i uključena je u razlaganje neradikalnog H_2O_2 do H_2O (Scandalios, 2005). Pri niskim koncentracijama H_2O_2 (< 1 mikroM) enzim pokazuje peroksidaznu reakciju i redukuje H_2O_2 koristeći različite donore vodonika, dok pri visokim koncentracijama supstrata (> 1 mikroM), CAT brzo uklanja H_2O_2 kroz katalaznu reakciju, gde je H_2O_2 i donor i akceptor vodonika. Katalaza ne može biti saturisana svojim supstratom H_2O_2 , tako da enzimska aktivnost raste linearno sa porastom koncentracije H_2O_2 (Kruidenier i Verspaget, 2002; Mates i Sanchez-Jimenez, 1999; Pryor i sar., 2006). U eukariotskim ćelijama CAT se nalazi u peroksizomima, citosolu i mitohondrijama (Fidaleo, 2010).

Glutation peroksidaza (GPx) – se nalazi u citosolu, mitohondrijama, peroksisomima i intermembranskom prostoru. Katalizuje redukciju H_2O_2 u H_2O i organskih hidroperoksida (ROOH) u alkohole (ROH), pri čemu kao kofaktor koristi glutation. Glutation peroksidaza ima veći afinitet za H_2O_2 u odnosu na CAT i ima važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama H_2O_2 , dok je CAT značajniji enzim u uslovima izrazitog OS (Kruidenier i Verspaget, 2002). Postoje tri forme GPx: selen-zavisna glutation peroksidaza (Se GPx), koja je homotetramer i sadrži Se u formi selenocisteina u svakoj subjedinici, zatim selen-nezavisna glutation-peroksidaza (non-Se GPx), koja je monomer i ima manji afinitet za H_2O_2 , a efikasno redukuje organske perokside i zahteva visoku koncentraciju glutationa i fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza (PH GPx), koja predstavlja monomerni selenoenzim i redukuje H_2O_2 , fosfolipidne hidroperokside i perokside holesterola (Andreyev i sar., 2005).

Glutation reduktaza (GR) - je detektovana u prokariotskim ćelijama i u citosolu i mitohondrijama eukariotskih ćelija (Ondarza i sar., 1983). Ovaj antioksidativni enzim katalizuje reakciju koja je esencijalna za stabilnost i integritet ćelije, jer prevodi oksidovani glutation (GSSG) u GSH, pri čemu kao redukujući ekvivalent koristi NADPH. Enzim predstavlja homodimerni flavoprotein koji u aktivnom centru ima redoks aktivan disulfid. Katalitički ciklus GR ima dve faze, prvo NADPH redukuje FAD, pri čemu se redukujući ekvivalent prenosi na redoks aktivan disulfid, a zatim dolazi do redukcije GSSG u aktivnom centru enzima (Ulus i Tandoğan, 2007). Enzim GR je zaslužan za održavanje pula glutationa uglavnom u redukovanom stanju, tako da ima značajnu ulogu u regulaciji redoks homeostaze u ćeliji (Dickinson i Forman, 2002).

Glutation S-transferaza (GST) – pripada grupi enzima koji imaju sposobnost da katalizuju reakciju tiol grupe GSH sa širokim spektrom drugih supstrata i formiraju bioetre (Keen i Jakoby, 1978). Svaki substrat ima zajednički elektrofilni ugljenik u osnovnoj hidrofobnoj strukturi i svaki reaguje sa nukleofilnom tiol grupom GSH dajući odgovarajući tioetar. Enzim GST katalizuje sledeću hemijsku reakciju:



pri čemu R može biti alifatična, aromatična ili heterociklična grupa, dok X može biti sulfatna, nitrilna ili halidna grupa (Sheehan i sar., 2001).

1.5.2.2. Neenzimski antioksidativni sistem

Metalotioneini (MT) – predstavljaju proteine male molekulske mase koji učestvuju u regeneraciji tkiva i regulišu ekspresiju gena čime doprinose zaštiti od toksičnih efekata ksenobiotika (Cherian i Kang, 2006). U molekulu MT, cistein-tiolatne grupe vezuju se sa jonima metala i grade metal-tiolatne grupe koje reaguju sa $O_2^{\bullet-}$ i OH^{\bullet} . Smatra se da MT imaju izraženu sposobnost uklanjanja OH^{\bullet} radikala, dok im je uloga u "neutralisanju" $O_2^{\bullet-}$ manja u poređenju sa SOD (Thornalley i Vasak, 1985). Pokazano je da molekuli MT ostvaruju antioksidativnu ulogu i neutralisanjem reaktivnih vrsta azota (RNS), koje se vezuju za cistein-tiolatne grupe MT i daju S-nitrozo-tiole (Misra i sar., 1996).

Glutation (GSH) – je tripeptid (L- γ -glutamil-L-cistenil-glicin) i predstavlja niskomolekulsko tiolno jedinjenje, koje čini 90 % ukupnih neproteinskih sulfhidrilnih jedinjenja ćelije (Parris i Kidd, 1997). Glutation je uključen u mnogobrojne metaboličke aktivnosti ćelije, gde spadaju AOS, detoksifikacija ksenobiotika, održavanje proteinske strukture i funkcije, regulacija sinteze i degradacije proteina, metabolizam leukotriena i prostaglandina, redukcija ribonukleotida do dezoksiribonukleotida, regulacija ćelijskog ciklusa, kao i genska ekspresija (Dickinson i Forman, 2002). Glutation se u citosolu nalazi u koncentraciji od 1-11 mM, u jedru 3-15 mM, u mitohondrijama od oko 5-11 mM (Valko i sar., 2007), dok je ekstracelularni nivo GSH nizak i njegova koncentracija iznosi nekoliko μ M (Schafer i Buettner, 2001). Glutation se sintetise u γ -glutamilskom ciklusu iz glutamata, cisteina i glicina uzastopnim dejstvom γ -glutamilcistein-sintetaze (γ -GCS) i glutation sintetaze (GS) uz prisustvo dva molekula adenozin trifosfata (ATP). Degradacija GSH se odigrava katalitičkim dejstvom γ -glutamil transpeptidaze, γ -glutamil ciklotransferaze, 5-oksoprolinaze i intracelularne proteaze (Anderson i Meister, 1983).

Glutation je kofaktor nekih antioksidativnih enzima, uključen je u direktno uklanjanje slobodnih radikalskih vrsta $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} i $ONOO^-$, kao i lipidnih radikala i hidroperoksida, regeneriše važne neenzimske antioksidante (askorbinsku kiselinu, α -tokoferol) do njihovih aktivnih formi, uključuje se u direktnu popravku oksidativnih oštećenja molekula DNK i sprečava apoptozu izazvanu ROS i citokinima (Kruidenier i Verspaget, 2002).

Pored toga, glutation je jedan od značajnih liganada koji vezuju metale, tako da ima važnu ulogu u transportu, deponovanju i metabolizmu metala. Sulfhidrilna grupa cisteina u molekulu

GSH ima visok afinitet za metale i formira merkaptide sa nekoliko endogenih metala, kao što su Cd, Cu, Se, Zn, hrom, olovo i živa (Wang i Ballatori, 1998).

Glutation postoji u dve forme, redukovanoj tiolnoj GSH formi i oksidovanoj disulfidnoj GSSG formi (Parris i Kidd, 1997). Ključni funkcionalni element molekula glutaciona je aminokiselina cistein, koja poseduje reaktivnu tiolnu grupu (-SH), zbog čega je odgovorna za mnoge funkcije glutaciona. Pri normalnim fiziološkim uslovima, više od 98 % intracelularnog glutaciona je u redukovanom stanju, dok je ostatak prisutan u ćeliji u vidu disulfidne forme GSSG, mešanih disulfida (uglavnom GSS-protein) i tioestara (Wang i Ballatori, 1998). Oksidovani glutation u normalnim okolnostima čini manje od 1 % ukupnog glutaciona, dok u stanju OS dolazi do povećanja koncentracije GSSG (Brigelius-Flohe, 1999).

Glutation je redukujući ekvivalent u redukciji H_2O_2 i lipidnih hidroperoksida pod dejstvom antioksidativnog enzima GPx i konjugujući je molekul u reakciji sa enzimom faze II biotransformacije GST koja olakšava ekskreciju ksenobiotika. Obe ove reakcije dovode do stvaranja GSSG. Enzim GR konvertuje GSSG u GSH uz prisustvo redukovanog NADPH koji se obezbeđuje iz glukozomonofosfatnog ciklusa. Glukozo-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH) stvara NADPH, molekul koji je esencijalan za funkcionisanje mnogih antioksidativnih enzima (Halliwell i Gutteridge, 1999; Almroth, 2008).

1.6.REPRODUKTIVNA ANATOMIJA I FUNKCIJA TESTISA SISARA

Reproduktivna toksičnost je potvrđena na ljudima i životinjama nakon izlaganja alkoholu i/ili Cd, pri čemu su testisi naročito osetljivi (Brzóška i sar., 2013; Kojima i sar., 1993; Al-Bader i sar., 1999).

Muški polni organi se dele na spoljašnje i unutrašnje. Unutrašnji polni organi su:

semenik (lat. testis),

semeni putevi - pasemnik (lat. epididymis), semevod (lat. ductus deferens) i briznik (lat. ductus ejaculatorius),

žlezde pridodate semenim putevima - semena kesica (lat. vesica seminalis), prostata (lat. prostata) i bulbo-uretralne žlezde (lat. glandulae bulbo-urethrales).

Spoljašnji polni organi su:

polni ud (lat. penis),

mokraćna cev (lat. urethra masculine),

mošnice (lat. scrotum) (Nikolić i sar., 2014).

Osnovne funkcije muškog reproduktivnog sistema su produkcija, sazrevanje, deponovanje muških polnih ćelija (spermatozoida) odnosno spermatogeneza i sinteza muških polnih hormona. Spermatozoidi i sekreti genitalnih kanala i žlezda čine spermu (lat. sperma, seme) (Shiraishi i sar., 2012). Na oplodnu moć sperme utiče više faktora, uključujući zapreminu sperme, kao i broj, morfologija i pokretljivost spermatozoida (Katen i Roman, 2015).

Semenik je parni ovoidni polni organ koji se nalazi u preponskom delu tela, unutar kožnog nabora koji se naziva skrotum. Razvijaju se u retroperitonealnom prostoru na dorzalnom zidu trbušne šupljine. U toku procesa migracije oni se spuštaju u skrotum, zbog čega je svaki testis obavijen seroznom vrećicom – tunikom vaginalis (tunica vaginalis), koja predstavlja peritoneum prednjeg trbušnog zida. Njihovu površinu gradi fibrozna opna, takozvana čaura testisa (tunica albuginea). Sa duboke strane čause se odvajaju fibrozne pregrade (septulae testis) koje dele parenhim semenika na 250-400 režnjića (lobulosa). Pregrade konvergiraju ka zadnjoj ivici testisa, gde se međusobno spajaju i grade vezivno zedebljanje nazvano mediastinum testis. U svakom od lobulosa se nalaze 1-4 izuvijana semena kanalića (tubuli seminiferi convoluti) okružena rastresitim intersticijalnim vezivnim tkivom (peritubularno tkivo). Ono obezbeđuje mehaničku potporu i kontraktilnost kanalića, a čine ga Lajdigove (eng. *Leydig*) ćelije, krvni i limfni sudove, nervna vlakna, fibroblasti, mioidne kontraktilne ćelije, mastociti i makrofage. U svakom testisu se nalazi 600-1200 semenih kanalića dužine 80 cm, koji proizvode spermatozoide, dok Lajdigove ćelije proizvode muške polne hormone (Yeung, 2010).

Lajdigove ćelije su velike poligonalne acidofilne ćelije koje sadrže znatnu količinu glatkog endoplazmatičnog retikuluma, mitohondrija sa tubulovezikularnim kristama, masnih kapljica i veoma dobro razvijen Goldžijev aparat. Smeštene su uz same zidove semenih kanalića, imaju krupno asimetrično postavljeno jedro i eozinofilnu citoplazmu. Jedro sadrži jedno do tri jedarceta i velike količine periferno postavljenog heterohromatina. Lajdigova ćelija pod uticajem luteinizirajućeg hormona (LH) adenohipofize pored grupe androgenih hormona sintetiše i

oksitocin, lipotropin, beta-endorfin, dinorfin, angiotenzin i prostaglandin (Razi i Malekinejad, 2015).

Semeni kanalići imaju oblik latiničnog slova U i veoma su izuvijani. Epitel semenog kanalića je specifičan višeslojni epitel. Sastoji se od potpornih ili Sertolijevih ćelija (Sertoly ćelije) i spermatogenih ćelija - spermatogonija, primarnih spermatocita, sekundarnih spermatocita, spermatida i spermatozoida (Razi i Malekinejad, 2015). Završni delovi svih semenih kanalića su pravi kanalići (tubuli recti), koji se polazeći iz različitih lobusa udružuju i formiraju mrežu kanalića (rete testis). Iz rete testis izlazi 6-8 kratkih kanalića (ductuli efferentes) koji se ulivaju epididimis. Tubuli recti, rete testis i ductuli efferentes čine zajedno unutar testisne genitalne kanale.

Spermatogene ćelije su muške germinativne ćelije koje se dele i migriraju u pravcu bazalne membrane semenog kanalića ka njegovom lumenu, pri čemu postepeno sazrevaju (Qian i sar., 2014). Germinativni epitel leži na podepitelskoj lamini, a oko lamine se nalaze mioidne ćelije sa kontraktilnom funkcijom. Germinativne ćelije su:

spermatogonije (stem ćelije) – matične ćelije semenog epitela. Moguće je razlikovati dva tipa spermatogonija, od kojih jedne produžavaju deobu i predstavljaju izvor spermatozoida tokom čitavog života (stem ćelije ili spermatogonije tipa A), a drugi tip prestaje sa deobom i ulazi u fazu rasta i sazrevanja dajući spermatozoide (spermatogonije tipa B) (McLaren, 1998). Spermatogonije tipa B se diferenciraju u primarne spermatocite sa diploidnim brojem hromozoma u proliferativnoj fazi spermatogeneze ili fazi spermatocitogeneze;

primarni i sekundarni spermatociti – podležu mejotičkim deobama, tako da broj hromozoma u primarnim spermatocitama ostaje diploidan, ali se menja količina DNK u njima. U toku faze rasta vrši se replikacija DNK, tako da primarne spermatocite imaju duplo veću količinu DNK u odnosu na spermatogonije. Sazrevanje se vrši kroz mejozu I i II. Mejoza I je redukciona deoba u kojoj se ćelija sa diploidnim brojem hromozoma podeli na dve sa haploidnim brojem. U mejozi II, koja je mitotička deoba, svaka haploidna ćelija se podeli na još dve. Primarna spermatocita se mejozom I podeli na dve sekundarne spermatocite sa haploidnim brojem hromozoma, tako da od jedne diploidne spermatocite mejozom I i II nastaju četiri haploidne spermatide (McLaren, 1998);

spermatide - nastaju u procesu mejotičke faze spermatogeneze od sekundarnih spermatocita i imaju takođe haploidni broj hromozoma. Spermatide se nalaze u apikalnim delovima semenog epitela i u procesu spermiogeneze se diferenciraju u spermatozoide. Složen proces spermiogeneze uključuje formiranje akrozoma, kondenzaciju hromatina i izduživanje jedra, razvoj flagele od centriola i gubitak najvećeg dela citoplazme kroz 4 podfaze: Goldžijeva, faza kape, akrozomska i maturaciona faza (Carreau i Isabelle, 2007).

U toku mejotičke deobe Y hromozom odlazi u jednu od spermatida, a X hromozom odlazi u drugu, tako da u funkcionalnom smislu postoje spermatozoidi koji sadrže X hromozom i određuju ženski pol i spermatozoidi koji sadrže Y hromozom i određuju muški pol (Taketo, 2015).

Konačan rezultat spermiogeneze je formiranje zrelog spermatozoida koji se oslobađa u lumen semenog kanalića. Spermatozoid se sastoji od glave i repa. Glava spermatozoida poseduje tamno jedro sa 23 hromozoma i akrozom koji sadrži hijaluronidazu i proteolitičke enzime, koji na početku oplodjenja razgrađuju sekundarnu ovocitu u toku procesa akrozomalne reakcije i omogućavaju spajanje spermatozoida sa sekundarnom ovocitom. Rep spermatozoida sastoji se od centralnog skeleta sastavljenog od 11 mikrotubula (aksonema, omogućava pokretljivost spermatozoida), ćelijske membrane i grupe mitohondrija (Zhang i sar., 2012).

Spermatogeneza je hormonski regulisan proces. Lučenje muških polnih hormoni ili androgena, među kojima su najvažniji testosteron i androsteron, je regulisano hormonima adenohipofize, tj. folikulostimulirajućim hormonom (FSH) koji stimuliše rast i funkciju semenih kanalića i LH koji stimuliše Lajdigove ćelije na lučenje androgena (Robaire i Henderson, 2006). Muški polni hormoni u organizmu stimulišu procese anabolizma, ubrzavaju rast i razviće organa, regulišu promet azota i kalcijuma, podstiču sintezu DNK i ribonukleinske kiseline (RNK) i stimulišu stvaranje specifičnih ribozomskih proteina. Testosteron je važan seksualni hormon koji omogućava razvijanje muških polnih organa, reguliše produkciju sperme, pojačava rast dlaka na telu i licu, povećava rast mišića, seksualnu želju i podstiče agresivno ponašanje.

Sertolijeve ćelije su rezidentne epitelne ćelije semenih kanalića koje ne migriraju i ne dele se (Razi i Malekinejad, 2015). One su piramidnog, izduženog oblika i pružaju se celom debljinom epitela. Bočnim stranama obuhvataju germinativne ćelije. U fetalnom periodu Sertolijeve ćelije sekretuju Milerov inhibicioni faktor (MIF) (Meinhardt i sar., 2000).

Osnovne uloge ovih ćelija su da:

pružaju strukturnu i metaboličku potporu spermatogenim ćelijama,
formiraju krvno-testisnu barijeru,
vrše fagocitozu viška citoplazme spermatide (rezidualna tela) i njihovu razgradnju,
sekretuju androgen-vezujući protein koji služi za koncentrisanje testosterona u semenim
kanalićima i
sekretuju inhibin koji smanjuje sintezu i izlučivanje FSH iz hipofize.

Krvno-testisna barijera (KTB) odvaja spermatogonije u bazalnom odeljku semenog epitela
ispod barijere od ostalih germinativnih ćelija u lumenskom odeljku epitela iznad barijere. Čvrste
veze između susednih Sertolijevih ćelija dele seminiferni epitel na bazalni deo gde se nalaze
spermatogonije i adluminski deo koji sadrži spermatocite i spermatide.

Osnovna uloga KTB ogleda se u:

stvaranju mikrosredine koja pogoduje diferencijaciji germinativnih ćelija,
zaštiti germinativnih ćelija lumenskog odeljka od materija koje mogu dospeti iz krvi i
zaštiti germinativnih ćelija od imunskog sistema (Gao i sar., 2016).

Na taj način, KTB sprečava prolaz antitela u lumenski odeljak čime štiti germinativne ćelije
od autoimunske reakcije organizma (Bandivdekar, 2014). Unutartestisni genitalni kanali nose
spermatozoide i tečnost od semenih kanalića do duktus epididimisa. Obloženi su samo
Sertolijevim ćelijama ili kockastim epitelom i postepeno se spajaju formirajući duktus epididimis
u epididimisu.

Pasemnik je parni organ postavljen na gornjem polu i gornjem delu zadnje ivice semenika
(Cornwal i sar., 2011). Sadrži glavu, telo, rep i veoma dug pasemnički kanal (lat. ductus
epidydimis). Sperma kroz njega kontinuirano putuje 4-6 nedelja, tako da on odvodi spermu iz
testisa i služi za skladištenje spermatozoida. U pasemniku spermatozoidi ostaju 10 dana i
završavaju svoj razvoj.

Ekstratestisni genitalni kanali transportuju spermatozoide iz testisa do penisa i čine ih:

ductus epididymis – nalazi se u epididymisu i predstavlja izvijanu cev dužine 40-60 cm, okruženu vezivnim tkivom i krvnim sudovima. Zid duktus epididymisa je građen od mukoze, mišićnog sloja i adventicije. Prolaskom kroz ovaj sloj spermatozoidi sazrevaju i postaju pokretljiviji zahvaljujući sekretu cilindričnih epitelnih ćelija (Cohen i sar., 2007);

ductus deferens – semevod je mišićno sluzokožna prava cevi dužine 60 cm, promera 0,5 mm i deo je semenih puteva. Duktus deferens se prostire od repa pasemnika kroz preponski kanal i malu karlicu do baze prostate, gde se spaja sa izvodnim kanalom semene kesice u briznik. Njegov debeli zid je građen od mukoze, debelog glatkomišićnog sloja i adventicije i ima uski lumen. Tokom ejakulacije glatki mišići u semevodu se refleksno kontrahuju, pomerajući spermu napred. U spermu se izlivaju sekreti iz akcesornih polnih žlezda i ona prelazi u mokraćnu cev;

mokraćna cev (lat. urethra masculina) – prostire se od bešike do glansa penisa, poseduje unutrašnji i spoljašnji otvor i dužine je oko 15 cm. Uretra služi kao izvodni mokraćni kanal i kao semeni put. U zavisnosti kroz koji organ prolazi, deli se na prostatični deo, opnasti i spongiozni deo. U njenoj unutrašnjosti se nalaze spiralni nabori zbog bržeg protoka urina i sperme (Vignozzi i sar., 2008);

briznik (lat. ductus ejaculatorius) je parni kanal, dužine do 2,5 cm, koji nastaje spajanjem donjeg dela semevoda sa izvodnim kanalom semene kesice (Gur i sar., 2007).

U ekskretornim (vantestisnim) genitalnim kanalima odvijaju se završni stadijumi morfološkog i funkcionalnog sazrevanja spermatozoida, uklanjaju se nefunkcionalni spermatozoidi i modifikuje tečnost koja se sa njima izbacuje. Tako se, na primer, u kanalu epididymisa odvija završno kondenzovanje nukelusa spermatozoida, redukuje količina citoplazme, menjaju karakteristike citoplazmatske membrane i spermatozoid postaje aktivno pokretan.

Genitalne žlezde muškog reproduktivnog sistema stvaraju sekret neophodan za reproduktivnu funkciju. U ove žlezde spadaju:

semene vezikule (lat. vesica seminalis) – predstavljaju savijene cevi dužine 15 cm i proizvode sekret koji sadrži ugljene hidrate, citrat, inozitol, prostaglandine i proteine koagulacije, koji aktiviraju spermatozoide. Semene kesice stvaraju 90 % tečnosti koja će ući u sastav ejakulata.

Sekret semenih kesica spermatozoidima obezbeđuje fruktozu, kao najvažniji metabolički supstrat;

prostata (lat. prostata) – predstavlja neparan fibromuskularni žlezdani organ neposredno ispod mokraćne bešike koja obuhvata prvih nekoliko centimetara uretre. Smešten je u potperitonealnom delu karlice. Oko prostate se nalazi debela fibroelastična kapsula bogata glatkim mišićnim ćelijama (Frick i Aulitzky, 1991). Parenhim prostate čine žlezde koje su organizovane u tri sloja (mukozne, submukozne i glavne žlezde) oko uretre. U sastav semene tečnosti ulazi i sekret prostate koji čini serozna beličasta tečnost bogata lipidima, proteolitičkim enzimima, kiselim fosfatazama, fibrinolizinom, limunskom kiselinom, cinkom i prostata-specifičnim antigenom. Sekret prostate sadrži materije koje štite reproduktivne i mokraćne puteve od infekcije. U njemu se nalaze mnoge aktivne supstance čija je uloga zaštita spermatozoida, omogućavanje pokretljivosti i preživljavanje. Žlezde su okružene izuzetno razvijenom fibromuskularnom stromom (Schilit i Benzeroual, 2009). Struktura i funkcija prostate zavise od nivoa testosterona;

bulbouretralne žlezde – predstavljaju parne tubuloalveolarne žlezde, obložene kockastim epitelom, promera 3-5 mm i nalaze se proksimalno od membranskog dela uretre u koju se prazne. Bulbouretralne žlezde luče proziran slabo alkalni sekret, koji vlaži mokraćnu cev i neutrališe njenu kiselost neposredno pred samu ejakulaciju (Mawhinney i Mariotti, 2000).

1.7. OKSIDATIVNI STRES I TESTISI

Zagađivači životne sredine, gde spadaju različite hemikalije koje se koriste u industriji i domaćinstvu, pesticidi, đubriva, teški metali i jonizujuće zračenje, predstavljaju ključne faktore odgovorne za nastanak OS. Trovanje teškim metalima, posebno olovom, Cd, arsenom i živom predstavlja ozbiljnu pretnju po zdravlje ljudi (Hu, 2000; WHO, 1992).

Studije vezane za reproduktivni problem kod muškaraca kao glavni uzročni faktor navode OS (Kaur i Bansal, 2004). Poznato je da je OS u tkivima rezultat neravnoteže između stvaranja ROS/RNS i njihovog efikasnog uklanjanja od strane AOS (Turner i Lysiak, 2008). Slobodni radikali uzrokuju degeneraciju tkiva testisa i na taj način sprečavaju steroidogenezu gonada (Debnath i Mandal, 2000). Zrela sperma je bogata polinezasićenim masnim kiselinama u kojima

je naročito značajan efekat OS (Aitken i Clarkson, 1987). Reakcije OS u testisima pokreću se zbog povećane akumulacije intracelularnih ROS, visokog nivoa proteinskih karbonilnih grupa i pokrenutog procesa LPO. Oksidacija preko ROS smanjuje pokretljivost spermatozoida i udružena je sa muškim infertilitetom (Baker i sar., 1996; Sharma i Agarwal, 1996). Pored toga, reaktivni intermedijeri interreaguju sa ćelijskim makromolekulima i uzrokuju LPO, oštećenje DNK i degradaciju membranskih proteina (Koizumi i Li, 1992; Szuster-Ciesielska i sar., 2000).

Pored makrofaga i neutrofila, u patološkim uslovima ROS u velikim količinama stvaraju i spermatozoidi (Aitken i Clarkson, 1987) i drugi tipovi ćelija. Svaki oksidovani radikal je potencijalni agens OS. Neki od njih su veoma reaktivni sa kratkim vremenom poluraspada, kao što je $\text{OH}\cdot$, dok su drugi manje reaktivni, ali sa dužim vremenom poluraspada, kao što je H_2O_2 . Posledica dužeg poluživota je potencijal za veću difuzionu udaljenost, koja može pokrenuti reaktivne vrste da prouzrokuju udaljena oštećenja od mesta nastanka. Oksidativna oštećenja mogu zahvatiti mnoge klase molekula, uključujući lipide, proteine, nukleinske kiseline i šećere, što znači da OS mogu podleći ćelije, membrane jedra i mitohondrije, strukturni i citoplazmatski proteini, složeni ugljeni hidrati, RNK i DNK (Pryor i sar., 2006). U tkivu testisa, koje poseduje ubrzani metabolizam i replikaciju ćelija, efekti pokrenutog OS su razarajući, tako da je veoma važan antioksidativni kapacitet tkiva.

Istraživanja mnogih laboratorija u svetu su potvrdila da je ekspresija svih antioksidativnih enzima veoma izražena u testisima (Zini i Schlegel, 1997; Maiorino i sar., 2003; Ischi i sar., 2005). Superoksid dizmutaza postoji u citosolnom, mitohondrijalnom i ekstracelularnom obliku, pri čemu sve forme katalizuju dizmutaciju $\text{O}_2^{\cdot-}$ sukcesivnom oksido-redukcijom prelaznog metala na aktivnom mestu enzima (Hsieh i sar., 1998).

Prethodne studije na različitim patologijama pokazale su povezanost akutnog smanjenja proizvodnje testosterona u testisima sa stvaranjem ROS i pokretanjem OS u ovom organu. Sama steroidogeneza dovodi do produkcije ROS, uglavnom u toku mitohondrijske respiracije i katalitičkim reakcijama steroidogenih citohrom P450 enzima (Peltola i sar., 1996; Hales, 2002; Hanukoglu, 2006). Stvaranje ROS u toku spermatogeneze usled neefikasnosti intracelularnih antioksidanasa, može oštetiti membrane mitohondrija i posledično dovesti do inhibicije stvaranja steroidnih hormona (Luo i sar., 2006). Kod prosečnog muškarca, oksidativna oštećenja u toku

steroidogeneze mogu biti više hronični nego akutni faktor i vode ka procesu karakterističnom za starenje, odnosno ka smanjenju nivoa testosterona (Chen i Zirkin, 1999; Luo i sar., 2006).

2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Naučna javnost je ocenila da je rešavanje problema alkoholizma i ekspozicije Cd (humanom karcinogenu) od vodećeg značaja po javno zdravlje. Takođe, dostupne epidemiološke sudije su pokazale da su pušenje i alkoholizam (in)direktno povezane sa spermatogenezom i uzročnosti su nepolodnosti kod muškaraca.

Istraživanje toksičnih mehanizama pri koekspoziciji većem broju agenasa, tzv. *koktel efekat*, je izuzetno kompleksan i intrigantan naučni izazov, gotovo nedokučiv. Takođe je poznato je da se zavisnost od alkohola i duvana, kao i njihova toksičnost, može razviti preko sličnih mehanizama.

Poznato je da upotreba DSF, leka za averzivnu terapiju alkoholizma, usled prisustva slobodne sulfhidrilne grupe (-SH) u hemijskoj strukturi metabolita, dietilditiokarbamata, ukazuje na redukcion i helirajući potencijal DSF koji umnogome može da promeni metabolizam kako ispitivanih toksičnih agenasa (etanola i Cd), tako i esencijalnih bioelemenata, kao i endogenih jedinjenja koja poseduju -SH grupe zbog mogućih reakcija tiolnog ukrštanja.

Animalna studija je postavljena tako da imitira uslove pojedinačne i paralelne ekspozicije ispitivanim agensima i testira sledeće **HIPOTEZE**:

pojedinačna i paralelna izloženost etanolu i Cd ispoljava toksične efekte na testise tretiranih pacova;

pored specifičnih mehanizama toksičnosti očekuje se da će testirani agensi ispoljiti i zajednički mehanizam toksičnosti u čijoj osnovi je razvoj OS u testisima tretiranih pacova;

DSF i njegovi metaboliti će ostvariti antioksidativni efekat, pre svega usled njegovog potencijala da helira metale (uključujući i Cd), koji potenciraju OS kroz Fentonovu reakciju.

Na osnovu predloženih hipoteza zadati su sledeći **CILJEVI** istraživanja:

postaviti animalni model na Wistar pacovima koji imitira humane uslove izlaganja etanolu i Cd; na osnovu promene redoks parametara u tkivu testisa pacova proceniti uključenost SR u mehanizam toksičnog delovanja etanolu i Cd i ustanoviti najosetljiviji oksidativni marker njihove reproduktivne toksičnosti;

utvrditi eventualni protektivni efekat DSF na testise pacova prethodno subakutno izloženih etanolu i/ili Cd i pri udruženoj ekspoziciji sa Cd, ispitujući androgeni status, morfološke i funkcionalne karakteristike testisa;

izvršiti evaluaciju antioksidativnog efekata DSF u testisima i njegovog uticaja na status esencijalnih bioelemenata, kao i toksičnog Cd u testisima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Ispitivanja su vršena na mužjacima pacova, rasa *Wistar (Rattus norvegicus)*, telesne mase 220-250 g, gajenim na farmi za uzgoj eksperimentalnih životinja Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beogradu. Tokom rada sa životinjama poštovani su Etički principi rada na laboratorijskim životinjama propisanih od strane VMA u Beogradu kao i Zakon o zaštiti i dobrobiti životinja („Službeni glasnik RS“, broj 41/09), koji su usklađeni sa pravilima Evropske zajednice za ovu oblast – European Community Guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC). Eksperiment je odobren od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (br: 323-07-04924/2015-05/3).

Životinje su čuvane u vivarijumu VMA u plastičnim kavezima sa žičanom rešetkom na vrhu, u klimatski kontrolisanim uslovima (temperatura od 23 ± 2 °C, relativna vlažnost vazduha od 55 ± 3 %, sa ciklusom svetlos/tama 13/11h). Sve životinje su tokom trajanja eksperimenta živele pod istim uslovima sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Nakon perioda prilagođavanja na laboratorijske uslove u trajanju od dve nedelje sve ekperimentalne procedure na životinjama su izvođene između 9 i 13 časova.

3.2. DIZAJN EKSPERIMENTA

Postavka ove animalne studije je pokušaj da shvatimo efekte etanola i Cd na muške reproduktivne organe pacova, kao i efekte DSF, pri individualnoj i paralelnoj ekspoziciji, koji bi mogli da se ekstrapoliraju na čoveka, konkretno na alkoholičare i/ili alkoholičare-pušače (što je najčešći slučaj) na averzivnoj terapiji odvikavanja od alkohola, primenom DSF. Tokom terapije DSF podrazumeva se prestanak unosa alkohola, da ne bi došlo do ispoljavanja neželjenih efekata DSF-alkohol reakcije. Pušenja cigareta prema SZO predstavlja povećan rizik izloženosti Cd.

3.2.1. Eksperimentalne grupe pacova

Životinje su slučajnim odabirom podeljene na kontrolne grupe, kontrolne grupe/maslinovo ulje i 7 eksperimentalnih grupa, od kojih je svaka grupa podeljena u 4 ili 6 podgrupa ($n = 6$) u odnosu na dužinu izloženosti svakoj od ispitivanih supstanci pojedinačno, odnosno njihovoj kombinovanoj primeni. Podela eksperimentalnih životinja na grupe i obeležavanje:

Kontrolne grupe – netretirane životinje koje su imale slobodan pristup hrani i vodi 1, 21 i 42 dana, odnosno životinje kojima je od početka davano 0,5 ml maslinovog ulja u trajanju od 1 i 21 dana, kao i životinje koje nisu tretirane prvih 21 dan, a potom im je uvedeno maslinovo ulje i davano narednih 21 dan (podgrupe su označene kao: **K₁**, **K₂₁**, **K₄₂**, **MU₁**, **MU₂₁** i **KMU₄₂**);

Alkoholna (A) grupa - životinje kojima je *per os* (putem oralne sonde) aplikovano 3 ml 20 % rastvora etanola/dan tokom 1, 3, 10 i 21 dan (podgrupe su označene kao: **A₁**, **A₃**, **A₁₀** i **A₂₁**);

Kadmijum (Cd) grupa – životinje kojima je intraperitonealno (*i.p.*) aplikovan 1 mg CdCl₂/kg/dan tokom 1, 3, 10, 21, 31 i 42 dana (podgrupe su označene kao: **Cd₁**, **Cd₃**, **Cd₁₀**, **Cd₂₁**, **Cd₃₁** i **Cd₄₂**);

Disulfiram (DSF) grupa - životinje kojima je *per os* aplikovano 178,5 mg DSF/kg/dan tokom 1, 3, 10 i 21 dan (podgrupe su označene kao: **DSF₁**, **DSF₃**, **DSF₁₀** i **DSF₂₁**);

Kadmijum i alkohol (Cd+A) grupa - životinje kojima su istovremeno aplikovani Cd i etanol tokom 1, 3, 10 i 21 dan (udružena ekspozicija) (podgrupe su označene kao: **A₁/Cd₁**, **A₃/Cd₃**, **A₁₀/Cd₁₀**, i **A₂₁/Cd₂₁**),

Alkohol i disulfiram (A+DSF) grupa - životinje kojima je aplikovan etanol tokom 21 dana a potom je prekinut unos etanola i uveden DSF tokom 1, 3, 10 i 21 dana (ukupna izloženost životinja: 22, 24, 31 i 42 dana) (podgrupe su označene kao: **A₁₋₂₁/DSF₂₂**, **A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₂₄**, **A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₃₁** i **A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂**);

Kadmijum i disulfiram (Cd+DSF) grupa - životinje kojima je aplikovan Cd tokom 1, 3, 10 i 21 dana a potom uveden DSF, uz nastavak unosa Cd tokom 1, 3, 10 i 21 dana (ukupna izloženost životinja: 22, 24, 31 i 42 dana) (podgrupe su označene kao **Cd₁₋₂₂/DSF₂₂**, **Cd₁₋₂₄/DSF₂₂₋₂₄**, **Cd₁₋₃₁/DSF₂₂₋₃₁** i **Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂**); i

Kadmijum, alkohol i disulfiram (A+Cd+DSF) grupa - životinje kojima su aplikovani Cd i etanol tokom 1, 3, 10 i 21 dana a potom uveden DSF tokom 1, 3, 10 i 21 dana, uz nastavak unosa

Cd i prekid unosa etanola (ukupna izloženost životinja: 22, 24, 31 i 42 dana) (podgrupe su označene kao $A_{1-21}/Cd_{1-22}/DSF_{22}$, $A_{1-21}/Cd_{1-24}/DSF_{22-24}$, $A_{1-21}/Cd_{1-31}/DSF_{22-31}$ i $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$).

Suspenzija DSF (Esperal® tablete 500 mg, 20 tableta u pakovanju, proizvođač SANOFI-AVENTIS ZRT, Budimpešta, Mađarska) u maslinovom ulju i vodeni rastvor etanola (C_2H_5OH , čistoće 96 %, Sigma-Aldrich, Švajcarska) su aplikovani životinjama oralno pomoću sonde, dok je *i.p.* primenjen vodeni rastvor Cd-hlorida ($CdCl_2 \cdot xH_2O$, čistoće 99,99 %, Merck, Darmstadt, Nemačka).

Po završetku eksperimenta životinjama je uzeta krv, potom su anestetizirane injekcijom Napentobarbitala (Vetanarcol, Werfft-Chemie, Beč, Austrija) (50 mg/kg), žrtvovane postupkom dekapitacije i izvađeni su im i izmereni testisi. Krv i testisi su zamrzavani i čuvani na temperaturi $-80\text{ }^\circ\text{C}$ do pripreme uzoraka za analizu parametara OS, AOX i određivanje sadržaja testosterona.

3.2.2. Priprema reagenasa i režim doziranja je bio sledeći:

DSF: doza održavanja za čoveka je 125 mg/70 kg t.m./dan, što odgovara dozi od 178,5 mg/kg t.m. pacova (44,6 mg/250 g t.m. pacova); 1 tableta Esperala sadrži 500 mg aktivne supstance – DSF; dve tablete su sprasene i suspendovane u 11,21 ml maslinovog ulja (44,6 mg/0,5 ml je jedna primenjena doza za pacova);

$CdCl_2$: u skladu sa literaturom, mužjacima pacova je *i.p.* administrirano 0,2 ml rastvora 250 mg $CdCl_2/200\text{ ml}$ (tj. 0,25 mg Cd/250 g t.m. pacova), što odgovara dozi od 1 mg $CdCl_2/kg/dan$, tokom 21 dana (subakutna toksična doza). Naime, Nigam i sar. su primenjivali *i.p.* 1 mg $CdCl_2/kg/5$ dana nedeljno/3 meseca kod Albino pacova; Shaikh i sar. su primenjivali subkutano 5 pmol $CdCl_2/kg/dan$ (što odgovara dozi od 0,91mg $CdCl_2/kg/dan$) tokom 22 nedelje, kod Sprague-Davlei pacova; a Nagamine i sar. su davali *i.p.* 3 mg $CdCl_2/kg/3$ puta nedeljno/27 nedelja miševima (Nigam i sar., 1999; Shaikh i sar., 1999; Nagamine i sar., 2007). Distribucija Cd u krvotok nakon *i.p.* aplikacije kao i nakon inhalacije je gotovo jednaka, prema utvrđenom koeficijentu korelacije ($r: 0.78 - 0.9$) (Honma i sar., 1998). Odabrani termini uzorkovanja (1, 3, 10 i 21 dana) su u skladu sa procenom postignutih toksičnih efekata (Thorne, 2001).

etanol: 96 % alkohol je razblažen (4,8 puta) da bi se dobio 20 % (10 ml 96 % etanola se dopuni 48 ml destilovanom vodom); aplikovano je 3 ml 20 % alkohola u dve podeljene doze (1,5 g 20 % alkohola ujutro i poslepodne).

3.3.HISTOPATOLOŠKA ANALIZA TESTISA PACOVA

Histopatološka analiza testisa pacova svih eksperimentalnih grupa je urađena kako bi ustanovili da li je i u kom stepenu kompromitovana morfologija testisa dejstvom testiranih agenasa.

3.3.1. Priprema tkiva testisa za histopatološku analizu

Deo testisa je fiksiran u 10 % neutralnom formalinu (pH 7,4) tokom 5-7 dana. Nakon završenog procesa fiksacije uzorci tkiva testisa su dehidrirani u rastućim koncentracijama alkohola, ksilenu i ukalupljeni u parafin. Parafinski isecci sečeni mikrotomom debljine 5 μ m, bojeni su primenom hematoksilina i eozina (HE metoda bojenja) i analizirani pomoću mikroskopa (Nikon ECLIPSE 50 Japan, DXM 1200C). Morfološka struktura bojenih isečaka je prikazana digitalnim Grafikma.

3.4.ODREĐIVANJE SADRŽAJA METALA U TESTISIMA

Koncentracije metala (Cd, Cu, Fe, Zn i Mg) su određene u rastvoru razorenog tkiva testisa metodom atomske apsorpcione spektrometrije (AAS) sa plamenom tehnikom (Analyst 200, PerkinElmer, Shelton, USA).

3.4.1. Reagensi i standardi

Nitratna (HNO_3 , 64 % p.a.) i perhlorna kiselina (HClO_4 , 70 % p.a.) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) su nabavljeni iz komercijalnih izvora, kao i osnovni standardni rastvori: Cd (c = 1000 ppm), Cu (c = 1000 ppm), Fe (c = 1000 ppm), Zn (c = 1000 ppm) i Mg (c = 1000 ppm) (AccuStandard New Haven). Od osnovnih standardnih rastvora metala do radnih standardnih rastvora za kalibraciju pravljena su razblaženja sa 2 % HNO_3 , prema smernicama proizvođača

atomskog apsorpcionog spektrometra (PerkinElmer Pure Atomic Spectroscopy Standard Guidelines, NIST traceable CRM, AccuStandard).

3.4.2. Priprema uzoraka

Tkivo testisa je isečeno i odmereno (~ 2 g tkiva) u erlenmajere, koji su prethodno oprani u destilovanoj vodi i 10 % HNO₃, a nakon 24h isprani sa redestilovanom vodom. Uzorcima tkiva je dodavana smeša koncentrovanih mineralnih kiselina za digestiju - HNO₃ i HClO₄ (4:1; v/v) (8 mL conc HNO₃ + 2 mL conc HClO₄), uparavano do suva na peščanom kupatilu, a potom kvantitativno prenošeno sa 0,1 M HNO₃ u normalne sudove od 10 ml. Nakon potpunog rastvaranja suvog ostatka, rasvor je prebačen u plastične epruvete.

3.4.3. Merenje koncentracije metala

U pripremljenim uzorcima koncentracija metala određena je metodom AAS. Donja granica kvantifikacije, koncentracija do koje je metoda pokazala linearnost i preciznost metode navedeni su za sve ispitivane metale, redom: Cd (0,02 ppm, 2 ppm, 0,08%), Cu (0,14 ppm, 20 ppm, 0,06%), Fe (0,13 ppm, 100 ppm, 0,08%), Zn (0,015 ppm, 1 ppm, 0,07%) i Mg (0,03 ppm, 0,5 ppm, 0,12%).

Talasne dužine korišćene za određivanje metala su: 228,8 nm za Cd, 216,51 nm za Cu, 305,91 nm za Fe, 213,86 nm za Zn i 285,21 nm za Mg. Koncentracija metala izražena je u µg/g tkiva za Cd, Cu, Fe, Zn i Mg.

3.5. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U HOMOGENATIMA TKIVA TESTISA

3.5.1. Hemikalije

Glutation, redukovani oblik (98-100 % čistoća) i oksidovani oblik (99 % čistoća), ortofosforna kiselina (OPA) i metafosforna kiselina (MPA) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemačka), natrijum perhlorat monohidrat (NaClO₄ • H₂O) (Acros Organics, New Jersey, SAD), etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), natrijum fosfat (Na₂HPO₄), kalijum dihidrogen fosfat (KH₂PO₄), trihlorsirćetna kiselina (TCA) i tiobarbiturna

kiselina (TBA) (Merck, Darmstadt, Nemačka), nitro plavo tetrazolijum hlorid (NBT) i Folin Ciocalteu's fenol reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) su komercijalnog porekla. Ransod komercijalni kitovi su korišćeni za određivanje aktivnosti SOD (RANDOX Laboratories, UK), dok su Sigma komercijalni kitovi korišćeni za određivanje GR (kataloški broj GRSA) i GST (kataloški broj CS0410) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Dejonizovana voda je svakodnevno pripremana u bolničkoj apoteci Vojnomedicinske akademije (VMA, Beograd, Srbija). Rastvor NaClO₄, koji je u sastavu mobilne faze za tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom (HPLC), je redovno filtriran neposredno pre analize kroz celulozne membranske filtere promera pora 0,45 mikroma (Agilent Technologies, Nemačka).

3.5.2. Priprema homogenata za merenje parametara oksidativnog stresa

3.5.2.3. Priprema homogenata za merenje superoksid anjon radikala, malondialdehida i aktivnosti enzima

Nakon nepotpunog odmrzavanja priprema tkiva testisa za analize vršena je homogenizacijom 0,1-0,4 g uzorka na ledu, u hladnom puferizovanom saharoznom mediju (1 ml) (0,25 mol/l saharoza, 0,1 mmol/l EDTA i Na/K fosfatni pufer, pH 7,2) u staklenoj epruveti za homogenizaciju sa teflonskim tučkom, na 800 obrtaja/min (Schüett-biotec, Göttingen, Germany). Nakon dva uzastopna centrifugiranja (Beckman J-21, rotor J-20) u trajanju od 15 min na 3500 obrtaja/min i +4 °C, supernatant je izdvojen i sonifikovan (MSE, P631555) radi liziranja membrana subcelularnih struktura i predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju (Gurd i sar., 1974). Sonifikacija je izvedena u tri ciklusa po 30 sekundi i sa 5 sekundi pauze između ciklusa, a talog odbacivan. Dobijeni supernatant je odmah analiziran ili čuvan u ependorf posudama na -80 °C do trenutka određivanja koncentracije proteina i odgovarajućih parametara OS i AOS. Svi uzorci su tokom pripreme i tokom određivanja neenzimskih i aktivnosti enzimskih parametara antioksidativne zaštite čuvani na +4 °C.

3.5.2.4. Priprema homogenata za određivanje glutaciona

Nakon nepotpunog odmrzavanja priprema tkiva testisa za određivanje GSH je vršena homogenizacijom 0,1-0,4 g uzorka na ledu u hladnom fiziološkom rastvoru (1 ml) u staklenoj epruveti za homogenizaciju sa teflonskim tučkom, na 800 obrtaja/min (Schüett-biotec,

Göttingen, Nemačka). Homogenatu tkiva testisa dodata je hladna MPA (5% w/v) (1 ml) za deproteinizaciju. Nakon centrifugiranja u plastičnim epruvetama 25 min na 8000 obrtaja/min i +4 °C, supernatant je izdvojen za hromatografsku analizu ili čuvan u ependorf posudama na -20 °C do momenta određivanja GSH. Na izdvojeni talog dodavan je rastvor 0,1 M NaOH i nakon 24 h spektrofotometrijski određena koncentracija proteina. Svi uzorci su tokom pripreme i tokom određivanja GSH čuvani na + 4 °C.

3.5.3. Određivanje koncentracije proteina u homogenatima tkiva testisa

Parametri OS, kao i AOS, izražavani su na mg proteina, tako da je u homogenatima tkiva testisa najpre određen sadržaj proteina. Proteini su određivani metodom po Lowry-ju, koja se zasniva na primeni kristalizovanog albumina goveđeg seruma kao standarda (5 % BSA) (Lowry i sar., 1951). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji peptidnih veza i jona Cu u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframskog reagensa sa aromatičnim amino kiselinama (tirozin u triptofan) u polipeptidnim lancima. U reakciji nastaje kompleksno jedinjenje plave boje, čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji proteina.

U epruvetu je odmeravano 10 µl uzorka i do 1 ml reakcione smeše: 2 ml 0,5 % CuSO₄ i do 100 mL Stock Lowry reagens (10 g Na₂CO₃, 10 mL 5 mol/L NaOH, 100 mg K-Na tartarata i H₂O do 500 mL), inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi i mešano na vorteksu.

Slepa proba (1 ml reakcione smeše) i standardi (10, 20, 30, 40, 50 mikroL BSA - *bovini serum albumin*, poznate koncentracija proteina 1 mg/mL, uz dodatak reakcione smeše do 1 mL) su takođe 10 minuta inkubirani na sobnoj temperaturi i vorteksirani. Zatim je u sve analize (uzorci, slepa proba, standardi) dodato po 100 mikroL Follin-reagens i ponovo je vršena inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi. Intenzitet plave boje meren je spektrofotometrijski na 575 nm.

Za kalibracionu krivu i regresionu jednačinu merena je absorbancija radnih standardnih rastvora. Koncentracija proteina u uzorku se za predstavljanje dobijenih rezultata izražava u mg/mL homogenata tkiva.

3.5.4. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Homogenati tkiva testisa pripremljeni u saharoznom medijumu korišćeni su za određivanje: MDA, $O_2^{\cdot-}$, ukupni SOD (tSOD), CAT, GR i GST, dok su se homogenati pripremljeni u fiziološkom rastvoru koristili za merenje GSH i GSSG, dole navedenim metodama.

3.5.4.5. Određivanje koncentracije malondialdehida

Određivanje MDA u homogenatima tkiva zasniva se na reakciji MDA sa TBA pri čemu nastaje obojeni kompleks jako žute boje čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski na 492-650 nm (Girotti i sar., 1991). Reakcionu smešu TBA reagensa čine 15 % trihlorsirćetna kiselina, 0,375 % tiobarbiturna kiselina i 0,25 mol/L hlorovodonične kiseline.

U epruvete je odmeravano 200 μ l razblaženog homogenata (50 μ l homogenata + 150 μ l prečišćene vode) i 400 μ l TBA reagensa, zatim zagrevano na 95 °C (pH 3,5) tokom 5 minuta u vodenom kupatilu. Nakon hlađenja izvršeno je centrifugiranje 1 minut na 3000 obrtaja/min, nakon čega je po 300 μ l supernatanta razliveno u ploču i merena je apsorbancija u odnosu na slepu probu. Vrednost apsorbancije čitana je na ELISA spektrofotometru pri mernoj talasnoj dužini od 492 nm i referentnoj talasnoj dužini od 650 nm.

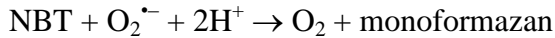
Za kalibracionu krivu i regresionu jednačinu, napravljen je radni standardni rastvor MDA koncentracije 1 mmol/l, a zatim serija mernih rastvora koncentracija 10, 50, 100, 150 i 200 μ mol/l. Koncentracija MDA se izračunava iz regresione jednačine: gde je y – razlika apsorbancija na datim talasnim dužinama, a x – koncentracija MDA (μ mol/50 μ l homogenata). Dobijeni rezultati za MDA se izražavaju prema sadržaju proteina u 50 μ l homogenata i vrednosti prevode u nmol MDA/mg proteina.

3.5.4.6. Određivanje koncentracije superoksid anjon radikala

Određivanje stvaranja $O_2^{\cdot-}$ u homogenatima tkiva zasniva se na redukciji nitro blu tetrazolijuma (NBT) do monoformazana dejstvom $O_2^{\cdot-}$, što se koristi kao mera stvaranja $O_2^{\cdot-}$ u hemijskim i biološkim sistemima (Auclair i Voisin, 1985).

Redukcija NBTa odvija se u dva koraka:

kao nepotpuna redukcija do monoformazana:



kao kompletna redukcija NBT-hlorida do diformazana:



U oksidovanoj formi NBT je žuta supstanca rastvorljiva u vodi, dok je njegova redukcija u diformazan praćena promenom u intenzivnu plavu boju i smanjenjem rastvorljivosti. U puferizovanom vodenom rastvoru bliskom neutralnom pH, molarni ekstinkcioni koeficijent pri talasnoj dužini od 550 nm iznosi za monoformazan $15\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a za diformazan $30\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. U vodenim rastvorima reakcije koje stvaraju $\text{O}_2^{\bullet-}$ dovode do nepotpune redukcije NBT do monoformazana.

$\text{O}_2^{\bullet-}$ - zavisna redukcija NBT odvija se do monoformazana. Reakcionu smešu čine 1 mmol NBT (rastvorenog u 0,05 mol fosfatnom puferu, pH 8,6 sa 0,1 mmol EDTA) i 0,1 mg/mL želatin, koji NBT-formazan održava u rastvoru. Rastvor NBT je jedan sat bio izložen dejstvu azota pod pritiskom, što je imalo za cilj da smanji napon O_2 u medijumu. Reakcija je otpočinjala dodavanjem 0,05 mL uzorka u 1 mL reakcione smeše, a promena ekstinkcije praćena je u toku 5 minuta na talasnoj dužini 550 nm. Stvaranje $\text{O}_2^{\bullet-}$ izražavano je kao nmol redukovanog NBT/min/mg proteina.

3.5.4.7. Određivanje aktivnosti ukupne superoksid dismutaze

Aktivnost ukupne SOD (tSOD) u homogenatima tkiva određivana je pomoću komercijalnog kita. Određivanje se zasniva na reakciji $\text{O}_2^{\bullet-}$, generisanih ksantinom i ksantin oksidazom, sa 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hloridom (I.N.T.). Intenzitet crvene boje formazana je meren na talasnoj dužini 505 nm.

Aktivnost SOD je predstavljena stepenom inhibicije. Dobijeni rezultati za aktivnost tSOD se izražavaju u jedinicama po miligramu proteina (U tSOD/mg proteina).

3.5.4.8. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost CAT određivana je spektrofotometrijskom metodom. Amonijum molibdat formira žuti kompleks sa H_2O_2 i pogodan je za merenje kako serumskih, tako i aktivnosti CAT u tkivu (Góth, 1991). Uzorak (0,1 mL) je najpre inkubiran 1 minut sa 0,5 mL $65\ \mu\text{M}$ H_2O_2 u Na-K

fosfatnom puferu, pH 7,2. Kontrolna reakcija je pripremljena sa 0,1 mL Na-K fosfatnog pufera, pH 7,2 i 0,5 mL 65 μM H_2O_2 . Reakcija je zaustavljena dodavanjem 0,5 mL 32,4 mmol amonijum molibdata u uzorke i kontrole. Absorbanca između žućkastog molibdata i H_2O_2 kompleksa u odnosu na slepu probu čitana je na 405 nm. Jedinica aktivnosti CAT definiše se kao broj μmolova H_2O_2 redukovanih u minuti ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}$). Aktivnost ovog enzima u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (U CAT/mg proteina).

3.5.4.9. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Aktivnost GR u homogenatima tkiva je određivana pomoću komercijalnog kita. Metoda se zasniva na redukciji GSSG u GSH dejstvom GR. Glutation reduktaza je potreban donor redukcionih ekvivalenata- NADPH za reakciju. Po završetku reakcije GSH uzrokuje redukciju 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojeve kiseline) (DTNB) u 5-tio (2-nitrobenzojevu kiselinu) (TNB). Porast absorbancije (odgovara formiranju TNB-a) je merena na talasnoj dužini 412 nm i ukazuje na aktivnost GR. Absorbancija je očitavana nakon 60 sekundi inkubacije reakcione smeše na svakih 10 sekundi kako bi se dobile vrednosti za 11 ciklusa.

Dobijeni rezultati za aktivnost GR se izražavaju u milijedinicama po miligramu proteina (mU GR/mg proteina). Jedna internacionalna jedinica (U) GR odgovara redukciji 1 μmola DTNB-a u TNB.

Dobijeni rezultati za aktivnost GPx se izražavaju u jedinicama po miligramu proteina (U GPx/mg proteina). Jedna internacionalna jedinica (U) GPx uzrokuje nastanak 1 μmola NADP^+ iz NADPH u minuti, pri definisanim uslovima.

3.5.4.10. Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze

Aktivnost GST u homogenatima tkiva je određivana pomoću komercijalnog kita. Metoda se zasniva na konjugaciji -SH grupe GSH sa 1-hloro-2-dinitrobenzenom (CDNB), što dovodi do porasta absorbancije na talasnoj dužini 340 nm, proporcionalnoj aktivnosti GST. Absorbancija se odmah očitava, svakih 60 sekundi da se dobije 6 ciklusa.

Dobijeni rezultati za aktivnost GST se izražavaju u milijedinicama po miligramu proteina (mU GST/mg proteina). Jedna internacionalna jedinica (U) GST uzrokuje nastanak 1 μmola GS-DNB konjugata u minuti, pri definisanim uslovima.

3.5.4.11. Određivanje koncentracije redukovanog i oksidovanog glutationa

Određivanje GSH i GSSG u homogenatima tkiva zasniva se na hromatografskoj metodi koja je prilagođena rutinskoj analizi većeg broja uzoraka (Begic i sar., 2017). Metoda omogućava istovremeno određivanje oba oblika glutationa, čime se izbegavaju greške koje nastaju kada se primenjuju formule koje služe za izračunavanje GSSG iz razlike izmerenog ukupnog glutationa i GSH.

Analize su izvedene na aparatu Shimadzu korporacijskog HPLC sistema, koji je opremljen sa pumpom (LC-30AD Nexera Liquid Chromatograph Pump system), pećnicom (CTO-30A Nexera Column Oven), detektorom (SPD-M20A Prominence Diode Array Detector), autosemplerom (SIL-30AC Nexera Autosampler) i degazerom (DGU-20A5 Prominence Degasser), koji su proizvedeni od strane Shimadzu USA Manufacturing INC (Canby, Oregon, USA). Za kontrolu instrumenta i analizu podataka korišćen je Labsolutions Main-system administrator i Nexera softver (2008-2010). Separacija je postignuta na analitičkoj koloni Zorbax eclipse AAA (4,6x150 mm; 3,5 μ m) (Agilent Technologies), pri optimiziranim hromatografskim uslovima (protok 1 ml/min, temperatura 40 °C, talasna dužina 215 nm). Kolona je svaki dan ispirana sa acetonitrilom i pre analize rekondicionirana sa mobilnom fazom. Izokratska separacija je izvedena sa mobilnom fazom koju čini 100 mM rastvor NaClO₄ (pH 2,8 podešen sa 0,1 % OPA). Za hromatografsku analizu je injektovano 50 μ l supernatanta pripremljenog prema proceduri iz 3.5.3.

Za kalibracionu krivu i regresionu jednačinu, od osnovnog standardnog rastvora (smesa GSH i GSSG) (1 mmol/l), napravljen je radni rastvor koncentracije 100 μ mol/l, a zatim serija radnih rastvora koncentracija 0,01, 1, 10, 100 i 200 μ mol/l. Standardi GSH i GSSG su rastvoreni u diluentu/mobilnoj fazi. Radni rastvori se pripremaju svaki dan i čuvaju na +4 °C. Pikovi GSH i GSSG iz radnih rastvora pokazuju izuzetnu ponovljivost retencionih vremena (t_r) i površine ispod krive (AUC) (GSH: t_r RSD = 0,83 %, AUC RSD = 0,33 %; GSSG: t_r RSD = 1,84 %, AUC RSD = 0,24 %). Identifikacija je potvrđena proverom UV spektra. Uzimajući u obzir prisustvo endogenog GSH i GSSG u homogenatima tkiva testisa, sniman je prvo hromatogram supernatanta iz pripremljenog homogenata tkiva testisa kako bi se utvrdila površina pika koja odražava endogene koncentracije GSH i GSSG tzv. biološki matriks uzorka. Zatim su u porcije istog supernatanta iz homogenata tkiva testisa dodani određeni volumeni osnovnog standardnog

rastvora GSH i GSSG, kako bi se dobile tačno poznate finalne koncentracije i snimljeni su hromatogrami. Za procenu prinosa metode (*recovery*), upoređena je površina pikova iz pojačanih (*spiked*) uzoraka sa površinama pikova iz čistih mernih standardnih rastvora.

Metoda određivanja je linearna u opsegu koncentracija potrebnih za određivanje uzoraka 0,01-200 $\mu\text{mol/l}$. Donja granica kvantifikacije (izračunata na bazi standardne devijacije odgovora i nagiba definisane kalibracione krive – $10 \times \text{STDEV}$ niske koncentracije/nagib kalibracione krive) iznosi 0,56 $\mu\text{mol/l}$ za GSH i 1,58 $\mu\text{mol/l}$ za GSSG. Preciznost metode (izražena kao koeficijent varijacije –CV) iznosi $< 2,56 \%$ za GSH i $< 1,17 \%$ za GSSG, te tačnost metode (izražena kao razlika između očekivane i izmerene koncentracije - % bias) iznosi $< 2 \%$ i za GSH i za GSSG. Prinos metode iznosi 99,19 % za GSH i 99,45 % za GSSG.

3.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA TESTOSTERONA

3.6.1. Priprema homogenata za određivanje testosterona

Homogenati tkiva (pripremljeni kao u proceduri 3.5.2.) su centrifugirani na 2500 obrtaja tokom 30 minuta, na temperaturi 4 °C. Dobijeni supernatanti se koriste za merenja sadržaja testosterona i proteina. Za određivanje testosterona supernatanti su dva puta ekstrahovani sa 2,5 ml dietiletra, a potom centrifugirani na 400 obrtaja tokom 15 minuta, na temperaturi 4 °C. Ekstrakti su potom upareni do suva u struji azota i rekonstituisani u 500 μl pufera koji se dobija uz komercijalni kit. Testosteron je kvantifikovan korišćenjem komercijalnog kita (Cobas E411, Roche, Germany).

3.6.2. Određivanje koncentracije testosterona

Za merenje sadržaja testosterona u plazmi i homogenatu testisa korišćen je komercijalni imunohemijski test Cobas E 411 (Roche, Nemačka). Sadržaj testosterona je izražen kao nanogrami testosterona po miligramu protein (ng/mg protein) (za homogenate) i nanomoli testosterona po mililitru plazme (nmol/ml) (za plazme).

3.7. STATISTIČKA ANALIZA

Jednofaktorska ANOVA i Tukey-Post hoc test je korišćen za statističku analizu podataka (softver GraphPad Prism, verzija 5.01). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD. Analiza korelacije ispitivanih parametara je izvedena Spirmanovim testom. Razlike su smatrane statistički značajnim za (*) $p < 0,05$ Razmatrani su i sledći nivoi značajnosti: (**) $p < 0.01$ i (***) $p < 0.001$.

4. REZULTATI

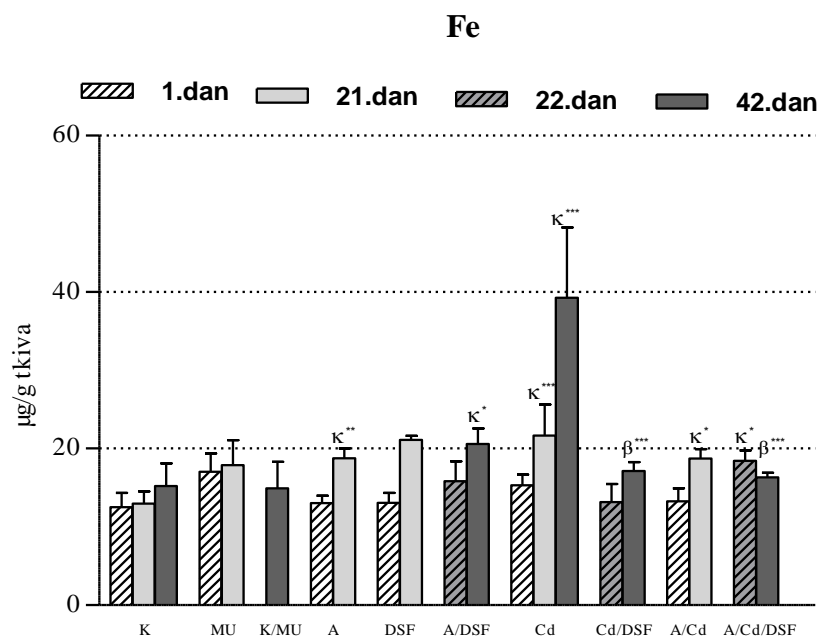
Zbirni prikazi efekata svih primenjenih tretmana na pojedinačne izmerene parametre (biolementi, OS i testosteron u plazmi i testisima) predstavljeni su grafički u vidu histograma (*Grafici 1-13, Tabela 1*) radi preglednosti, dok su efekti pojedinačnih tretmana na ispitivane parametre prikazani tabelarno (*Tabele 2-22*) radi detaljnije analize dobijenih rezultata. Dati prikazi se odnose na termine izloženosti do 21, odnosno 42 dana (u zavisnosti od primenjenih tretmana). Histopatološki preseki tkiva testisa tretiranih pacova u poređenju sa adekvatnom kontrolnom grupom su predstavljeni u okviru poglavlja *Rezultata* koji se odnosi na efekte pojedinačnih tretmana na ispitivane parametre (*Slike 1-7*).

U poglavlju *Prilozi* su dati detaljniji podaci (tabelarni i statistički) za sve primenjene tretmane i termine: 1, 3, 10, 21, 31 i 42 dana.

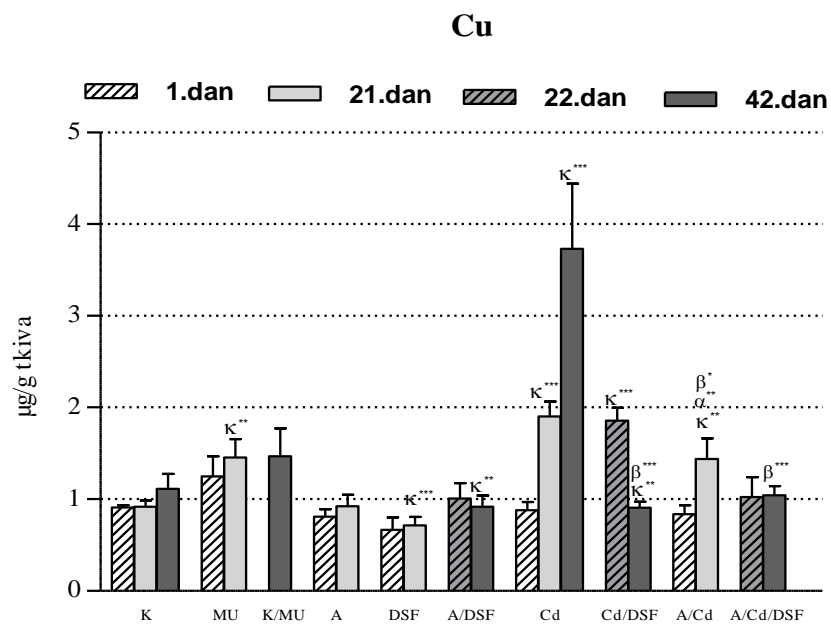
4.1. ZBIRNI PRIKAZI EFEKATA SVIH PRIMENJENIH TRETMANA NA POJEDINAČNE IZMERENE PARAMETRE U TESTISIMA PACOVA

4.1.1. Efekti primenjenih tretmana na status biolelemenata u testisima pacova

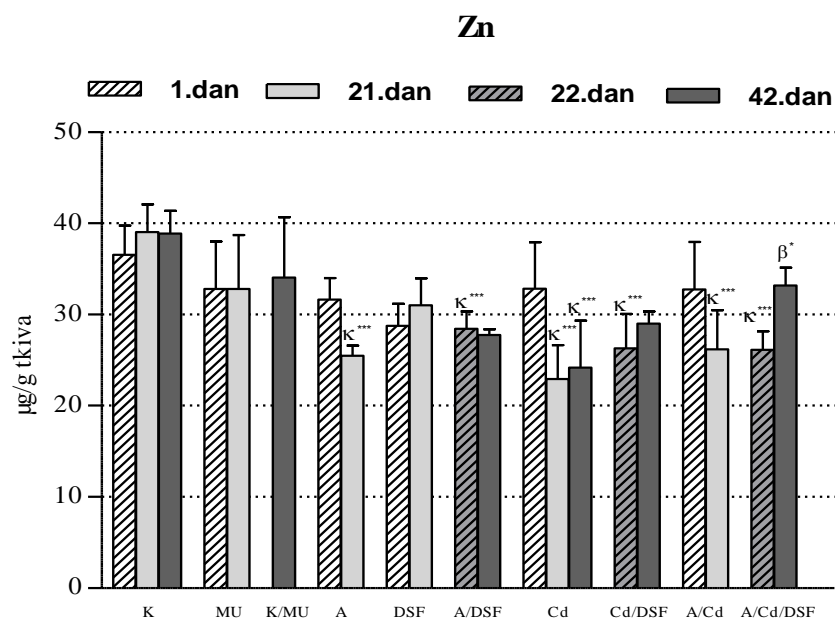
Efekti individualnih i kombinovanih tretmana etanolom, Cd i DSF na koncentraciju Fe, Cu, Zn i Mg u testisima izloženih pacova su grafički prikazani (*Grafici 1-4*). Koncentracije metala su izražene u $\mu\text{g/g}$ tkiva. Na prikazanim grafikonima, vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD za 6 uzoraka ($n = 6$). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (κ), A grupu (α), Cd grupu (β) i A_{21}/Cd_{21} grupu (γ) životinja. Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; oznake 1, 21, 22 i 42 se odnose na dužinu ekspozicije.



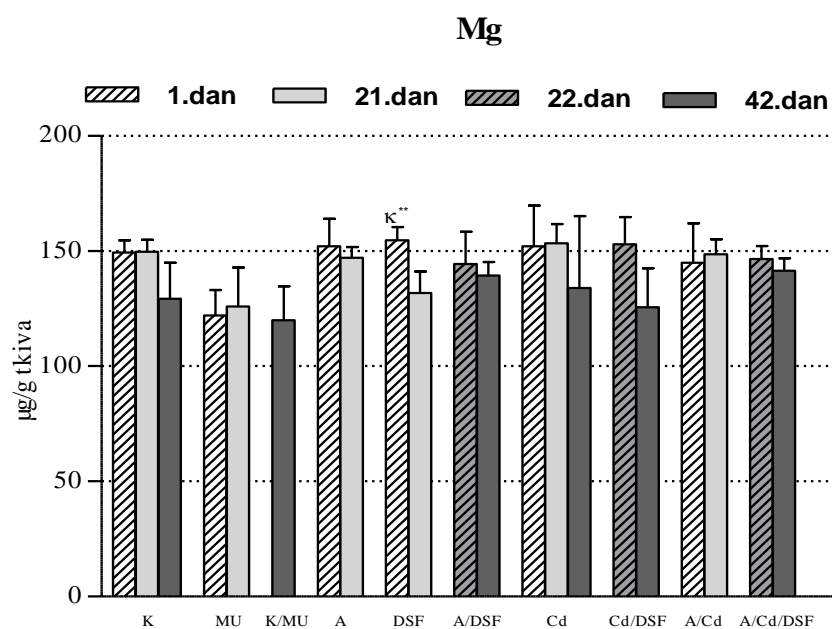
Grafik 1. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na koncentraciju gvožđa u testisima pacova.



Grafik 2. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na koncentraciju bakra u testisima pacova.



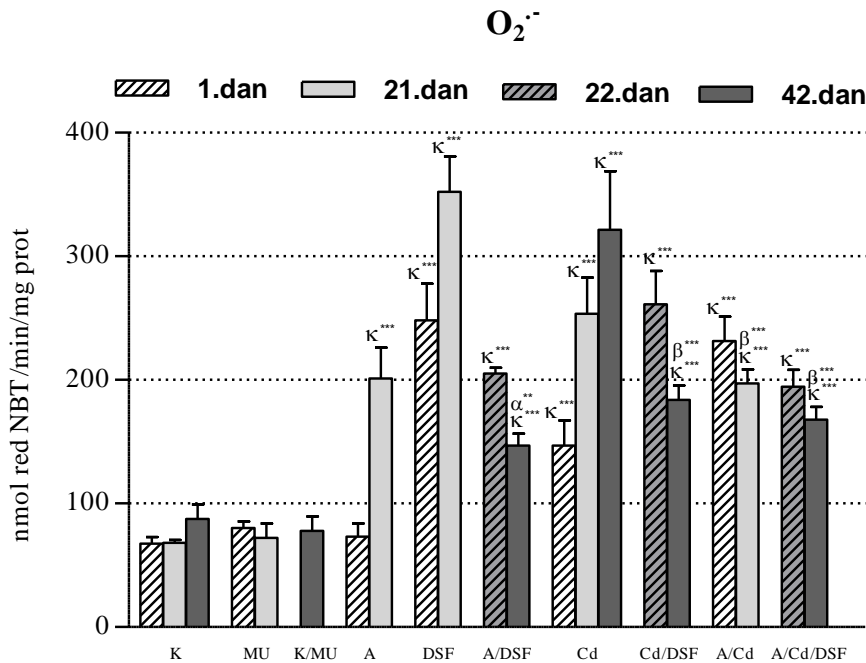
Grafik 3. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na koncentraciju cinka u testisima pacova.



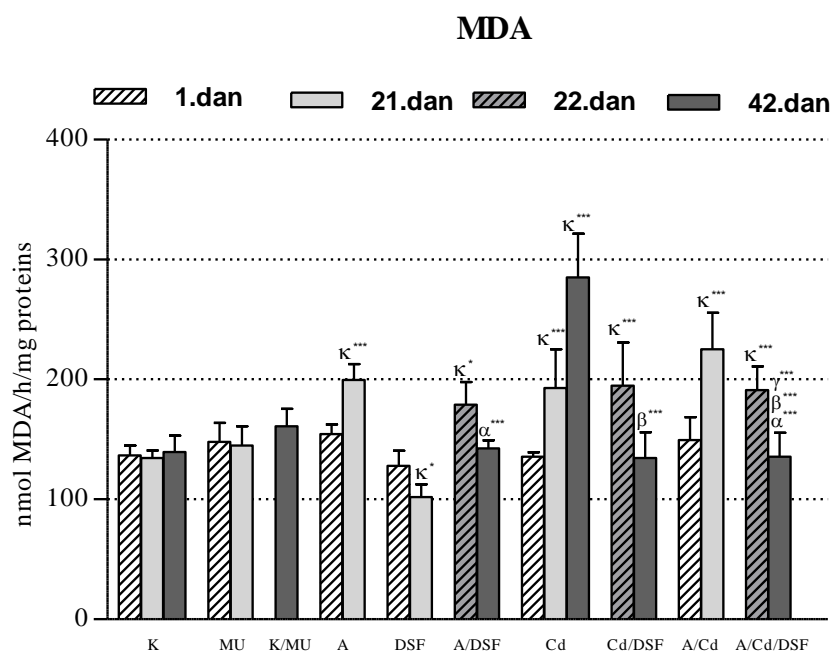
Grafik 4. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na koncentraciju mangana u testisima pacova.

4.1.2. Efekti primenjenih tretmana na status oksidativnog stresa u testisima pacova

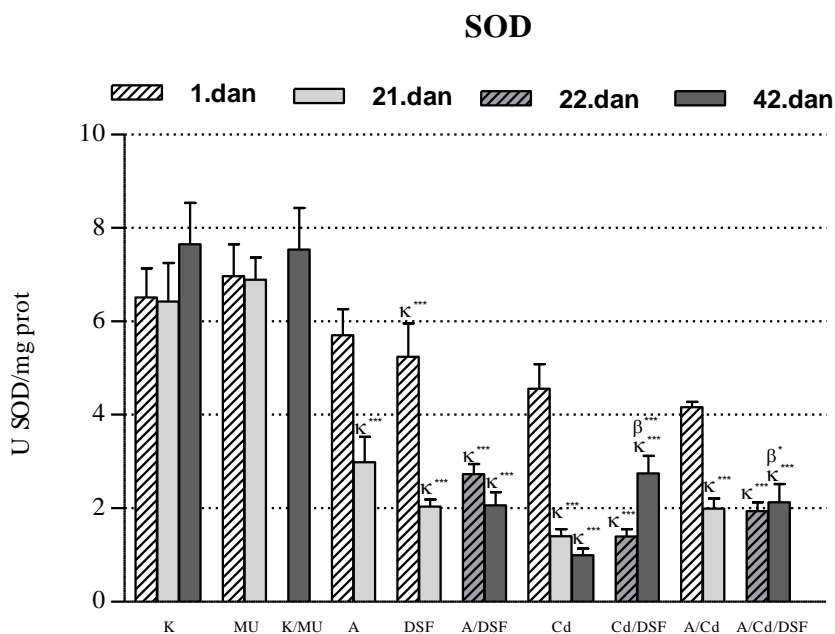
Efekat individualne i kombinovane izloženosti etanolu, Cd i DSF na status parametara OS u testisima izloženih pacova: $O_2^{\cdot-}$ (nmol red NBT/min/mg prot.), MDA (nmol MDA/mg prot), tSOD (U/mg prot.), CAT (U/mg prot.), GST (mU/mg prot.), GR (mU/mg prot.), GSH (nmol GSH/mg prot.), GSSG (nmol GSSG/mg prot.) i GSSG/GSH odnos (Grafici 5-13). Na prikazanim grafikonima, vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD za 6 uzoraka ($n = 6$). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (κ), A grupu (α), Cd grupu (β) i A₂₁/Cd₂₁ grupu (γ) životinja. Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; oznake 1, 21, 22 i 42 se odnose na dužinu ekspozicije.



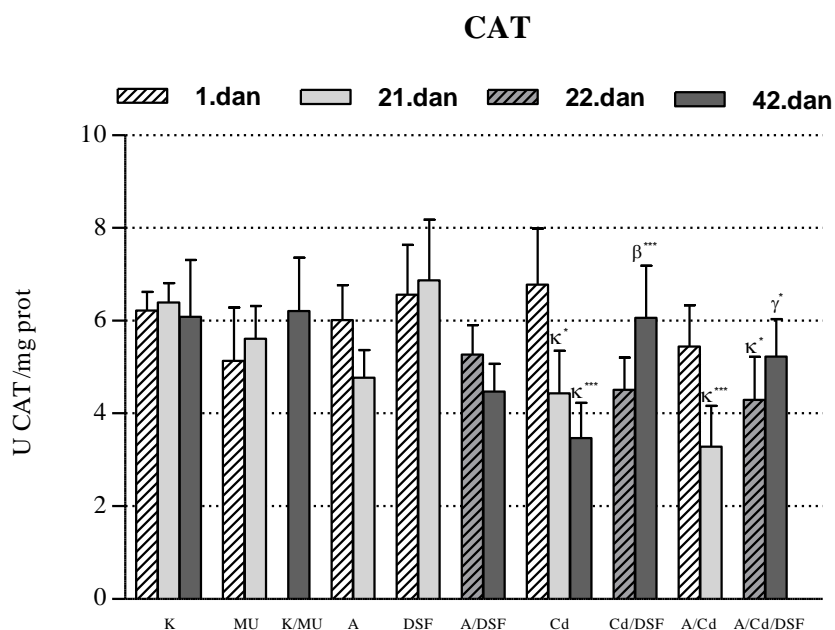
Grafik 5. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na stvaranje superoksidnog anjona u testisima pacova.



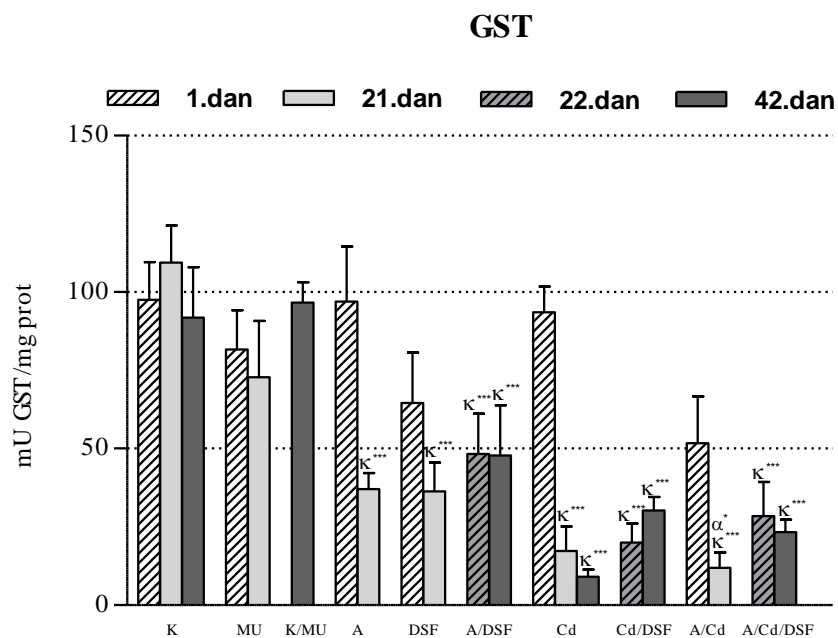
Grafik 6. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na koncentraciju malondialdehida u testisima pacova.



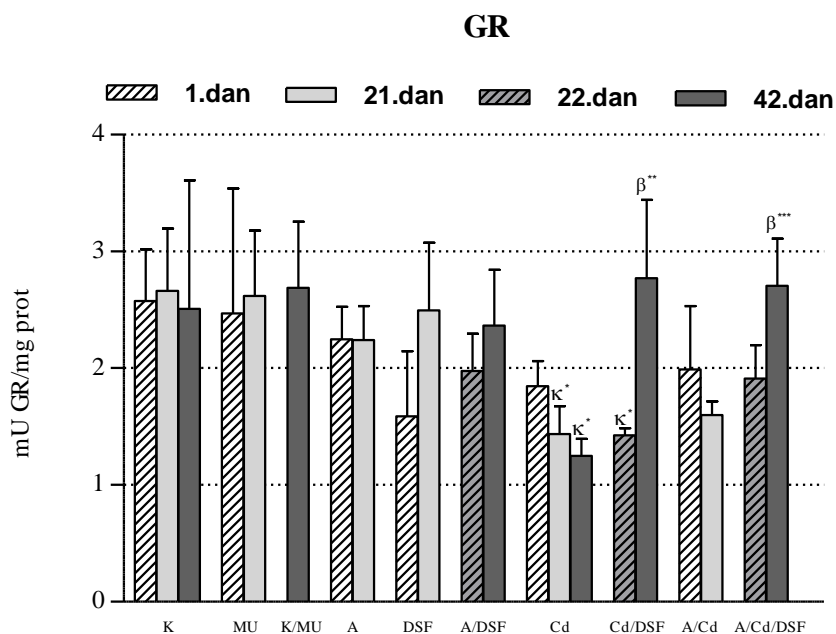
Grafik 7. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na aktivnost superoksid dizmutaze u testisima pacova.



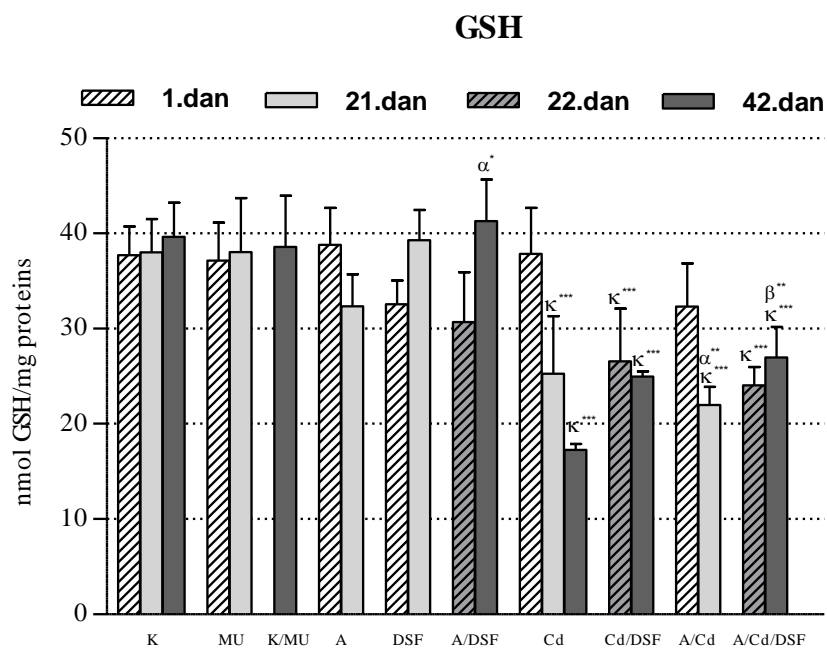
Grafik 8. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na aktivnost katalaze u testisima pacova.



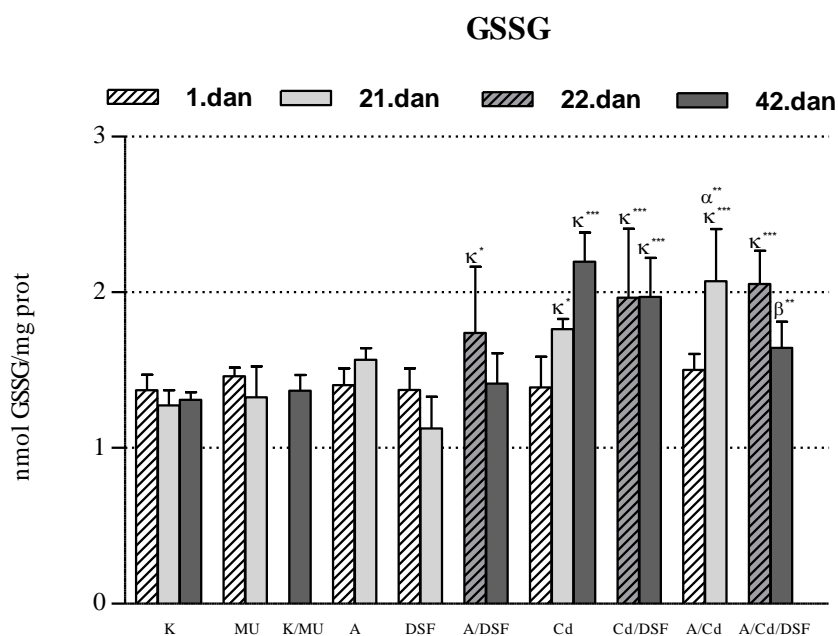
Grafik 9. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na aktivnost glutation S transferaze u testisima pacova.



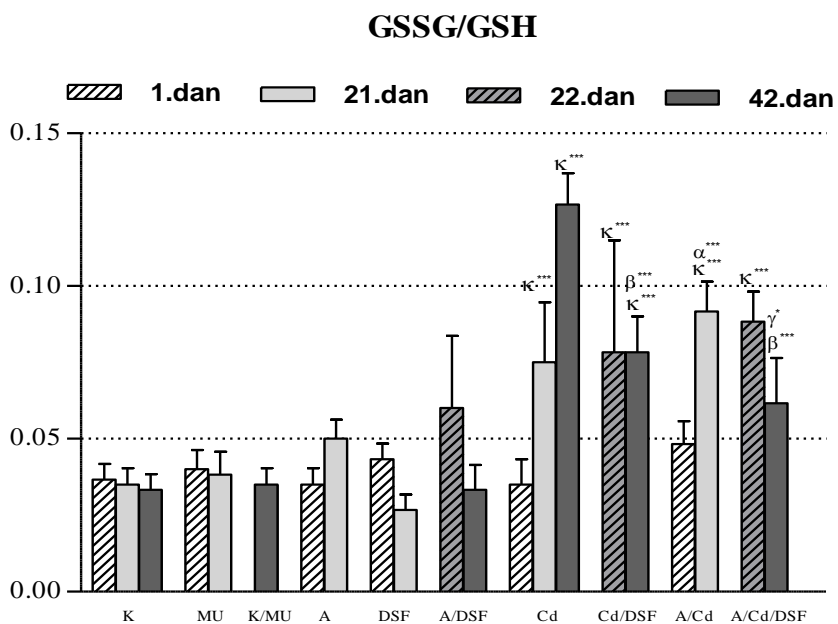
Grafik 10. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na aktivnost glutation reduktaze u testisima pacova.



Grafik 11. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na koncentraciju redukovanog glutationa u testisima pacova.



Grafik 12. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na koncentraciju oksidovanog glutationa u testisima pacova.



Grafik 13. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na odnos oksidovani/redukovani glutation (GSSG/GSH) u testisima pacova.

4.1.3. Efekti primenjenih tretmana na status testosterona u plazmi i testisima pacova

Efekat individualne i kombinovane izloženosti etanolu, Cd i DSF na koncentraciju testosterona u plazmi i testisima izloženih pacova (*Tabela 1*)

Tabela 1. Efekat individualne i kombinovane izloženosti alkoholu (A), kadmijumu (Cd) i disulfiramu (DSF) na koncentracije testosterona u plazmi i testisima pacova.

Tretman	Parametri	
	Testosteron u plazmi (nmol/ml)	Testosteron u testisima (pmol/mg proteina)
K ₁₀	7,72 ± 1,624	2,33 ± 0,648
K ₂₁	18,22 ± 2,553	5,10 ± 0,628
K ₄₂	20,00 ± 2,217	5,91 ± 1,014
MU ₁₀	9,04 ± 1,836	2,59 ± 0,507
MU ₂₁	17,46 ± 1,310	5,51 ± 0,879
KMU ₄₂	21,36 ± 2,164	5,65 ± 1,089
A ₁₀	10,59 ± 1,968	3,11 ± 0,404
A ₂₁	11,43 ± 2,476, κ***	3,63 ± 0,371, κ***
DSF ₁₀	16,76 ± 2,549	3,79 ± 0,990
DSF ₂₁	16,86 ± 2,590	4,85 ± 0,067
A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₃₁	7,29 ± 2,159, κ***, α***	3,70 ± 0,514, κ***
A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₄₂	11,04 ± 1,019, κ***, α***	3,91 ± 0,223, κ***
Cd ₁₀	9,16 ± 2,125	2,74 ± 0,262
Cd ₂₁	9,66 ± 1,265, κ***	1,73 ± 0,439, κ***
Cd ₄₂	5,62 ± 0,971, κ***	0,98 ± 0,255, κ***
Cd ₁₋₃₁ /DSF ₂₂₋₃₁	9,00 ± 0,655, κ***	1,21 ± 0,313, κ***
Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	8,68 ± 0,772, κ***	0,52 ± 0,098, κ***
A ₁₀ /Cd ₁₀	7,60 ± 1,741	1,67 ± 0,286
A ₂₁ /Cd ₂₁	7,52 ± 0,826, κ***, α*	1,45 ± 0,418, κ***, α***
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₃₁ /DSF ₂₂₋₃₁	6,72 ± 1,151, κ***	1,24 ± 0,271, κ***, α***
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	7,60 ± 0,777, κ***, α*	0,59 ± 0,039, κ***, α***

Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD za 6 uzoraka (n = 6). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (κ), A grupu (α), Cd grupu (β) i A₂₁/Cd₂₁ grupu (γ) životinja. Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: *p<0.05, ***p<0.001; oznake 1, 21, 22 i 42 se odnose na dužinu ekspozicije.

4.2. PRIKAZI UTICAJA INDIVIDUALNE IZLOŽENOSTI ALKOHOLU, KADMIJUMU I DISULFIRAMU NA ISPITIVANE PARAMETRE U TESTISIMA PACOVA

4.2.1. Izloženost alkoholu

4.2.1.1. Efekat subakutne izloženosti alkoholu na koncentraciju bioelemenata u testisima pacova

Tabela 2. Efekat alkohola na status bioelemenata u testisima pacova

Tretman: A ₁₋₂₁	Fe	Cu	Zn	Mg
1 dan	13,01 ± 0,941	0,81 ± 0,077	31,65 ± 2,389	152,01 ± 12,012
<i>Kontrola 1. dan</i>	<i>12,21 ± 1,853</i>	<i>0,91 ± 0,027</i>	<i>36,56 ± 3,197</i>	<i>149,47 ± 5,302</i>
21 dan	18,79 ± 1,259 κ**	0,92 ± 0,125	25,49 ± 1,101 κ***	147,10 ± 4,610
<i>Kontrola 21. dan</i>	<i>12,95 ± 1,575</i>	<i>0,92 ± 0,067</i>	<i>39,41 ± 3,077</i>	<i>149,75 ± 5,234</i>

Tretman: A₁₋₂₁: izloženost pacova etanolu (*per os*; 3ml 20% etanol/21 dan). Jedinice u kojima je izražena koncentracija bioelemenata u testisima: Fe (μg Fe/g tkiva), Cu (μg Cu/g tkiva), Zn (μg Zn/g tkiva) i Mg (μg Mg/g tkiva). Statistička značajnost: *-p<0,05, ** -p<0,01, *** - p<0,001. Simbol za adekvatnu poredbenu grupu (Kontrola: 21 dan - κ).

Rezultati studije pokazuju povećanje koncentracije Fe (45%) u terminu 21 dan nakon davanja etanola u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (*Grafik 1, Tabela 2,*). Međutim, u istom terminu je za 35% smanjena koncentracija Zn nakon aplikacije etanola u odnosu na odgovarajuću kontrolu (*Grafik 3, Tabela 2*).

4.2.1.2. Efekat subakutne izloženosti alkoholu na oksidativni stres u testisima pacova

Tabela 3. Efekat alkohola na status oksidativnog stresa u testisima pacova

Tretman: A ₁₋₂₁	O ₂ ⁻	tSOD	CAT	MDA	GST	GR	GSH	GSSG	GSSG/GSH
1 dan	73,04 ± 10,922	5,7 ± 0,559	6,01 ± 0,760	154,64 ± 7,733	96,90 ± 17,656	2,25 ± 0,276	38,81 ± 3,893	1,40 ± 0,106	0,04 ± 0,004
<i>Kontrola 1. dan</i>	<i>67,36 ± 5,355</i>	<i>6,51 ± 0,622</i>	<i>6,22 ± 0,407</i>	<i>136,48 ± 8,341</i>	<i>97,60 ± 11,899</i>	<i>2,58 ± 0,442</i>	<i>37,71 ± 3,011</i>	<i>1,37 ± 0,095</i>	<i>0,04 ± 0,002</i>
21 dan	201,13 ± 25,193 κ***	2,99 ± 0,543 κ***	4,77 ± 0,597	199,63 ± 13,249 κ***	37,05 ± 5,173 κ***	2,24 ± 0,290	32,37 ± 3,352	1,57 ± 0,073	0,05 ± 0,006
<i>Kontrola 21. dan</i>	<i>68,22 ± 2,283</i>	<i>6,43 ± 0,823</i>	<i>6,40 ± 0,411</i>	<i>134,60 ± 6,374</i>	<i>109,46 ± 11,869</i>	<i>2,55 ± 0,340</i>	<i>38,02 ± 3,598</i>	<i>1,27 ± 0,096</i>	<i>0,03 ± 0,005</i>

Tretman: A₁₋₂₁: izloženost pacova etanolu (*per os*; 3ml 20% etanola/21 dan). Jedinice u kojima je izražena koncentracija parametara oksidativnog stresa: O₂⁻ (nmol red NBT/min/mg proteina), tSOD (U tSOD/mg proteina), CAT (U CAT/mg proteina), MDA (nmol MDA/mg proteina), GST (mU GST/mg proteina), GR (mU GR/mg proteina), GSH (nmol GSH/mg proteina), GSSG (nmol GSSG/mg proteina), GSSG/GSH. Statistička značajnost: *-p<0,05, ** -p<0,01, *** - p<0,001. Simbol za adekvatnu poredbenu grupu (Kontrola: 21 dan - κ).

Rezultati studije pokazuju povećanje sadržaja $O_2^{\cdot-}$ (195%) i MDA (48%) u terminu 21 dan nakon davanja A u odnosu na kontrolnu grupu (*Grafici 5, 6, Tabela 3*). Međutim, u istom terminu registrovano je smanjenje aktivnosti SOD (53,5%) i GST (66%) nakon aplikacije A u odnosu na odgovarajuću kontrolu (*Grafici 7, 9, Tabela 3*).

4.2.1.3. Efekat subakutne izloženosti alkoholu na sadržaj testosterona u plazmi i testisima pacova

Rezultati studije pokazuju da primena A u trajanju od 21 dana dovodi do smanjenja koncentracije testosterona u plazmi za 37%, a u testisima za 29% u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu životinja (*Tabele 1, 4*).

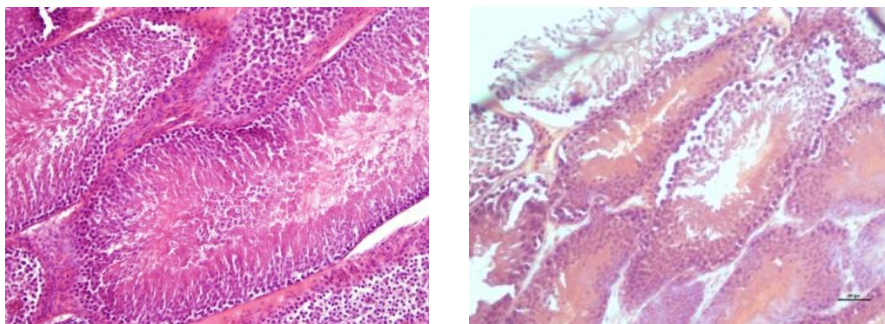
Tabela 4. Efekat alkohola na koncentraciju testosterona u plazmi/testisima pacova

Tretman	Parametri	
	Testosteron u plazmi (nmol/ml)	Testosteron u testisima (pmol/mg proteina)
K ₁₀	7,72 ± 1,624	2,33 ± 0,648
K ₂₁	18,22 ± 2,553	5,10 ± 0,628
A ₁₀	10,59 ± 1,968	3,11 ± 0,404
A ₂₁	11,43 ± 2,476, κ***	3,63 ± 0,371, κ***

Tretman A₁₋₂₁: izloženost pacova etanolu (per os; 3 ml 20% etanola/dan tokom 21 dana). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD za 6 uzoraka (n = 6). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (κ). Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: ***p<0.001; oznake 10 i 21 se odnose na dužinu ekspozicije.

4.2.1.4. Efekat subakutne izloženosti alkoholu na morfološke promene u testisima – histopatološka analiza testisa pacova

Tkivo testisa potpuno je izgubilo svoj morfološki integritet. Na mikrofotografiji se vidi nekoliko okruglih ili ovoidnih praznih prostora dok neke ispunjava homogeni eozinofilni sadržaj, potpuno acelularan. Sve je ovo uklopljeno u amorfnu blede-eozinofilnu supstancu, tako da se ne može prepoznati mikrostruktura testisa (*Slika 1*).



A. K₂₁ grupa

B. A₂₁ grupa

Slika 1. Presek tkiva testisa pacova subakutno tretiranih etanolom.

A. K₂₁ kontrolna grupa – normalna mikroarhitektura tkiva; B. A₂₁ grupa (*per os* 3 ml 20% etanol/dan tokom 21 dana) – narušena normalna struktura tkiva-acelularni prostori u semenim kanalićima.

4.2.2. Izloženost kadmijumu

4.2.2.5. Efekat subhronične izloženosti kadmijumu na koncentraciju bioelemenata u testisima pacova

Tabela 5. Efekat kadmijuma na status bioelemenata u testisima pacova

Tretman: Cd ₁₋₄₂	Fe	Cu	Zn	Mg
1 dan	15,33 ± 1,342	0,88 ± 0,087	32,85 ± 5,097	152,10 ± 17,672
<i>Kontrola 1. dan</i>	12,21 ± 1,853	0,91 ± 0,027	36,56 ± 3,197	149,47 ± 5,302
21 dan	21,67 ± 3,970 κ ^{***}	1,90 ± 0,162 κ ^{***}	22,93 ± 3,715, κ ^{***}	153,41 ± 8,313
<i>Kontrola 21. dan</i>	12,95 ± 1,575	0,92 ± 0,067	39,41 ± 3,077	149,75 ± 5,234
42 dana	39,29 ± 9,004 κ ^{***}	3,73 ± 0,710 κ ^{***}	24,20 ± 5,167, κ ^{***}	133,86 ± 31,398
<i>Kontrola 42. dan</i>	15,91 ± 2,637	0,91 ± 0,027	38,89 ± 2,520	129,25 ± 15,646

Tretman: Cd₁₋₄₂: izloženost pacova Cd (*i.p.*, 1 mg CdCl₂/kg/dan, tokom 42 dana). Jedinice u kojima je izražena koncentracija bioelemenata u testisima: Fe (μg Fe/g tkiva), Cu (μg Cu/g tkiva), Zn (μg Zn/g tkiva) i Mg (μg Mg/g tkiva). Statistička značajnost: *-p<0,05, ** -p<0,01, *** - p<0,001. Simbol za adekvatnu poredbenu grupu (Kontrole: 21 i 42 dana - κ).

Rezultati pokazuju povećanje koncentracije Fe (18%) i Cu (106,5%) i smanjenje koncentracije Zn (41%) u terminu 21 dan nakon davanja Cd u odnosu na kontrolne vrednosti. U terminu 42 dana od aplikacije Cd, registrovano je višestruko povećanje koncentracije Fe (158%) i Cu (233%), odnosno smanjenje koncentracije Zn (38%) u odnosu na odgovarajuću kontrolu (*Grafici 1-3, Tabela 5*).

4.2.2.6. Efekat subhronične izloženosti kadmijumu na oksidativni stres u testisima pacova

Tabela 6. Efekat kadmijuma na status oksidativnog stresa u testisima pacova

Tretman: Cd ₁₋₄₂	O ₂ ⁻	tSOD	CAT	MDA	GST	GR	GSH	GSSG	GSSG/GSH
1 dan	146,78 ± 20,330 κ ^{***}	4,56 ± 0,526 κ ^{***}	6,78 ± 1,210	135,35 ± 3,952	93,55 ± 8,217	1,84 ± 0,217	37,86 ± 4,850	1,39 ± 0,198	0,04 ± 0,007
Kontrola 1. dan	67,36 ± 5,355	6,51 ± 0,622	6,22 ± 0,407	136,48 ± 8,341	97,60 ± 11,899	2,58 ± 0,442	37,71 ± 3,011	1,37 ± 0,095	0,04 ± 0,002
21 dan	253,38 ± 29,539 κ ^{***}	1,4 ± 0,149 κ ^{***}	4,44 ± 0,917 κ ^{***}	192,99 ± 32,080 κ ^{***}	17,33 ± 7,701 κ ^{***}	1,43 ± 0,241 κ [*]	25,26 ± 6,054 κ ^{***}	1,76 ± 0,066 κ [*]	0,07 ± 0,020 κ ^{***}
Kontrola 21. dan	68,22 ± 2,283	6,43 ± 0,823	6,40 ± 0,411	134,60 ± 6,374	109,46 ± 11,869	2,55 ± 0,340	38,02 ± 3,598	1,27 ± 0,096	0,03 ± 0,005
42 dan	321,37 ± 47,592 κ ^{***}	1,0 ± 0,139 κ ^{***}	3,47 ± 0,759 κ ^{***}	285,28 ± 36,213 κ ^{***}	9,02 ± 2,315 κ ^{***}	1,25 ± 0,146 κ [*]	17,26 ± 0,638 κ ^{***}	2,20 ± 0,192 κ ^{***}	0,13 ± 0,010 κ ^{***}
Kontrola 42. dan	87,58 ± 11,720	8,43 ± 0,663	6,09 ± 1,221	142,51 ± 17,749	91,79 ± 16,172	2,51 ± 1,099	39,65 ± 3,696	1,31 ± 0,048	0,03 ± 0,003

Tretman: Cd₁₋₄₂: izloženost pacova Cd (*i.p.*, 1 mg CdCl₂/kg/dan, tokom 42 dana). Jedinice u kojima je izražena koncentracija parametara oksidativnog stresa: O₂⁻ (nmol red NBT/min/mg proteina), tSOD (U tSOD/mg proteina), CAT (U CAT/mg proteina), MDA (nmol MDA/mg proteina), GST (mU GST/mg proteina), GR (mU GR/mg proteina), GSH (nmol GSH/mg proteina), GSSG (nmol GSSG/mg proteina), GSSG/GSH. Statistička značajnost: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001. Simbol za adekvatnu poredbenu grupu (Kontrola: 21 i 42 dana - κ).

U terminima 21, odnosno 42 dana (21 / 42) od davanja Cd u studiji su registrovana povećanja koncentracija O₂⁻ (271% / 267%), MDA (43% / 104%) i GSSG (137,5% / 68%), kao i povećanje odnosa GSSG/GSH (114% / 285%) u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe životinja (*Grafici 5, 6, 12, 13, Tabela 6*). Međutim, u terminima 21 i 42 dana (21 / 42) od aplikacije Cd izmereno je smanjenje aktivnosti SOD (78% / 87%), CAT (31% / 43%), GST (84% / 90%) i GR (46% / 50%), kao i koncentracije GSH (34% / 56%) u odnosu na kontrolne vrednosti (*Grafici 7-11, Tabela 6*).

4.2.2.7. Efekat subhronične izloženosti kadmijumu na sadržaj testosterona u plazmi i testisima pacova

Rezultati su pokazali da primena Cd u trajanju od 21 i 42 dana dovodi do smanjenja koncentracije testosterona u plazmi za 47% i 72%, redom, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu životinja, dok su koncentracije testosterona u homogenatima testisa nakon 21 i 42 dana izloženosti Cd manje za 66% i 83%, redom, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (*Tabele 1,7*).

Tabela 7. Efekat kadmijuma na koncentraciju testosterona u plazmi/testisima pacova

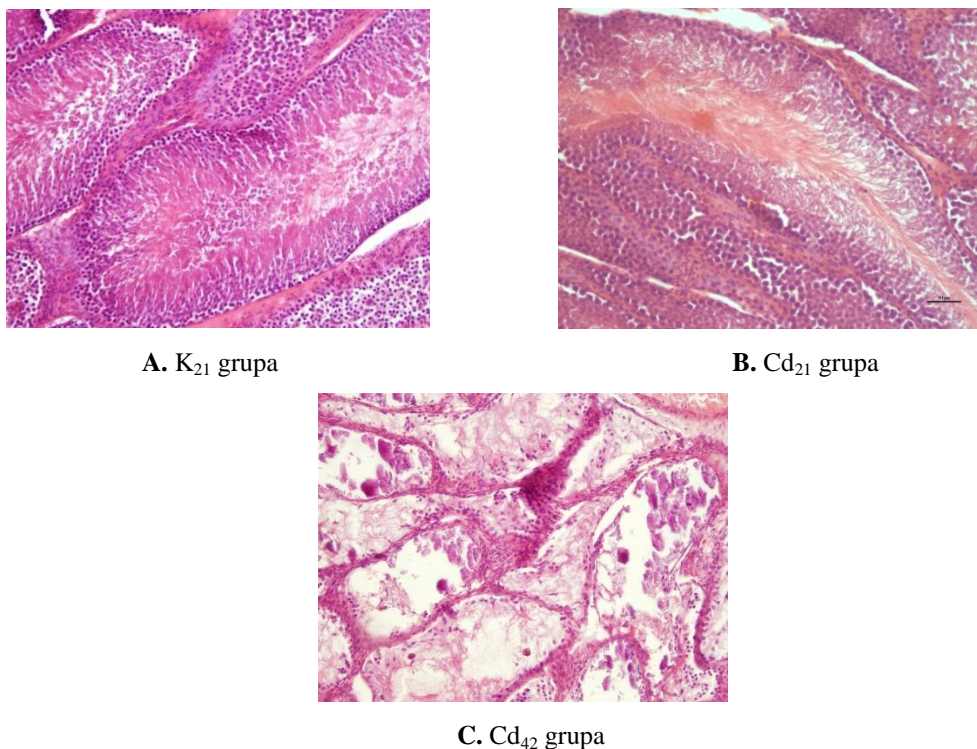
Tretman	Parametri	
	Testosteron u plazmi (nmol/ml)	Testosteron u testisima (pmol/mg proteina)
K ₁₀	7,72 ± 1,624	2,33 ± 0,648
K ₂₁	18,22 ± 2,553	5,10 ± 0,628
K ₄₂	20,00 ± 2,217	5,91 ± 1,014
Cd ₁₀	9,16 ± 2,125	2,74 ± 0,262
Cd ₂₁	9,66 ± 1,265, κ***	1,73 ± 0,439, κ***
Cd ₄₂	5,62 ± 0,971, κ***	0,98 ± 0,255, κ***

Tretman Cd₁₋₄₂: izloženost pacova kadmijumu (intraperitonealno; 1 mg CdCl₂/kg/dan tokom 21/42 dana). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD za 6 uzoraka (n = 6). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (κ). Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: ***p<0.001; oznake 10, 21, i 42 se odnose na dužinu ekspozicije.

Rezultati su pokazali da primena Cd u trajanju od 21 i 42 dana dovodi do smanjenja koncentracije testosterona u plazmi za 47% i 72%, redom, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu životinja, dok su koncentracije testosterona u homogenatima testisa nakon 21 i 42 dana izloženosti Cd manje za 66% i 83%, redom, u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (*Tabela 1, 7*).

4.2.2.8. Efekat subhronične izloženosti kadmijumu na morfološke promene u testisima – histopatološka analiza testisa pacova

Na mikrografiji tkiva testisa nakon subakutnog i subhroničnog davanja Cd vidljive su drastične promene u poređenju sa kontrolnom grupom. Prilikom subakutnog tretmana Cd bazalna membrana semenih kanalića je dobro definisana. Uz samu membranu raspoznaju se spermatogonije i Sertolijeve ćelije. Ostali celularni elementi su skoro potpuno izbrisani. Adluminalno je prisutan bleđi eozinofilni sadržaj (*Slika 2 B*). Nakon subhroničnog davanja Cd vidljive su degenerativne promene semenih kanalića, intersticijalni prostor je proširen sa difuznim degenerativnim promenama (*Slika 2 C*). Na oba preseka Cd grupa zapaža se odsustvo spermatogeneze.



Slika 2. Presek tkiva testisa pacova subakutno/subhronično tretiranih kadmijumom.

A. K₂₁ kontrolna grupa – normalna mikroarhitektura tkiva; **B.** Cd₂₁ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan tokom 21 dana)-acelularno tkivo testisa; **C.** Cd₄₂ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan tokom 42 dana) – potpuno narušen integritet semenih kanalića.

4.2.3. Izloženost disulfiramu

4.2.3.9. Efekat subakutne izloženosti disulfiramu na koncentraciju bioelemenata u testisima pacova

Tabela 8. Efekat disulfirama na status bioelemenata u testisima pacova

Tretman: DSF ₁₋₂₁	Fe	Cu	Zn	Mg
1 dan	13,08 ± 1,230	0,66 ± 0,136 κ [±]	28,76 ± 2,406	154,70 ± 5,671
<i>Kontrola 1. dan</i>	<i>12,21 ± 1,853</i>	<i>0,91 ± 0,027</i>	<i>36,56 ± 3,197</i>	<i>149,47 ± 5,302</i>
<i>Kontrola-maslinovo ulje 1. dan</i>	<i>17,03 ± 2,318</i>	<i>1,25 ± 0,221</i>	<i>32,82 ± 5,207</i>	<i>122,16 ± 10,946</i>
21 dan	21,12 ± 0,509 κ ^{***}	0,71 ± 0,089 κ ^{***}	31,01 ± 2,989	131,83 ± 9,316
<i>Kontrola 21. dan</i>	<i>12,95 ± 1,575</i>	<i>0,92 ± 0,067</i>	<i>39,41 ± 3,077</i>	<i>149,75 ± 5,234</i>
<i>Kontrola-maslinovo ulje 21. dan</i>	<i>12,95 ± 1,575</i>	<i>1,46 ± 0,199</i>	<i>32,81 ± 5,937</i>	<i>125,85 ± 17,053</i>

Tretman: DSF₁₋₄₂: izloženost pacova DSF (*per os*, 178,5 mg/kg/dan, tokom 21 dana). Jedinice u kojima je izražena koncentracija bioelemenata u testisima: Fe (μg Fe/g tkiva), Cu (μg Cu/g tkiva), Zn (μg Zn/g tkiva) i Mg (μg Mg/g tkiva). Statistička značajnost: * - p < 0,05, *** - p < 0,001. Simbol za adekvatnu poredbenu grupu (Kontrola- maslinovo ulje: 21 dana - κ).

Rezultati istraživanja prikazuju povećanje koncentracije Fe za 63% i smanjenje koncentracije Cu za 51% nakon 21 dana davanja DSF životinjama u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (*Grafici 1, 2, Tabela 8*).

4.2.3.10. *Efekat subakutne izloženosti disulfiramu na oksidativni stres u testisima pacova*

Tabela 9. Efekat disulfirama na status oksidativnog stresa u testisima pacova

Tretman: DSF ₁₋₂₁	O ₂ ⁻	tSOD	CAT	MDA	GST	GR	GSH	GSSG	GSSG/GSH
1 dan	248,23 ± 29,506 κ***	5,24 ± 0,716 κ***	6,56 ± 1,072	127,75 ± 12,611	64,57 ± 16,146 κ***	1,59 ± 0,559	32,56 ± 2,514	1,38 ± 0,138	0,04 ± 0,004
<i>Kontrola 1. dan</i>	67,36 ± 5,355	6,51 ± 0,622	6,22 ± 0,407	136,48 ± 8,341	97,60 ± 11,899	2,58 ± 0,442	37,71 ± 3,011	1,37 ± 0,095	0,04 ± 0,002
<i>Kontrola-maslinovo ulje 1. dan</i>	80,01 ± 5,443	6,97 ± 0,684	5,14 ± 1,145	147,91 ± 15,989	81,69 ± 12,449	2,47 ± 1,071	37,14 ± 4,006	1,46 ± 0,054	0,04 ± 0,005
21 dan	352,01 ± 28,841 κ***	2,04 ± 0,151 κ***	6,87 ± 1,311	101,96 ± 10,686 κ*	36,34 ± 9,267 κ***	2,49 ± 0,582	39,31 ± 3,187	1,13 ± 0,205	0,03 ± 0,004
<i>Kontrola 21. dan</i>	68,22 ± 2,283	6,43 ± 0,823	6,40 ± 0,411	134,60 ± 6,374	109,46 ± 11,869	2,55 ± 0,340	38,02 ± 3,598	1,27 ± 0,096	0,03 ± 0,005
<i>Kontrola-maslinovo ulje 21. dan</i>	72,27 ± 11,688	6,90 ± 0,471	5,61 ± 0,709	144,75 ± 16,125	72,85 ± 17,915	2,55 ± 0,927	38,07 ± 5,669	1,33 ± 0,197	0,04 ± 0,009

Tretman: DSF₁₋₄₂: izloženost pacova DSF (*per os*, 178,5 mg/kg/ dan tokom 21 dana). Jedinice u kojima je izražena koncentracija parametara oksidativnog stresa: O₂⁻ (nmol red NBT/min/mg proteina), tSOD (U tSOD/mg proteina), CAT (U CAT/mg proteina), MDA (nmol MDA/mg proteina), GST (mU GST/mg proteina), GR (mU GR/mg proteina), GSH (nmol GSH/mg proteina), GSSG (nmol GSSG/mg proteina), GSSG/GSH. Statistička značajnost: * - p<0,05, *** - p<0,001. Simbol za adekvatnu kontrolnu grupu (Kontrola- maslinovo ulje: 21 dana - κ).

Rezultati studije pokazuju povećanje koncentracije O₂⁻ za 210% nakon jednog dana, odnosno za 387% nakon 21 dana od početka davanja DSF (*Grafik 5, Tabela 9*). Međutim, 21 dan nakon primene DSF zabeleženo je smanjenje aktivnosti SOD (70%) i GST (50%), kao i sadržaja MDA (30%) u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe (*Grafici 6,7,9, Tabela 9*).

4.2.3.11. *Efekat subakutne izloženosti disulfiramu na sadržaj testosterona u plazmi i testisima pacova*

Primena DSF nije dovela do statistički značajnih razlika u koncentraciji testosterona u plazmi i testisima tretiranih životinja (*Tabela 1, 10*).

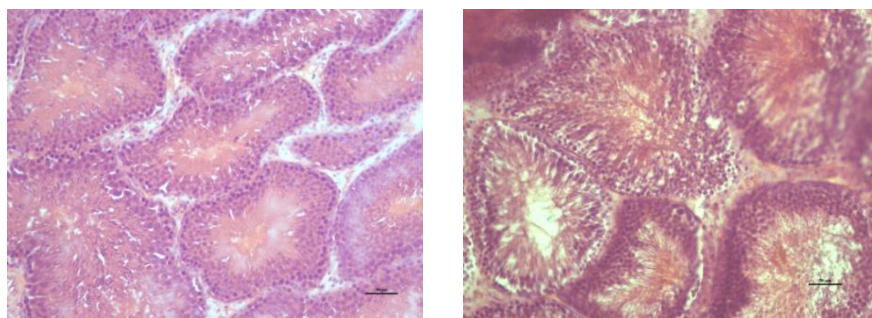
Tabela 10. Efekat disulfirama na koncentraciju testosterona u plazmi/testisima pacova

Tretman	Parametri	
	Testosteron u plazmi (nmol/ml)	Testosteron u testisima (pmol/mg proteina)
MU ₁₀	9,04 ± 1,836	2,59 ± 0,507
MU ₂₁	17,46 ± 1,310	5,51 ± 0,879
DSF ₁₀	16,76 ± 2,549	3,79 ± 0,990
DSF ₂₁	16,86 ± 2,590	4,85 ± 0,067

Tretman DSF₁₋₂₁; izloženost pacova disulfiramom (per os; 178,5 mg/kg/dan tokom 21 dana). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD za 6 uzoraka (n = 6). Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti p<0,05; oznake 10 i 21 se odnose na dužinu ekspozicije.

4.2.3.12. *Efekat subakutne izloženosti disulfiramom na morfološke promene u testisima – histopatološka analiza testisa pacova*

Na preparatu tkiva testisa nakon davanja DSF uočavaju se izmenjeni semeni kanalići. Adluminalno je prisutan eozinofilni sadržaj. Globalno je očuvana struktura tkiva i zapažaju se ćelije u svim fazama spermatogeneze (Slika 3).



A. MU₂₁ grupa

B. DSF₂₁ grupa

Slika 3. Presek tkiva testisa pacova subakutno tretiranih disulfiramom.

A. MU₂₁ grupa-kontrolna grupa (maslinovo ulje) – normalna mikroarhitektura tkiva; B. DSF₂₁ grupa (per os 178,5 mg DSF/kg t.m./dan tokom 21 dana) – očuvana normalna mikroarhitektura tkiva.

4.3. UTICAJ KOMBINOVANE IZLOŽENOSTI ALKOHOLU I/ILI KADMIJUMU I DISULFIRAMU NA TESTISE PACOVA

4.3.1. Parelna izloženost alkoholu i kadmijumu (1-21 dana)

4.3.1.1. Efekat paralelne subakutne izloženosti alkoholu i kadmijumu (1-21 dana) na koncentraciju bioeleminata u testisima pacova

Tabela 11. Efekat paralelne izloženosti etanolu i kadmijumu na status bioeleminata u testisima izloženih pacova

Tretman: A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₂₁	Fe	Cu	Zn	Mg
1 dan	13,27 ± 1,638	0,83 ± 0,101	32,75 ± 5,241	144,89 ± 17,253
<i>Kontrola 1. dan</i>	<i>12,21 ± 1,853</i>	<i>0,91 ± 0,027</i>	<i>36,56 ± 3,197</i>	<i>149,47 ± 5,302</i>
21 dan	18,72 ± 1,214 κ*	1,44 ± 0,225 κ**, α**, β*	26,19 ± 4,298 κ***	148,59 ± 6,442
<i>Kontrola 21. dan</i>	<i>12,95 ± 1,575</i>	<i>0,92 ± 0,067</i>	<i>39,41 ± 3,077</i>	<i>149,75 ± 5,234</i>

Tretman: A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁: izloženost pacova etanolu (*per os*, 3 ml 20% etanol/dan) i Cd (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg/dan), tokom 21 dana. Jedinice u kojima je izražena koncentracija bioeleminata u testisima: Fe (μg Fe/g tkiva), Cu (μg Cu/g tkiva), Zn (μg Zn/g tkiva) i Mg (μg Mg/g tkiva). Statistička značajnost: * - p < 0,05, ** - p < 0,01, *** - p < 0,001. Simbol za adekvatnu poredbenu kontrolnu grupu (Kontrola 21 dana – κ, Alkohol 21 dan – α, Kadmijum 21 dan – β).

Rezultati istraživanja pokazuju da subakutna paralelna izloženost A i Cd dovodi do povećanja koncentracije Fe u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (44%) (*Grafik 1*). U istoj eksperimentalnoj grupi životinja koncentracija Cu je bila povećana za 56% u odnosu na K₂₁ i A₂₁ grupe, odnosno smanjena u odnosu na Cd₂₁ grupu (24%) (*Grafik 2*). Studija pokazuje smanjenu koncentraciju Zn za 33% nakon subakutnog davanja A i Cd u odnosu na kontrolnu grupu (*Grafik 3*).

4.3.1.2. Efekat paralelne subakutne izloženosti alkoholu i kadmijumu (1-21 dana) na oksidativni stres u testisima pacova

Tabela 12. Efekat paralelne izloženosti etanolu i kadmijumu na status oksidativnog stresa u testisima izloženih pacova

Tretman: A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₂₁	O ₂ ⁻	tSOD	CAT	MDA	GST	GR	GSH	GSSG	GSSG/GSH
1 dan	231,55 ± 19,761 κ***, α***, β***	4,16 ± 0,116 κ***, α***	5,45 ± 0,896	149,46 ± 19,113 κ*	51,69 ± 15,033 κ***, α***, β***	1,99 ± 0,544	32,32 ± 4,536	1,50 ± 0,104	0,05 ± 0,007
<i>Kontrola 1. dan</i>	<i>67,36 ± 5,355</i>	<i>6,51 ± 0,622</i>	<i>6,22 ± 0,407</i>	<i>136,48 ± 8,341</i>	<i>97,60 ± 11,899</i>	<i>2,58 ± 0,442</i>	<i>37,71 ± 3,011</i>	<i>1,37 ± 0,095</i>	<i>0,04 ± 0,002</i>
21 dan	197,04 ± 11,332 κ***, β***	1,99 ± 0,224 κ***	3,29 ± 0,873 κ***	225,21 ± 30,283 κ***	11,99 ± 4,760 κ***, α*	1,60 ± 0,117	22,00 ± 1,889 κ***, α**	2,07 ± 0,334 κ***, α**	0,09 ± 0,010 κ***, α***
<i>Kontrola 21. dan</i>	<i>68,22 ± 2,283</i>	<i>6,43 ± 0,823</i>	<i>6,40 ± 0,411</i>	<i>134,60 ± 6,374</i>	<i>109,46 ± 11,869</i>	<i>2,55 ± 0,340</i>	<i>38,02 ± 3,598</i>	<i>1,27 ± 0,096</i>	<i>0,03 ± 0,005</i>

Tretman: A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁: izloženost pacova etanolu (*per os*, 3 ml 20% etanola/dan) i Cd (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg/dan), tokom 21 dana. Jedinice u kojima je izražena koncentracija parametara oksidativnog stresa: O₂⁻ (nmol red

NBT/min/mg proteina), tSOD (U tSOD/mg proteina), CAT (U CAT/mg proteina), MDA (nmol MDA/mg proteina), GST (mU GST/mg proteina), GR (mU GR/mg proteina), GSH (nmol GSH/mg proteina), GSSG (nmol GSSG/mg proteina), GSSG/GSH. Statistička značajnost: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$. Simbol za adekvatnu poredbenu kontrolnu grupu (Kontrola 21 dana - κ , Alkohol 21 dan - α , Kadmijum 21 dan - β).

Rezultati studije su pokazali da 21 dan nakon paralelne primene A i Cd dolazi do povećanja sledećih parametara: koncentracije $O_2^{\bullet-}$ u odnosu na kontrolu (189%); koncentracije MDA u odnosu na kontrolu (67%); koncentracije GSSG u odnosu na kontrolnu (62%) i A₂₁ grupu (32%); odnosa GSSG/GSH u odnosu na kontrolnu (162%) i A₂₁ grupu (84%). Paralelna primena A i Cd u trajanju od 21 dan dovodi do smanjenja sledećih parametara: koncentracije $O_2^{\bullet-}$ u odnosu na Cd₂₁ grupu (23%); aktivnosti SOD u odnosu na K₂₁ (69%) grupu; aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu (49%); aktivnosti GST u odnosu na kontrolnu (89%) i A₂₁ grupu (68%); i koncentracije GSH u odnosu na kontrolnu (42%) i A₂₁ grupu (32%) životinja (*Grafici 5-9,11-13*).

4.3.1.3. Efekat paralelne subakutne izloženosti alkoholu i kadmijumu (1-21 dana) na sadržaj testosterona u plazmi i testisima pacova

Subakutna izloženost A i Cd dovodi do smanjenja koncentracije testosterona u plazmi u odnosu na K₂₁ grupu (59%), A₂₁ grupu (34%) i Cd₂₁ grupu (22%) životinja. Davanje A i Cd u trajanju od 21 dana smanjuje koncentraciju testosterona u tkivu testisa u odnosu na K₂₁ kontrolnu grupu (71%) i A₂₁ grupu (60%) životinja (*Tabela 1, 13*).

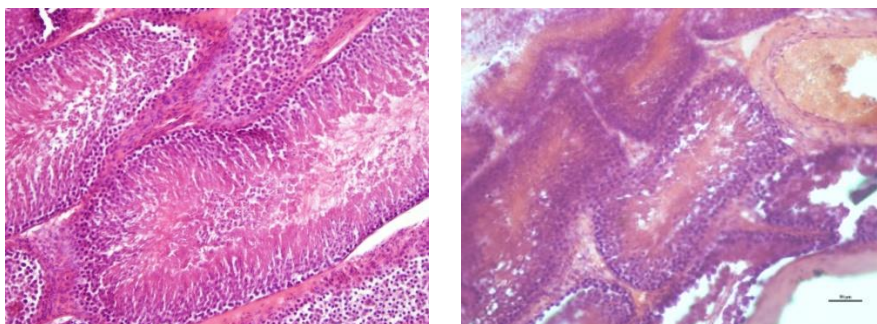
Tabela 13. Efekat paralelne izloženosti etanolu i kadmijumu na koncentraciju testosterona u plazmi i testisima pacova

Tretman	Parametri	
	Testosteron u plazmi (nmol/ml)	Testosteron u testisima (pmol/mg proteina)
K ₁₀	7,72 ± 1,624	2,33 ± 0,648
K ₂₁	18,22 ± 2,553	5,10 ± 0,628
A ₁₀ /Cd ₁₀	7,60 ± 1,741	1,67 ± 0,286
A ₂₁ /Cd ₂₁	7,52 ± 0,826, κ^{***} , α^*	1,45 ± 0,418, κ^{***} , α^{***}

Tretman A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁ : izloženost pacova etanolu (per os; 3 ml 20% rastvora etanola/dan tokom 21 dana). i kadmijumu (intraperitonealno; 1 mg CdCl₂/kg/dan tokom 21dana). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD za 6 uzoraka (n = 6). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (κ) i A grupu (α) životinja (*videti u Tabeli 1*). Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; oznake 10 i 21 se odnose na dužinu ekspozicije.

4.3.1.4. Efekat paralelne subakutne izloženosti alkoholu i kadmijumu (1-21 dana) na morfološke promene u testisima – histopatološka analiza testisa pacova

Na mikrografiji tkiva testisa nakon paralelne izloženosti alkoholu i kadmijumu u trajanju od 21 dana primećuju se matične ćelije muških gameta koje leže na bazalnoj membrani, dok se sve ostale zrelije ćelije nalaze u adlumenskom delu epitela (Slika 4).



A. K₂₁ grupa

B. A₂₁/Cd₂₁ grupa

Slika 4. Presek tkiva testisa pacova subakutno kombinovano tretiranih kadmijumom i etanolom.

A. K₂₁ kontrolna grupa – normalna mikroarhitektura tkiva; B. A₂₁/Cd₂₁ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan + *per os* 3 ml 20% etanol/dan tokom 21 dana) – narušen integritet membrane semenih kanalića.

4.3.2. Nadovezana izloženost alkoholu (1-21 dana) pa disulfiramu (22-42 dana)

4.3.2.1. Efekat nadovezane subakutne izloženosti alkoholu (1-21 dana) pa disulfiramu (22-42 dana) na koncentraciju bioelemenata u testisima pacova

Tabela 14. Efekat nadovezanog tretmana etanolom pa DSF na status bioelemenata u testisima izloženih pacova

Tretman: A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₄₂	Fe	Cu	Zn	Mg
1 dan	13,01 ± 0,941	0,81 ± 0,077	31,65 ± 2,389	152,01 ± 12,012
<i>Kontrola 1. dan</i>	<i>12,21 ± 1,853</i>	<i>0,91 ± 0,027</i>	<i>36,56 ± 3,197</i>	<i>149,47 ± 5,302</i>
<i>Kontrola-maslinovo ulje 1. dan</i>	<i>17,03 ± 2,318</i>	<i>1,25 ± 0,221</i>	<i>32,82 ± 5,207</i>	<i>122,16 ± 10,946</i>
21 dan	18,79 ± 1,259 κ^{**}	0,92 ± 0,125	25,49 ± 1,101 κ^{***}	147,10 ± 4,610
<i>Kontrola 21. dan</i>	<i>12,95 ± 1,575</i>	<i>0,92 ± 0,067</i>	<i>39,41 ± 3,077</i>	<i>149,75 ± 5,234</i>
<i>Kontrola-maslinovo ulje 21. dan</i>	<i>12,95 ± 1,575</i>	<i>1,46 ± 0,199</i>	<i>32,81 ± 5,937</i>	<i>125,85 ± 17,053</i>
42 dan	20,56 ± 1,997 κ[*]	0,92 ± 0,120 κ^{**}	27,78 ± 0,610	139,48 ± 5,782
<i>Kontrola 42. dan</i>	<i>12,95 ± 1,575</i>	<i>0,92 ± 0,067</i>	<i>39,41 ± 3,077</i>	<i>149,75 ± 5,234</i>
<i>Kontrola-maslinovo ulje 42. dan</i>	<i>14,91 ± 3,405</i>	<i>1,47 ± 0,301</i>	<i>34,07 ± 6,626</i>	<i>119,97 ± 14,841</i>

Tretman: A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂: izloženost pacova etanolu (*per os*, 3 ml 20% etanola/dan tokom prvih 21 dana) i disulfiramu (*per os*, 178,5 mgDSF/dan tokom narednih 22-42 dana). Jedinice u kojima je izražena koncentracija bioelemenata u testisima: Fe (µg Fe/g tkiva), Cu (µg Cu/g tkiva), Zn (µg Zn/g tkiva) i Mg (µg Mg/g tkiva). Statistička značajnost: * - p<0,05, ** -p<0,01, *** - p<0,001. Simbol za adekvatnu poredbenu kontrolnu grupu (Kontrola- maslinovo ulje: 21 dana – κ).

Rezultati istraživanja pokazuju da dolazi do povećanja koncentracije Fe (38%) i smanjenja koncentracije Cu (37%) u tkivu testisa nakon subakutne izloženosti A, a potom DSF u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (*Grafici 1,2*).

4.3.2.2. Efekat nadovezane subakutne izloženosti alkoholu (1-21 dana) pa disulfiramu (22-42 dana) na oksidativni stres u testisima pacova

Tabela 15. Efekat nadovezanog tretmana etanolom pa DSF na status oksidativnog stresa u testisima izloženih pacova

Tretman: A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₄₂	O ₂ ^{•-}	tSOD	CAT	MDA	GST	GR	GSH	GSSG	GSSG/GSH
1 dan	73,04 ± 10,922	5,7 ± 0,559	6,01 ± 0,760	154,64 ± 7,733	96,90 ± 17,656	2,25 ± 0,276	38,81 ± 3,893	1,40 ± 0,106	0,04 ± 0,004
<i>Kontrola 1. dan</i>	67,36 ± 5,555	6,51 ± 0,622	6,22 ± 0,407	136,48 ± 8,341	97,60 ± 11,899	2,58 ± 0,442	37,71 ± 3,011	1,37 ± 0,095	0,04 ± 0,002
<i>Kontrola-maslinovo ulje 1. dan</i>	80,01 ± 5,443	6,97 ± 0,684	5,14 ± 1,145	147,91 ± 15,989	81,69 ± 12,449	2,47 ± 1,071	37,14 ± 4,006	1,46 ± 0,054	0,04 ± 0,005
21 dan	201,13 ± 25,193 κ***	2,99 ± 0,543 κ***	4,77 ± 0,597	199,63 ± 13,249 κ***	37,05 ± 5,173 κ***	2,24 ± 0,290	32,37 ± 3,352	1,57 ± 0,073	0,05 ± 0,006
<i>Kontrola 21. dan</i>	68,22 ± 2,283	6,43 ± 0,823	6,40 ± 0,411	134,60 ± 6,374	109,46 ± 11,869	2,55 ± 0,340	38,02 ± 3,598	1,27 ± 0,096	0,03 ± 0,005
<i>Kontrola-maslinovo ulje 21. dan</i>	72,27 ± 11,688	6,90 ± 0,471	5,61 ± 0,709	144,75 ± 16,125	72,85 ± 17,915	2,55 ± 0,927	38,07 ± 5,669	1,33 ± 0,197	0,04 ± 0,009
42 dan	146,67 ± 9,795 κ***, α**	2,06 ± 0,281 κ***	4,47 ± 0,598	142,59 ± 6,411 α***	47,81 ± 16,021 κ***	2,37 ± 0,477	41,30 ± 4,381 α*	1,41 ± 0,193	0,03 ± 0,006
<i>Kontrola 42. dan</i>	87,58 ± 11,720	8,43 ± 0,663	6,09 ± 1,221	142,51 ± 17,749	91,79 ± 16,172	2,51 ± 1,099	39,65 ± 3,696	1,31 ± 0,048	0,03 ± 0,003
<i>Kontrola-maslinovo ulje 42. dan</i>	77,67 ± 11,724	7,54 ± 0,896	6,21 ± 1,149	160,82 ± 14,518	96,66 ± 6,539	2,69 ± 0,568	38,60 ± 5,382	1,37 ± 0,101	0,04 ± 0,004

Tretman: A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂: izloženost pacova etanolu (*per os*, 3 ml 20% etanol/dan tokom prvih 21 dana) i disulfiramu (*per os*, 178,5 mg/kg/dan tokom narednih 22-42 dana). Jedinice u kojima je izražena koncentracija parametara oksidativnog stresa: O₂^{•-} (nmol red NBT/min/mg proteina), tSOD (U tSOD/mg proteina), CAT (U CAT/mg proteina), MDA (nmol MDA/mg proteina), GST (mU GST/mg proteina), GR (mU GR/mg proteina), GSH (nmol GSH/mg proteina), GSSG (nmol GSSG/mg proteina), GSSG/GSH. Statistička značajnost: * -p<0,05, ** -p<0,01, *** - p<0,001. Simbol za adekvatnu poredbenu kontrolnu grupu (Kontrola- maslinovo ulje: 21 dana – κ, Alkohol 21 dan – α)

Rezultati studije pokazuju da subakutno davanje A, a potom DSF dovodi do povećanja: koncentracije O₂^{•-} (89%) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu. U istoj eksperimentalnoj grupi životinja došlo je do smanjenja: aktivnosti SOD (73%) i GST (51%) u odnosu na kontrolnu grupu. U grupi životinja A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ za 28% je povećana koncentracija GSH u odnosu na A₂₁ grupu. Međutim, davanje DSF nakon subakutnog aplikovanja A pokazalo je smanjenje sledećih parametara: koncentracije O₂^{•-} (27%) i koncentracije MDA (29%) u odnosu na A₂₁ grupu (*Grafici 5-7,9,11*).

4.3.2.3. Efekat nadovezane subakutne izloženosti alkoholu (1-21 dana) pa disulfiramu (22-42 dana) na sadržaj testosterona u plazmi i testisima pacova

Subakutno davanje A, a potom DSF u grupama A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₃₁ i A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ dovodi do smanjenja koncentracije testosterona u plazmi za 60% i 45%, redom, a u testisima za 27% i 34%, redom u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu. Takođe je zabeleženo smanjenje koncentracije testosterona u plazmi u A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₃₁ grupi za 36% u odnosu na A₂₁ grupu (Tabela 1, 13).

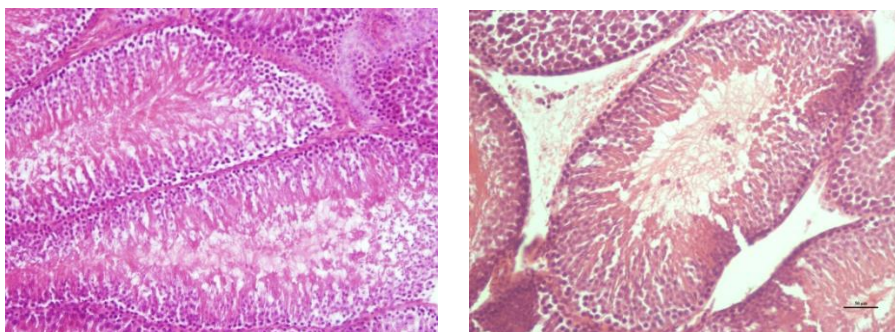
Tabela 13. Efekat nadovezanog tretmana etanolom pa DSF na koncentraciju testosterona u plazmi/testisima pacova

Tretman	Parametri	
	Testosteron u plazmi (nmol/ml)	Testosteron u testisima (pmol/mg proteina)
K ₂₁	18,22 ± 2,553	5,10 ± 0,628
KMU ₄₂	21,36 ± 2,164	5,65 ± 1,089
A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₃₁	7,29 ± 2,159, κ***, α***	3,70 ± 0,514, κ***
A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₄₂	11,04 ± 1,019, κ***, α***	3,91 ± 0,223, κ***

Tretman A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ : izloženost pacova etanolu (per os; 3 ml 20% rastvora etanola/dan tokom 21 dana). i disulfiramu (per os; 178,5 mg DSF/kg/dan tokom 21 dana). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD za 6 uzoraka (n = 6). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (κ) i A grupu (α) životinja (videti u Tabeli 1). Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: ***p<0.001; oznake 1, 21, 22, 31 i 42 se odnose na dužinu ekspanzije.

4.3.2.4. Efekat nadovezane subakutne izloženosti alkoholu (1-21 dana), a potom disulfiramu (22-42 dana) na morfološke promene u testisima – histopatološka analiza testisa pacova

Na histološkom preseku tkiva testisa nakon udružene subakutne izloženosti A, a potom DSF se intraluminalno u semenim kanalićima vidi slojeviti germinativni epitel. Proces spermatogeneze se ne dešava istovremeno, čime se i objašnjava nejednak izgled kanalića koji sadrže različite grupe ćelija spermatogeneze. Ova asinhronija poznata je pod imenom ciklus semenog epitela. Adluminalno se uočava veliki broj spermatida (Slika 5).



A. KMU₄₂ grupa

B. A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupa

Slika 5. Presek tkiva testisa pacova nakon nadovezane subakutne izloženosti alkoholu a potom disulfiramu

A. KMU₄₂ grupa- kontrolna grupa (nakon 21 dana odsustva tretmana životinjama je davano maslinovo ulje)-normalna mikroarhitektura tkiva; B. A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupa (*per os* 3 ml 20% etanol/dan tokom 21 dana i potom *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan tokom 21 dana)-narušen process spermatogeneze.

4.3.3. Udružena izloženost kadmijumu (1-42 dana) i disulfiramu (22-42 dana)

4.3.3.1. Efekat udružene izloženosti kadmijumu (subhronična, 1-42 dana) i disulfiramu (subakutna, 22-42 dana) na koncentraciju bioeleminata u testisima pacova

Tabela 17. Eefekat kombinovanog tretmana Cd i DSF na status bioeleminata u testisima izloženih pacova

Tretman: Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	Fe	Cu	Zn	Mg
1 dan	15,33 ± 1,342	0,88 ± 0,087	32,85 ± 5,097	152,10 ± 17,672
<i>Kontrola 1. dan</i>	<i>12,21 ± 1,853</i>	<i>0,91 ± 0,027</i>	<i>36,56 ± 3,197</i>	<i>149,47 ± 5,302</i>
<i>Kontrola-maslinovo ulje 1. dan</i>	<i>17,03 ± 2,318</i>	<i>1,25 ± 0,221</i>	<i>32,82 ± 5,207</i>	<i>122,16 ± 10,946</i>
21 dan	21,67 ± 3,970 κ***	1,90 ± 0,162 κ***	22,93 ± 3,715, κ***	153,41 ± 8,313
<i>Kontrola 21. dan</i>	<i>12,95 ± 1,575</i>	<i>0,92 ± 0,067</i>	<i>39,41 ± 3,077</i>	<i>149,75 ± 5,234</i>
<i>Kontrola-maslinovo ulje 21. dan</i>	<i>12,95 ± 1,575</i>	<i>1,46 ± 0,199</i>	<i>32,81 ± 5,937</i>	<i>125,85 ± 17,053</i>
42 dana	17,12 ± 1,175 β***	0,90 ± 0,068 κ**, β***	29,04 ± 1,333	125,55 ± 17,032
<i>Kontrola 42. dan</i>	<i>15,91 ± 2,637</i>	<i>0,91 ± 0,027</i>	<i>38,89 ± 2,520</i>	<i>129,25 ± 15,646</i>
<i>Kontrola-maslinovo ulje 42. dan</i>	<i>14,91 ± 3,405</i>	<i>1,47 ± 0,301</i>	<i>34,07 ± 6,626</i>	<i>119,97 ± 14,841</i>

Tretman: Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂: izloženost pacova Cd (*i.p.*, 1 mg CdCl₂/kg/dan tokom 42 dana) i disulfiram (*per os*, 178,5 mg/kg/dan tokom 22-42 dana). Jedinice u kojima je izražena koncentracija bioeleminata u testisima: Fe (μg Fe/g tkiva), Cu (μg Cu/g tkiva), Zn (μg Zn/g tkiva) i Mg (μg Mg/g tkiva). Statistička značajnost: *** - p<0,001. Simbol za adekvatnu poredbenu kontrolnu grupu (Kontrola- maslinovo ulje: 42 dana – κ, Kadmijum 42 dana-β).

Rezultati studije pokazuju da udružena izloženost Cd u trajanju od 42 dana i DSF u trajanju od 21 dana dovodi do smanjenja koncentracije Cu (38%) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu

grupu životinja (*Grafik 2*). U grupi životinja Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ registrovano je smanjenje koncentracije Fe (56%) i Cu (76%) u odnosu na Cd₄₂ grupu (*Grafici 1,2*).

4.3.3.2. Efekat udružene izloženosti kadmijumu (subhronična, 1-42 dana) i disulfiramu (subakutna, 22-42 dana) na oksidativni stres u testisima pacova

Tabela 18. Efekat kombinovanog tretmana kadmijuma i disulfirama na status oksidativnog stresa u testisima izloženih pacova

Tretman: Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	O ₂ ⁻	tSOD	CAT	MDA	GST	GR	GSH	GSSG	GSSG/GSH
1 dan	146,78 ± 20,330 κ***	4,56 ± 0,526 κ***	6,78 ± 1,210	135,35 ± 3,952	93,55 ± 8,217	1,84 ± 0,217	37,86 ± 4,850	1,39 ± 0,198	0,04 ± 0,007
<i>Kontrola 1. dan</i>	67,36 ± 5,555	6,51 ± 0,622	6,22 ± 0,407	136,48 ± 8,341	97,60 ± 11,899	2,58 ± 0,442	37,71 ± 3,011	1,37 ± 0,095	0,04 ± 0,002
<i>Kontrola-maslinovo ulje 1. dan</i>	80,01 ± 5,443	6,97 ± 0,684	5,14 ± 1,145	147,91 ± 15,989	81,69 ± 12,449	2,47 ± 1,071	37,14 ± 4,006	1,46 ± 0,054	0,04 ± 0,005
21 dan	253,38 ± 29,539 κ***	1,4 ± 0,149 κ***	4,44 ± 0,917 κ***	192,99 ± 32,080 κ***	17,33 ± 7,701 κ***	1,43 ± 0,241 κ*	25,26 ± 6,054 κ***	1,76 ± 0,066 κ*	0,07 ± 0,020 κ***
<i>Kontrola 21. dan</i>	68,22 ± 2,283	6,43 ± 0,823	6,40 ± 0,411	134,60 ± 6,374	109,46 ± 11,869	2,55 ± 0,340	38,02 ± 3,598	1,27 ± 0,096	0,03 ± 0,005
<i>Kontrola-maslinovo ulje 21. dan</i>	72,27 ± 11,688	6,90 ± 0,471	5,61 ± 0,709	144,75 ± 16,125	72,85 ± 17,915	2,55 ± 0,927	38,07 ± 5,669	1,33 ± 0,197	0,04 ± 0,009
42 dan	183,71 ± 11,716 κ***, β***	2,75 ± 0,371 κ***, β***	6,06 ± 1,129 β***	134,55 ± 21,295 β***	30,17 ± 4,449 κ***	2,77 ± 0,669 β***	24,97 ± 6,543 κ***	1,97 ± 0,249 κ***	0,08 ± 0,011 κ***, β***
<i>Kontrola 42. dan</i>	87,58 ± 11,720	8,43 ± 0,663	6,09 ± 1,221	142,51 ± 17,749	91,79 ± 16,172	2,51 ± 1,099	39,65 ± 3,696	1,31 ± 0,048	0,03 ± 0,003
<i>Kontrola-maslinovo ulje 42. dan</i>	77,67 ± 11,724	7,54 ± 0,896	6,21 ± 1,149	160,82 ± 14,518	96,66 ± 6,539	2,69 ± 0,568	38,60 ± 5,382	1,37 ± 0,101	0,04 ± 0,004

Tretman: Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂: izloženost pacova Cd (*i.p.*, 1 mg CdCl₂/kg/dan tokom 42 dana) i DSF (*per os*, 178,5 mg DSF/kg/dan tokom 22-42 dana). Jedinice u kojima je izražena koncentracija parametara oksidativnog stresa: O₂⁻ (nmol red NBT/min/mg proteina), tSOD (U tSOD/mg proteina), CAT (U CAT/mg proteina), MDA (nmol MDA/mg proteina), GST (mU GST/mg proteina), GR (mU GR/mg proteina), GSH (nmol GSH/mg proteina), GSSG (nmol GSSG/mg proteina), GSSG/GSH. Statistička značajnost: * - p<0,05, *** - p<0,001. Simbol za adekvatnu poredbenu grupu (Kontrola- maslinovo ulje 42 dana – κ, Kadmijum 42 dana-β).

Rezultati istraživanja pokazuju da udružena izloženost Cd u trajanju od 42 dana i DSF u trajanju od 21 dana dovodi do povećanja sledećih parametara: koncentracije O₂⁻ (137%), GSSG (44%), odnosa GSSG/GSH (123%) u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu i aktivnosti SOD (175%), CAT (75%) i GR (122%) u odnosu na Cd₄₂ grupu; odnosno dovodi do smanjenja: aktivnosti SOD (63%) i GST (69%) i koncentracije GSH (35%) u odnosu na kontrolnu grupu, kao i koncentracije O₂⁻ (43%) i MDA (53) i odnosa GSSG/GSH (39%) u odnosu na Cd₄₂ grupu (*Grafici 5-13, Tabela 18*).

4.3.3.3. Efekat udružene izloženosti kadmijumu (subhronična, 1-42 dana) i disulfiramu (subakutna, 22-42 dana) na sadržaj testosterona u plazmi i testisima pacova

Udružena subhronična izloženost Cd i DSF u grupama Cd₁₋₃₁/DSF₂₂₋₃₁ i Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ uzrokuje smanjenje koncentracije testosterona u plazmi za 57% i 59%, redom, a u tkivu testisa za 78% i 91%, redom, u odnosu na odgovarajuću kontrolu (*Tabela 1,19*).

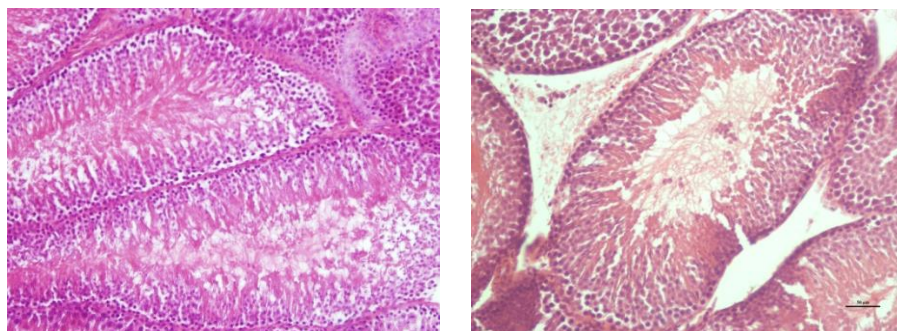
Tabela 19. Efekat izloženosti kadmijumu i disulfiramu na koncentraciju testosterona u plazmi/testisima pacova

Tretman	Parametri	
	Testosteron u plazmi (nmol/ml)	Testosteron u testisima (pmol/mg proteina)
K ₂₁	18,22 ± 2,553	5,10 ± 0,628
KMU ₄₂	21,36 ± 2,164	5,65 ± 1,089
Cd ₁₋₃₁ /DSF ₂₂₋₃₁	9,00 ± 0,655, κ***	1,21 ± 0,313, κ***
Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	8,68 ± 0,772, κ***	0,52 ± 0,098, κ***

Tretman Cd₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂: izloženost pacova kadmijumu (intraperitonealno; 1 mg CdCl₂/kg/dan tokom 42 dana). i disulfiramu (per os; 178,5 DSF mg/kg/dan tokom 21 dana). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD za 6 uzoraka (n = 6). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (κ) životinja. Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: ***p<0.001; oznake 1, 21, 31 i 42 se odnose na dužinu ekspozicije.

4.3.3.4. Efekat udružene izloženosti kadmijumu (subhronična, 1-42 dana) i disulfiramu (subakutna, 22-42 dana) na morfološke promene u testisima – histopatološka analiza testis pacova

Na preparatu tkiva testisa nakon udružene subhronične izloženosti Cd i subakutne izloženosti DSF se uočava veći broj semenih kanalića, čije su bazalne membrane zadebljale. Lumen kanalića je gotovo u potpunosti acelularan i ispunjen grudvičasto-homogenim ili mrvičasto-rastresitim jako eozinofilnim sadržajem. Neki semeni kanalići su potpuno prazni (Slika 6).



A. KMU₄₂ grupa

B. Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ grupa

Slika 6. Presek tkiva testisa pacova nakon udružene subhronične izloženosti kadmijumu i subakutne izloženosti disulfiramu

A. KMU₄₂ grupa- kontrolna grupa (nakon 21 dana odsustva tretmana životinjama je davano maslinovo ulje)- normalna mikroarhitektura tkiva; B. Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ grupa (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan tokom 42 dana i *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan od 22. - 42. dana) – acelularan lumen semenih kanalića.

4.3.4. Udružena izloženost disulfiramu (22-42 dana), kadmijumu (1-42 dana) i alkoholu (1-21 dana)

4.3.4.1. Efekat održene izloženosti disulfiramu (subakutna, 22-42 dana), kadmijumu (subhronična, 1-42 dana) i alkoholu (subakutna, 1-21 dana) na koncentraciju bioelemenata (Fe, Cu, Zn, Mg) u testisima pacova

Tabela 20. Efekat kombinovanog tretmana etanolom, kadmijumom i disulfiratom na status bioelemenata u testisima izloženih pacova

Tretman: A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	Fe	Cu	Zn	Mg
1 dan	13,27 ± 1,638	0,83 ± 0,101	32,75 ± 5,241	144,89 ± 17,253
<i>Kontrola 1. dan</i>	<i>12,21 ± 1,853</i>	<i>0,91 ± 0,027</i>	<i>36,56 ± 3,197</i>	<i>149,47 ± 5,302</i>
<i>Kontrola-maslinovo ulje 1. dan</i>	<i>17,03 ± 2,318</i>	<i>1,25 ± 0,221</i>	<i>32,82 ± 5,207</i>	<i>122,16 ± 10,946</i>
21 dan	18,72 ± 1,214 κ*	1,44 ± 0,225 κ**, α**, β*	26,19 ± 4,298 κ***	148,59 ± 6,442
<i>Kontrola 21. dan</i>	<i>12,95 ± 1,575</i>	<i>0,92 ± 0,067</i>	<i>39,41 ± 3,077</i>	<i>149,75 ± 5,234</i>
<i>Kontrola-maslinovo ulje 21. dan</i>	<i>12,95 ± 1,575</i>	<i>1,46 ± 0,199</i>	<i>32,81 ± 5,937</i>	<i>125,85 ± 17,053</i>
42 dana	16,31 ± 0,619 β***	1,05 ± 0,102 β***	33,18 ± 1,959 β*	141,40 ± 5,499
<i>Kontrola 42. dan</i>	<i>15,91 ± 2,637</i>	<i>0,91 ± 0,027</i>	<i>38,89 ± 2,520</i>	<i>129,25 ± 15,646</i>
<i>Kontrola-maslinovo ulje 42. dan</i>	<i>14,91 ± 3,405</i>	<i>1,47 ± 0,301</i>	<i>34,07 ± 6,626</i>	<i>119,97 ± 14,841</i>

Tretman: A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂: izloženost pacova etanolu (*per os*, 3 ml 20% etanola/dan, tokom 1-21 dana), Cd (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg/dan, tokom 42 dana) i DSF (*per os*, 178,5 mg DSF/kg/dan, tokom 22-42 dana). Jedinice u kojima je izražena koncentracija bioelemenata u testisima: Fe (μg Fe/g tkiva), Cu (μg Cu/g tkiva), Zn (μg Zn/g tkiva) i Mg (μg Mg/g tkiva). Statistička značajnost: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001. Simbol za adekvatnu grupu (Kontrola-maslinovo ulje: 42 dana – κ, Alkohol 21 dan – α, Kadmijum 42 dana – β).

Rezultati prikazani na graficima 1-4 pokazuju koncentraciju bioelemenata nakon subakutne izloženosti DSF (22-42 dana) tokom subhronične izloženosti Cd (1-42 dana), a posle subakutne izloženosti A (1-21 dana). U grupi životinja A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ nisu registrovane promene u koncentracijama merenih metala u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe. U odnosu na Cd₄₂ grupu zabeleženo je smanjenje koncentracija Fe (58%) i Cu (72%), a povećanje koncentracije Zn (37%) (Grafici 1-4, Tabela 20).

4.3.4.2. Efekat održene izloženosti disulfiramu (subakutna, 22-42 dana), kadmijumu (subhronična, 1-42 dana) i alkoholu (subakutna, 1-21 dana) na oksidativni stres u testisima pacova

Tabela 21. Efekat kombinovanog tretmana etanolom, kadmijumom i disulfiratom na status oksidativnog stresa u testisima izloženih pacova

Tretman: A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	O ₂ ⁻	tSOD	CAT	MDA	GST	GR	GSH	GSSG	GSSG/GSH
1 dan	231,55 ± 19,761 κ ^{***} , α ^{***} , β ^{***}	4,16 ± 0,116 κ ^{***} , α ^{***}	5,45 ± 0,896	149,46 ± 19,113 κ [*]	51,69 ± 15,033 κ ^{***} , α ^{***} , β ^{***}	1,99 ± 0,544	32,32 ± 4,536	1,50 ± 0,104	0,05 ± 0,007
Kontrola 1. dan	67,36 ± 5,355	6,51 ± 0,622	6,22 ± 0,407	136,48 ± 8,341	97,60 ± 11,899	2,58 ± 0,442	37,71 ± 3,011	1,37 ± 0,095	0,04 ± 0,002
Kontrola-maslinovo ulje 1. dan	80,01 ± 5,443	6,97 ± 0,684	5,14 ± 1,145	147,91 ± 15,989	81,69 ± 12,449	2,47 ± 1,071	37,14 ± 4,006	1,46 ± 0,054	0,04 ± 0,005
21 dan	201,13 ± 25,193 κ ^{***}	2,99 ± 0,543 κ ^{***}	4,77 ± 0,597	199,63 ± 13,249 κ ^{***}	37,05 ± 5,173 κ ^{***}	2,24 ± 0,290	32,37 ± 3,352	1,57 ± 0,073	0,05 ± 0,006
Kontrola 21. dan	68,22 ± 2,283	6,43 ± 0,823	6,40 ± 0,411	134,60 ± 6,374	109,46 ± 11,869	2,55 ± 0,340	38,02 ± 3,598	1,27 ± 0,096	0,03 ± 0,005
Kontrola-maslinovo ulje 21. dan	72,27 ± 11,688	6,90 ± 0,471	5,61 ± 0,709	144,75 ± 16,125	72,85 ± 17,915	2,55 ± 0,927	38,07 ± 5,669	1,33 ± 0,197	0,04 ± 0,009
42 dan	167,97 ± 10,206 κ ^{***} , β ^{***}	2,13 ± 0,392 κ ^{***} , β [*]	5,23 ± 0,815 γ [*]	135,38 ± 20,169 α ^{***} , β ^{***} , γ ^{***}	23,31 ± 3,943 κ ^{***}	2,71 ± 0,402 β ^{***}	26,98 ± 3,218 κ ^{***} , β ^{**}	1,64 ± 0,168 β ^{**}	0,06 ± 0,013 β ^{***} , γ [*]
Kontrola 42. dan	87,58 ± 11,720	8,43 ± 0,663	6,09 ± 1,221	142,51 ± 17,749	91,79 ± 16,172	2,51 ± 1,099	39,65 ± 3,696	1,31 ± 0,048	0,03 ± 0,003
Kontrola-maslinovo ulje 42. dan	77,67 ± 11,724	7,54 ± 0,896	6,21 ± 1,149	160,82 ± 14,518	96,66 ± 6,539	2,69 ± 0,568	38,60 ± 5,382	1,37 ± 0,101	0,04 ± 0,004

Tretman: A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂: izloženost pacova etanolu (*per os*, 3 ml 20% etanola/dan, tokom 1-21 dana), Cd (*i.p.* 1 mg CdCl₂/kg/dan, tokom 42 dana) i DSF (*per os*, 178,5 mg DSF/kg/dan, tokom 22-42 dana). Jedinice u kojima je izražena koncentracija parametara oksidativnog stresa: O₂⁻ (nmol red NBT/min/mg proteina), tSOD (U tSOD/mg proteina), CAT (U CAT/mg proteina), MDA (nmol MDA/mg proteina), GST (mU GST/mg proteina), GR (mU GR/mg proteina), GSH (nmol GSH/mg proteina), GSSG (nmol GSSG/mg proteina), GSSG/GSH. Statistička značajnost: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001. Simbol za adekvatnu grupu (Kontrola- maslinovo ulje: 42 dana – κ, Alkohol 21 dan – α, Kadmijum 42 dana – β, Alkohol i kadmijum 21 dan – γ).

Rezultati istraživanja pokazuju da u grupi A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu dolazi do povećanja koncentracije O₂⁻ (116%), odnosno do smanjenja: aktivnosti SOD (72%) i GST (76%), kao i koncentracije GSH (30%). Međutim, u istoj grupi životinja je u odnosu na A₂₁ grupu izmereno smanjenje koncentracije MDA (32%), dok je u odnosu na Cd₄₂ grupu zabeleženo povećanje aktivnosti SOD (113%) i GR (117%) i koncentracije GSH (56%), odnosno smanjenje koncentracije O₂⁻ (48%), MDA(53%) i GSSG (25%), kao i odnosa GSSG/GSH (51%). U odnosu na A₂₁/Cd₂₁ grupu registrovano je smanjenje koncentracije MDA (40%) i odnosa GSSG/GSH (33%), kao i povećanje aktivnosti CAT (59%) (Grafici 5-13, Tabela 21).

4.3.4.3. Efekat održene izloženosti disulfiramom (subakutna, 22-42 dana), kadmijumu (subhronična, 1-42 dana) i alkoholu (subakutna, 1-21 dana) na sadržaj testosterona u plazmi i testisima pacova

Smanjenje koncentracije testosterona u plazmi registrovano je u grupama A₁₋₂₁/Cd₁₋₃₁/DSF₂₂₋₃₁ (68%) i A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ (64%) u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe. U plazmi je zabeleženo smanjenje koncentracije testosterona u grupi A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ (33%), a u testisima u grupama A₁₋₂₁/Cd₁₋₃₁/DSF₂₂₋₃₁ (66%) i A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ (84%) u odnosu na A₂₁ grupu životinja (Tabele 1, 22).

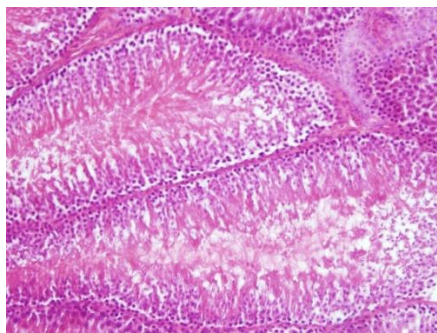
Tabela 22. Efekat kombinovanog tretmana etanolom, kadmijumom i disulfiramom na koncentraciju testosterona u plazmi/testisima pacova

Tretman	Parametri	
	Testosteron u plazmi (nmol/ml)	Testosteron u testisima (pmol/mg proteina)
K ₂₁	18,22 ± 2,553	5,10 ± 0,628
KMU ₄₂	21,36 ± 2,164	5,65 ± 1,089
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₃₁ /DSF ₂₂₋₃₁	6,72 ± 1,151, κ***	1,24 ± 0,271, κ***, α***
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	7,60 ± 0,777, κ***, α*	0,59 ± 0,039, κ***, α***

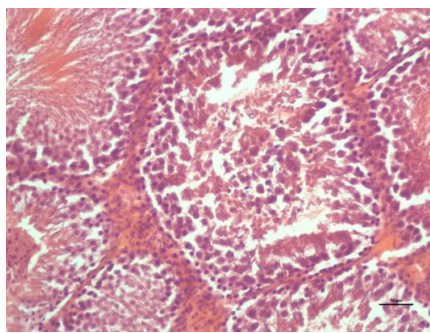
Tretman A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂: izloženost pacova etanolu (per os; 3 ml 20% rastvora etanola/dan tokom 21 dana), kadmijumu (intraperitonealno; 1 mg CdCl₂/kg/dan tokom 42 dana). i disulfiramu (per os; 178,5 mg DSF/kg/dan tokom 21 dana). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD za 6 uzoraka (n = 6). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (κ) i A grupu (α) životinja (videti u Tabeli 1). Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: *p<0.05; ***p<0.001; oznake 1, 21, 22, 31 i 42 se odnose na dužinu ekspozicije.

4.3.4.4. Efekat održene izloženosti disulfiramu (subakutna, 22-42 dana), kadmijumu (subhronična, 1-42 dana) i alkoholu (subakutna, 1-21 dana) na morfološke promene u testisima – histopatološka analiza testisa pacova

Na histološkom preparatu tkiva testisa nakon subakutne izloženosti DSF tokom subhronične izloženosti Cd, a po subakutnoj izloženosti A uočavaju se semeni kanalići sa svojim epitelom kojeg čine dva tipa ćelija - Sertolijeve ćelije, čije se granice teško uočavaju i ćelije spermatogeneze, koje su poređane u nekoliko redova i dobro su vidljive. Na slici se primećuju i spermatide okomito usmerene prema bazi semenog kanalića. Intersticijski prostor ispunjen je zapaljenskim infiltratom (Slika 7).



A. KMU₄₂ grupa



B. A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ grupa

Slika 7. Presek tkiva testisa pacova nakon kombinovanog tretmana etanolom, kadmijumom i disulfiratom

A. KMU₄₂ grupa- kontrolna grupa (nakon 21 dana odsustva tretmana životinjama je davano maslinovo ulje)- normalna mikroarhitektura tkiva; B. A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ grupa (per os 3 ml 20% etanol/dan tokom 21 dana, i.p. 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan tokom 42 dana i per os 178,5 mg DSF/kg/dan od 22. - 42. dana)– zapaljenski infiltrat u intersticijumu.

5. DISKUSIJA

Brojne studije su potvrdile da izlaganje alkoholu i/ili Cd dovodi do reproduktivne toksičnosti kod ljudi i životinja, pri čemu su testisi naročito osetljivi (Brzóška i sar., 2013; Kojima i sar., 1993; Al-Bader i sar., 1999). Dizajnom ove studije pokušali smo da evaluiramo štetne efekte na testise kojima su izloženi alkoholičari i/ili pušači, izdvajajući Cd kao izuzetno toksičnu komponentu duvanskog dima. Takođe smo hteli da ispitamo da li DSF, lek koji se koristi u averzivnoj terapiji alkoholizma, pre svega zbog strukture metabolita i helirajućih svojstava, može pokazati protektivno dejstvo na testise pacova prethodno izloženih etanolu i/ili Cd. Za evaluaciju toksičnih efekata mereni su parametri OS i sadržaj bioelemenata u homogenatima testisa, koncentracija testosterona u plazmi i testisima, i analizirane su histološke promene izazvane ovim tretmanima. U studiji su ispitivani štetni efekti Cd na testise pri akutoj, subakutnoj i subhroničnoj ekspoziciji, kao i štetni efekti etanola na ove organe pri akutnoj i subakutnoj ekspoziciji, odnosno štetni efekti pri akutnoj i subakutnoj koekspoziciji Cd i etanolu. Da bismo ispitali uticaj DSF na štetne efekte etanola u testisima, DSF smo aplikovali pacovima, prethodno izloženim etanolu, pri čemu je dalji unos etanola prekinut. Kako su alkoholičari-pušači na terapiji DSF izloženi udruženom unosu Cd i DSF, čak je pušenje učestalije pa je izloženost Cd veća, pacovima koji su prethodno izloženi Cd uveli smo DSF uz nastavak unosa Cd. Za ispitivanje uticaja DSF na štetne efekte usled udružene izloženosti Cd i etanolu u testisima, DSF je aplikovan pacovima koji su prethodno izloženi Cd i etanolu, pri čemu je unos etanola prekinut dok se sa primenom Cd nastavilo u toku tretmana, pošto takav scenario odgovara alkoholičarima-pušačima na terapiji DSF.

Odabirom odgovarajućih puteva unosa Cd, etanola i DSF pokušali smo da imitiramo realne uslove kojima su izloženi alkoholičari i/ili pušači bez i sa DSF, kao terapijom. Kako nismo bili u mogućnosti da sprovedemo inhalacionu studiju na pacovima, koja bi imitirala unos Cd putem duvanskog dima, Cd smo aplikovali *i.p.*, pošto je Cd nakon *i.p.* i inhalacione aplikacije dostupan u cirkulaciji nakon gotovo istog vremena.

Ustanovljeno je da pušenje u izvesnoj meri deluje štetno na spermatogenezu (Marinelli i sar., 2004). Studija Vine i saradnika (1996) ukazuje na povezanost pušenja sa blagim smanjenjem koncentracije, pokretljivosti i morfologije spermatozoida. Ovi efekti su ograničeni na zdravu

populaciju muškaraca i nestaju kada se uključe neplodni pojedinci. Premda je jedna studija pokazala da je neplodnost mnogo češća kod parova koji puše (Guzick i sar., 2001), izgleda da pušenje ima malo uticaja na mušku plodnost (Bolumar i sar., 1996). Dokazana je povezanost pušenja budućih očeva sa urođenim anomalijama i pojavom raka kod dece (Ji i sar., 1997), ali se još uvek raspravlja o mutagenosti spermatogeneze kod pušača (Zenzes i sar., 1999).

Nažalost, nisu ispitani efekti udružene ekspozicije alkoholu i duvanu na muške reproduktivne organe. Nesumnjivo je da su ovakve studije neophodne, s obzirom da je u realnosti najčešće da su alkoholičari ujedno i pušači, kao i to da je potrebno detaljnije ispitati efekte terapije DSF na funkciju muških reproduktivnih organa. Kompleksnost ovakvih humanih studija sagledana je u činjenici da one treba da razmotre uticaj brojnih faktori na ishod dobijenih rezultata (neplodnost kod muškaraca), a to su: dužina alkoholičarskog i/ili pušačkog staža, stepen narušenosti zdravlja pojedinca, komorbiditeti, druga (hronična) terapija, broj učesnika u studijama, itd.

5.1. UTICAJ INDIVIDUALNE SUBAKUTNE IZLOŽENOSTI ETANOLU NA STATUS BIOELEMENATA, OKSIDATIVNI STRES, TESTOSTERONA I MORFOLOŠKE PROMENE U TESTISIMA PACOVA

Prema istraživanju Chia i saradnika oko 42 % muškaraca sa problemom neplodnosti, konzumira alkohol (Chia i sar., 2000), što ukazuje na mogućnost da je značajan faktor neplodnosti kod muške populacije. Pored toga postoje studije koje ukazuju na povezanost između konzumiranja alkohola i smanjenog nivoa testosterona (Maneesh i sar., 2006; Dosumu i sar., 2012). Uticaj alkohola na morfologiju spermatozoida nije proučavan, iako postoje dokazi da ispoljava toksični efekat na polne ćelije, te može uticati na plodnost kod muškaraca (Curtis i sar., 1997). S druge strane malobrojni podaci ukazuju na očigledni protektivni efekat umerenog konzumiranja alkohola na parametre spermatogeneze, verovatno zbog antioksidativnog dejstva nekih alkoholnih pića (Augustyniak i sar., 2005).

Nedostatak Zn je odavno poznat problem koji se javlja kod alkoholičara (Craig i sar., 1983). Smanjene koncentracije Zn u testisima nakon subakutne izloženosti etanolu (*Grafik 3*) je u skladu sa studijom Morawska i saradnika o hroničnim teškim alkoholičarima, koji su u poređenju sa zdravim ispitanicima pokazali smanjen nivo Zn za preko 25 % u serumu (Morawska i sar., 2003). Pacovi koji su dobijali hranu sa nedostatkom Zn pokazali su smanjenje testikularnog

antioksidativnog potencijala i posledično povećanje LPO u ovom tkivu (Nair i sar., 2005). Veće potrebe za Zn u testisima odraslih ljudi su povezane i sa funkcijom prostate tako da je održavanje homeostaze Zn u testisima od velikog značaja za normalno funkcionisanje reproduktivnog sistema. Deficit Zn remeti aktivnost angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE), što vodi smanjenju nivoa testosterona i inhibiciji spermatogeneze. Defekti kod spermatozoida su česti kod pacova kod kojih su zabeleženi smanjeni nivoi Zn (Bedwal i Behuguna, 1994). Kako Zn lako reaguje sa –SH grupama amino kiselina i proteina, njegovo smanjenje može odgovarati i smanjenju GSH (Bonda i sar., 2004).

Rezultati naše studije pokazuju da subakutno izlaganje etanolu povećava nivo Fe u testisima kod tretiranih pacova (*Grafik 1, Tabela 2*). Porast sadržaja Fe verovatno nastaje zbog mobilizacije Fe iz feritina prilikom metabolizma alkohola dejstvom ADH, i dalje, acetaldehida dejstvom alkoholne oksidaze, pri čemu se generiše $O_2^{\cdot-}$ koji zapravo mobilise Fe (Shaw i Jayatilleke, 1990). Gvožđe katalizuje redoks reakcije između O_2 i bioloških molekula, i time učestvuje u inicijaciji LPO (Stohs i Bagchi, 1995) što i naši rezultati potvrđuju (*Grafik 6*). S jedne strane Fe učestvujući u Fentonovoj reakciji potencira nastajanje $\cdot OH$ radikala, a s druge strane ubrzava dekompoziciju lipidnih peroksida što rezultira nastankom peroksil i alkoksil radikala koji mogu odvajati vodonikove atome iz molekula i pokrenuti proces LPO (Nordmann i sar., 1990). Visoka koncentracija Fe utiče na broj, pokretljivost i morfologiju spermatozoida (Marzec-Wróblewska i sar., 2012). Skorija ispitivanja pokazuju da Fe vezano za GSH odgovara citozolnom depou Fe (Hider i Kong, 2013). Međutim, (Fe-S) klasteri (neorganske prostetičke grupe) mogu biti vezani za GSH iz cisteinskih rezidua glutaredoksina, važne oksidoreduktaze pronađene u svim oblicima živih organizama (uključene u redukciju glutationil ostataka proteina, regulaciju homeostaze Fe, reparaciju Fe-S klastera i odgovoru ćelije na oksidativne signale) (Hider i Kong, 2013). Kao sastavni delovi mitohondrijalnih membrana Fe-S proteini regulišu respiratorni transport elektrona i od suštinskog su značaja za aktivnost enzima (Schilke i sar., 1999). *In vitro* studija na *S. cerevisiae* ISC mutantima pokazala je vezu između povećanog stvaranja ROS (u toku procesa fermentacije) i oslobađanja Fe iz enzima koji sadrže Fe-S na nivou ćelija i mitohondrija (Pérez-Gallardo i sar., 2013). U našem eksperimentu je takođe potvrđen pro-oksidativni efekat etanola, merenjem $O_2^{\cdot-}$, koji je povišen za 195% (*Grafik 5, Tabela 3*). Nakon dizmutacije $O_2^{\cdot-}$ preko SOD, dolazi do stvaranja H_2O_2 . Prekomerno stvaranje

ROS može biti na račun Fentonove reakcije u kojoj Fe^{2+} reaguje sa H_2O_2 i proizvodi štetne HO^\bullet radikale.

Subakuta administracija alkohola nije pokazala statistički značajan uticaj na koncentraciju Cu i Mg u testisima pacova (*Grafici 2, 4*). Tek hronična izloženost etanolu praćena anoreksijom i malapsorpcijom dovodi do smanjenja koncentracije većeg broja bioelemenata i vitamina (Gonzalez-Reimers i sar., 1998). U našoj studiji ekspozicija etanolu je nedovoljno trajala da bi narušila homeostatske mehanizme kontrole ovih bioelemenata, upućujući na očuvan odnos procesa resorpcije, odnosno eliminacije, koji se odrazio i na testisima. Subakutno izlaganje etanolu neznatno smanjuje (statistički nije značajno) koncentraciju Cu u testisima pacova (*Grafik 2, 8.1. Prilog - Tabela 3*). U skladu sa literaturnim podacima, dobijeni rezultati mogu biti povezani sa smanjenom specifičnom aktivnošću ceruloplazmina (Cu-transportnog proteina, 95% Cu je vezano za ovaj protein) kod bolesnika sa steatozom jetre kao posledicom alkoholizma, uprkos normalnim nivoima apoceruloplasmina (Uhlíkova i sar., 2008).

Prethodne studije su pokazale da prekomerni unos alkohola dovodi do nastanka OS i oštećenja testisa (Maneesh i sar., 2005; Taati i sar., 2011), što je u skladu sa našim rezultatima. Subakutna izloženost etanolu prouzrokovala je smanjenje aktivnosti tSOD (*Grafik 7, 8.2. Prilog - Tabela 3*) i očekivano povećano stvaranje $\text{O}_2^{\bullet-}$ (*Grafik 5, 8.2. Prilog - Tabela 1*). Superoksid dizmutaza je antioksidativni enzim koji vrši brzu konverziju $\text{O}_2^{\bullet-}$ u H_2O_2 , sprečavajući učešće $\text{O}_2^{\bullet-}$ u formiranju mnogo štetnijih radikla, kao što je HO^\bullet .

Imajući u vidu značaj SOD u odbrani testisa od OS, nije iznenađujuće da testisi sadrže sve tri izoforme ovog enzima, a proizvode ih Sertolijeve i germinativne ćelije. Postoje neki dokazi da germinativne ćelije mogu da stimulišu lučenje ecSOD iz Sertolijevih ćelija delovanjem citokina poput interleukina-1 α (Mruk i sar., 2002). Važnost citozolne SOD1 izoforme u testisima istaknut je u nedavnoj studiji na *SOD1-knockout* miševima koji su podvrgnuti testikularnom toplotnom stresu (Ischi i sar., 2005). Ovaj tretman je povećao oštećenja na molekulu DNK i curenje citohroma C iz mitohondrija u germinativnim ćelijama *SOD1-knockout* u odnosu na kontrolnu grupu (*eng. wild type*). Slično, važnost SOD2 izoforme u kontroli curenja $\text{O}_2^{\bullet-}$ iz mitohondrija u testisima je istakao i podatak da je sadržaj mRNK za ovaj izoenzim viši u testisima nego u jetri, za razliku od GPx i CAT (Gu i Hecht, 1996). Osim toga, nivoi mRNK za SOD2 su razvojno i

translatorno regulisani maksimalnom ekspresijom u ranoj post-mejozi germinativnih ćelija (Gu i Hecht, 1996).

Smanjena aktivnost SOD usled subakutne ekspozicije etanolu je u saglasnosti sa prethodnim publikacijama (Schlorff i sar., 1999; Nordmann i sar., 1990). Neki autori su pokazali prvo porast nakon 4 nedelje, a kasnije smanjenje aktivnosti SOD nakon 16 nedelja što bi se moglo dovesti u vezu sa razlikama u primenjenim dozama i trajanju ekspozicije (Oremosu i Akang, 2014). Pošto smo mi registrovali smanjenje nivoa Zn u testisima (*Grafik 3*), konstituenta ecSOD, smanjena aktivnost SOD se može objasniti i deficitom ovog esencijalnog metala.

Povećan sadržaj $O_2^{\bullet-}$ koji se javlja nakon 21 dana ekspozicije etanolu (*Grafik 5, Tabela 3*) je u skladu sa inhibicijom SOD. Povećana produkcija i smanjena sekvestracija $O_2^{\bullet-}$ usled inhibicije tSOD dovode do višestrukog porasta nivoa $O_2^{\bullet-}$ u testisima. Etanol indukuje enzim P450IIE1 koji redukuje molekul O_2 u $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 . Povećana produkcija ROS i SR pri oksidaciji etanola oštećuje mikrozomalne strukture. Hidroksilni radikali, nastali u Fentonovoj reakciji između Fe i H_2O_2 su jaki oksidujućii agensi koji A dalje oksiduju do 1-hidroksietil radikala ($\dot{O}H$ odvaja atom H od C1 atoma u molekulu etanola) (Wu i Cederbaum, 2002). Prilikom oksidacije A nastaju i 2-hidroksietil radikal i etoksil radikal, dok oksidacijom acetaldehida nastaje acetil radikal (Nordmann i sar., 1990). Povećan odnos NADH/NAD⁺ kod akutne/subakutne ekspozicije etanolu takođe doprinosi generisanju $O_2^{\bullet-}$ povećavajući protok elektrona duž respiratornog lanca. Nastali NADH se oksiduje u mitohondrijama putem oksidativne fosforilacije što zahteva dalju potrošnju O_2 . Kako bi obezbedilo dovoljno O_2 za prihvatanje elektrona sa NADH, ćelije povećavaju njegovo preuzimanje iz krvi.

Različiti autori su pokazali da akutna i hronična izloženost etanolu bilo da se aplikuje *per os* ili *i.p.* vodi ka formiranju SR i lipidnih peroksida u testisima (Schlorff i sar, 1999; Lieber, 2005; Olufunke i sar, 2012). Neke studije su pokazale da prekomerno generisanje SR i ROS zajedno sa LPO mogu biti značajan mehanizam toksičnosti alkohola u testisima (Aitken i sar., 1994; Peltola i sar., 1996; Oner-Iyidogan i sar., 2001). Nastale ROS su toksične za ćelije budući da reaguju sa makromolekulama - inaktiviraju enzime i denaturišu proteine, te uzrokuju oštećenje DNK (raskidaju veze ili modifikuju/uklanjaju baze) što može rezultirati mutacijama. Uzrokujući peroksidaciju lipida dovode do oštećenja membrana, pri čemu nastaju reaktivni aldehidni produkti kao što su MDA i 4- hidroksinonenal (Dey i Cederbaum, 2006). Rezultati naše studije

su potvrdili da subakutna izloženost etanolu dovodi do porasta nivoa MDA u testisima (*Tabela 3, Grafik 6, 8.2. Prilog – Tabela 2*), što potvrđuje nalaze prethodnih studija da je nastanak LPO jedan od mehanizama toksičnosti alkohola u testisima (Aitken i sar., 1994; Peltola i sar., 1996).

U prilog nastanka LPO ide i zabeleženo smanjenje aktivnosti GST u testisima nakon 21 dana izloženosti etanolu (*Grafik 9*). Kako GST katalizuje tiolizaciju krajnjih produkata LPO (reaktivne intermedijere i lipidne aldehide) i konverziju u ROOH, smanjenje aktivnosti GST dovodi do porasta LPO. Prethodne studije su zabeležile različite efekte na aktivnost GST kod akutne i subakutne ekspozicije etanolu u različitim organima, kako smanjenje (Nordmann i sar., 1990) tako i porast aktivnosti (Das i Vasudevan, 2005).

Oštećenje testisa indukovano unosom A, dovodi se u vezu kako sa povećanom produkcijom SR i nastankom LPO tako i sa smanjenjem aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, koje u našem slučaju predstavljaju enzimi SOD i GST.

Naši rezultati pokazuju da primena etanola u trajanju od 21 dana dovodi do smanjenja koncentracije testosterona u plazmi i testisima (*Tabela 4*) i pokreće značajne morfološke promene. Prema rezultatima studije Emanuele i Emanuele iz 2001. godine, nivo gonadotropnih hormona je smanjen kod životinja koje su primale etanol u različitim vremenskim intervalima (Emanuele i Emanuele, 2001). U drugoj studiji, Shi i saradnici (1998) su dokazali da *i.p.* pojedinačna primena A u dozi od 1 ml/80 g, 30% v/v, dovodi do smanjenja ovih hormona kod tretiranih životinja (Shi i sar., 1998). Uygur je sa saradnicima (2013) dokazao smanjen nivo testosterona kod mužjaka pacova tretiranih 8 nedelja etanolom *per os* (3 g/kg, 40% v/v). Histološke promene u testisima, poput prisustva nezrelih germinativnih ćelija u lumenu, acidofilnih ćelija i vakuolizacije, kod životinja tretiranih etanolom mogu biti izazvane direktno njegovim delovanjem na germinativne ćelije, jer ulazi u interakciju sa konstituentima ćeliske membrane menjajući joj propustljivost, ili indirektno delovanjem nastalih produkata LPO (Abarikwu i sar., 2016). Patohistološki nalaz u našoj studiji pokazuje da je mikroarhitektura tkiva testisa potpuno izgubila svoj morfološki integritet (*Slika 1*). Na mikrografiji su prisutni acelularni prostori uklopljeni u amorfnu blede-eozinofilnu supstancu. Naši podaci su konzistentni sa nekim ranijim studijama koje su zabeležile degeneraciju, dezorganizaciju, atrofiju i vakuolizaciju tkiva testisa nakon ekspozicije etanolu (Glauca i sar., 2015; Uygur i sar., 2013). Međutim, ima i oprečnih istraživanja u kojima nisu zabeležene morfološke promene u testisima nakon

izloženosti etanolu (Oliva i sar., 2006). Protivrečnosti u rezultatima se mogu objasniti razlikama u primenjenim dozama, putu unosa i dužini ekspozicije etanolu.

5.2. UTICAJ SUBHRONIČNE IZLOŽENOSTI KADMIJUMU NA STATUS BIOELEMENATA, OKSIDATIVNI STRES, TESTOSTERONA I MORFOLOŠKE PROMENE U TESTISIMA PACOVA

Ranije studije na životinjama, kao i humane studije, su pokazale da je muški reproduktivni sistem izuzetno osetljiv na toksičnost Cd (Thompson i Bannigan, 2008; Mohamed i sar., 2014). Rezultati naše studije pokazuju da ponovljeno *i.p.* aplikovanje CdCl₂ (1 mg/kg/dan) u trajanju od 42 dana uzrokuje poremećaj redoks homeostaze, smanjuje relativnu masu testisa, koncentraciju testosterona u plazmi i izaziva teške morfološke promene na testisima tretiranih pacova.

Kako mehanizmi reproduktivne toksičnosti Cd nisu tačno ustanovljeni (Gupta i sar., 2004; Casalino i sar., 2000; Francielli i sar., 2004; Ognjanovic i sar., 2010; Spiazzi i sar., 2013; Yadav i Khandelwal, 2008) ovom studijom smo pokušali da razjasnimo precizne mehanizme toksičnosti Cd, fokusirajući se na oksidativni, metalni i androgeni status u testisima tretiranih pacova. Demonstrirali smo da *i.p.* administracija 1 mg CdCl₂/kg/dan kod mužjaka pacova dovodi do trenutnog deponovanja Cd u testisima (8.1. Prilog - Tabela 1). Uočene su promene u statusima bioelemenata već posle 10 dana izloženosti Cd (koncentracije Zn su smanjene, dok je sadržaj Cu and Fe povećan) (Tabela 5, Grafici 1-3, 8.1. Prilog - Tabele 2-4.). Takođe je došlo do trenutnog razvoja OS u testisima, što je dokumentovano trenutnim smanjenjem aktivnosti tSOD i povećanim stvaranjem O₂^{•-} (zabeležene još od prvog dana izloženosti Cd) (Tabela 6, Grafici 5, 7, 8.2. Prilog - Tabele 1, 3). Kadmijum je doveo do smanjenja aktivnosti CAT, GST i GR (Grafici 8-10) i povećanja GSSG/GSH odnosa i LPO (povećanje nivoa MDA) (Grafik 6, 13, Tabela 6). Smanjenje koncentracije testosterona u plazmi i testisima (Tabela 7) zajedno sa makroskopskim i mikroskopskim promenama u testisima (edematozne semiferne tubule sa uništenim germinativnim slojem i nepravilnim rasporedom spermatogenih ćelija) potvrdili su odsustvo spermatogeneze (Slika 2).

Fokusirajući se na rastući zdravstveni rizik kod pušača i radnika koji svakodnevno profesionalno udišu isparenja Cd, izazov nam je bio da imitiramo inhalacioni put unosa Cd. Zbog nemogućnosti sprovođenja inhalacione studije koju su 1998. godine izveli Honma i Suda (Honma and Suda, 1998) poredeći letalne doze industrijskih hemikalija aplikovanih *i.p.* i

ihalaciono, u našem istraživanju Cd je aplikovan *i.p.* mužjacima pacova. Prema njihovim saznanjima očekivana brzina ulaska Cd u krvotok je gotovo ista nakon *i.p.* i inhalacionog puta unosa što se vidi iz uspostavljenih koeficijenata korelacije za ova dva puta unosa (r : 0.78–0.9) (Honma and Suda, 1998). Izabrani *i.p.* put unosa toksične doze 1 mg CdCl₂/kg/dan tokom 21, odnosno 42 dana je u skladu sa literaturnim podacima (Nigam i sar., 1999; Shaikh i sar., 1999; Nagamine i sar., 2007).

Kadmijum reaguje sa metal-vezujućim mestima i/ili funkcionalnim grupama (–SH) proteina menjajući homeostazu esencijalnih bioelemenata u raznim organima, uključujući i testise (Djukic-Cosic i sar., 2006; Brzóška i sar., 2002; Brzóška i Moniuszko-Jakoniuk, 2001; Moulis, 2010). Prema našim rezultatima, Cd se u testisima pojavljuje nakon prvog dana od početka izloženosti ulazeći u ćelije najverovatnije preko Zn transportera (8.1. Prilog - Tabela 1) (Djukic-Cosic i sar., 2006). Do značajanog smanjenja koncentracije Zn i porasta Fe i Cu (Grafici 1-3, 8.1. Prilog - Tabele 2-4) u testisima dolazi postepeno nakon 10 dana od početka izlaganja Cd. Akumulacija Cd u ćeliji je pretežno vezana za citozol (70%) gde se Cd vezuje za –SH grupe proteina, uključujući i MT. Kadmijum se u znatno manjoj meri deponuje i u nukleusu (15%) reagujući sa nukleinskim kiselinama, dok se u membranama vezuje za membranske fosfolipide (Szuster-Ciesielska i sar., 2000; Casalino i sar., 2002).

Brojne studije ukazuju na različite funkcije MT, od rezistencije na hemoterapiju u ćelijama tumora do neuroprotekcije (Chung i West, 2004; Theocharis i sar., 2004). Metalotioneini su članovi familije proteina niske molekularne težine bogatih cisteinom i do sada su identifikovane ukupno četiri izoforme MT (I-IV). Metalotioneini mogu da vežu različite metalne jone, ali su fiziološki Zn(II), Cd(II) i Cu(I) najvažniji vezujući joni. Studije o MT su uglavnom fokusirane na njihovu sposobnost vezivanja za metale (kao što je Cd) i pokazano je da izoforme MT-I i MT-II smanjuju toksičnost Cd u ćelijama. Poznato je da Cd uz ostale fiziološke i patološke faktore, odnosno uslove u cilju sprečavanja toksičnosti teških metala, indukuje ekspresiju MT-I i MT-II izoforme u različitim organima, kao što su jetra i bubreg (Klaassen i sar., 1999). Pošto su testisi veoma osetljivi na toksičnost Cd, postavlja se pitanje da li se u ovom organu vrši dovoljna ekspresija MT radi zaštite od teških metala.

Kod glodara su MT-I/II lokalizovani na spermatogenim i Sertolijevim ćelijama (Nishimura i sar., 1990; De i sar., 1991; Tohyama i sar., 1994; Suzuki i sar., 1998; Kusakabe i sar., 2008), kao

i u intersticijalnim ćelijama, iako postoje neka neslaganja u pogledu njihove precizne ćelijske distribucije (Danielson i sar., 1982; McKenna i sar., 1996; Ren i sar., 2003a; Kusakabe i sar., 2008). Pod normalnim uslovima u stanju ravnoteže, nivoi MT-I/II u testisima glodara su veći nego u drugim organima (De i sar., 1991; Salehi-Ashtiani i sar., 1993; Suzuki i sar., 1998). Dobro je poznato da tretman Cd izaziva ekspresiju MT-I/II u nekim tkivima, ali se stabilni nivoi MT-I/II ne javljaju u dovoljnoj meri u testisima. Takođe, postoje kontradiktorni rezultati u literaturi o njihovim odgovorima na tretman Cd (McKenna i sar., 1996; Zhou i sar., 1999; Ren i sar., 2003a,b; Kusakabe i sar., 2008). Takve razlike se mogu pripisati razlikama u eksperimentalnom dizajnu i/ili izmenjenim uslovima u ovim studijama, kao i koncentracijama Cd koje nisu identične. Razlike se mogu pripisati različitim vremenima sakupljanja uzoraka nakon tretmana, različitim antitelima korišćenim za različite testove koja su dobijena iz različitih izvora sa drugačijim specifičnostima, kao i činjenicom da su u nekim slučajevima nivoi mRNA za MT-I/II ispitivani pošto su njihovi proteini kvantifikovani u drugim studijama. Ipak, važno je napomenuti da se toksični efekti Cd u testisima ne mogu smanjiti kod MT-I transgenih miševa, iako je ekspresija MT-I kod ovih životinja bila 5,2 puta u odnosu na *wild type* (Dalton i sar., 1996). Stoga, visoka osetljivost testisa na toksičnost Cd možda nije u potpunosti povezana sa nivoima MT-I/II (Liu i sar., 2001). Ostaje nejasno zašto je u testisima visok bazalni nivo MT-I/II u odnosu na druge organe (npr. jetre), iako se ne uklanjaju teški metali.

Prema literaturnim podacima, smanjeni nivoi Zn u testisima (*Grafik 3, Tabela 5*) mogu se objasniti indukcijom prekomerne ekspresije MT-1 gena u jetri i bubrezima, ali ne i u testisima (i prostati) usled izloženosti Cd; kao i afinitetom Cd da zameni Zn iz Zn-MT1 kompleksa (koji se smatra glavnim regulatorom Zn) (Bonda i sar., 2004; Freisinger i Vašák, 2013). Ovakve okolnosti mogu imati negativne implikacije na spermatogenezu (Nigam i sar., 1999; Shaikh i sar., 1999; Nagamine i sar., 2007; Jozefczak i sar., 2012).

Postepeni rast testikularnog Fe (*8.1. Prilog - Tabela 2*) se može objasniti hemoragijskom inflamacijom u tkivu testisa koje se smatraju glavnim karakteristikama i kod akutne i kod hronične izloženosti Cd (Thompson i Bannigan, 2008) i koje su u našoj studiji potvrđene histopatološkim nalazom (*Slika 2*). Neke od studija ukazuju da sadržaj Fe, pre svega dvovalentnog jonskog oblika, raste zbog mogućnosti njegove zamene sa Cd u različitim membranskim i citoplazmatskim proteinima (ferritin i Fe-S klasteri u Fe-S proteinima) (Maret i Wedd, 2014). Neke ranije studije povezuju $O_2^{\bullet-}$ i Fe, ističući sposobnost $O_2^{\bullet-}$ da oksiduje $[4 Fe-$

4S] klastere dehidrataza, što dovodi do oslobađanja Fe. Slobodno Fe, koje se održava u redukovanom obliku od strane redukcionih sredstava, dalje redukuje hidroperokside do hidroksil i alkoksil radikala u Fentonovoj reakciji. Prema našim rezultatima Cd drastično povećava stvaranje $O_2^{\cdot-}$ (*Grafik 5*), koji dalje vodi ka povećanju koncentracije Fe. U takvom okruženju, Fe podstiče produkciju ROS, što doprinosi nastanku OS u testisima (Kini i sar., 2011). Pored učestvovanja u Fentonovoj reakciji Fe katalizuje redoks reakcije između O_2 i bioloških molekula i inicira LPO (Stohs i Bagchi, 1995), koja je potvrđena i našom studijom (*Grafik 6, Tabela 6*). Dakle, povećana koncentracija Fe, dodatno potencira toksičnost Cd, putem Fentonove reakcije pri čemu nastaju OH radikali i stimuliše se proces LPO (Nordmann i sar., 1990).

Tretman Cd kao ni alkohola nije doveo do promena u homeostazi Mg u testisima, što potvrđuje snažan kapacitet Mg u održavanju homeostaze (Maret i Wedd, 2014). Razumevanje homeostaze Mg u eukariotskim ćelijama je i dalje nepotpuno iz raznih konceptualnih i metodoloških razloga. Apsolutna zastupljenost ćelijskog Mg (ukupnog i slobodnog), njegov spor promet preko bioloških membrana i relativno male fluktuacije slobodnog $[Mg^{2+}]$ u citoplazmi posle metaboličkih i fizioloških stimulansa, su dovela do pretpostavke ogromne održivosti ćelijske homeostaze Mg (Romani, 2014).

Produženo izlaganje Cd, koji se akumulira u testisima (*8.1. Prilog - Tabela 1*), stvara $O_2^{\cdot-}$, povećava nivoe MDA i generalno oštećuje antioksidativni neenzimski sistem odbrane (smanjuje GSH i povećava GSSG). U skladu sa literaturom su i naši rezultati koji su potvrdili da Cd uzrokuje smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima zaštite tSOD, CAT, GST i GR sa vremenom, u testisima izloženih pacova (*Tabela 6, Grafici 5-13, 8.2. Prilog - Tabele 1-9*). Kadmijum najverovatnije inhibira ove enzime putem kompeticije/interakcije sa bioelementima (Zn, Cu, Fe itd.) vezujući se za metal-vezujuća mesta i/ili -SH grupe (kao kod GST) pomenutih enzima, dovodeći do smanjenja njihove aktivnosti (Spiazzi i sar., 2013; Laskey i Phelps, 1991; Djukic i sar., 2012). Samim tim neadekvatno uklanjanje SR je posledica smanjene aktivnosti antioksidativnih enzima. Povećane koncentracije SR konačno vode ka oksidativnim oštećenjima svih klasa biomolekula, uključujući i same antioksidativne enzime.

Mnoge studije o toksičnosti Cd na reprodukciju kod muškaraca ukazuju na OS kao važan uzrok patoloških promena (Ognjanovic i sar., 2010; Spiazzi i sar., 2013). Uprkos niskom sadržaju O_2 koja karakteriše tkivo testisa, ono ostaje osetljivo na OS zbog prisustva visokog

sadržaja nezasićenih masnih kiselina i potencijalnih sistema za stvaranje ROS (Aitken i Roman, 2008).

Kao prelazni metal, Cd je uključen u reakcije slične Fentonovoj doprinoseći razvoju OS jer učestvuje u formiranju najpotentnijeg i najštetnijeg HO[•]. Jednom nastali, HO[•] trenutno pokreće lančanu reakciju radikalskog tipa, uništavajući sve tipove biomolekula kao što su lipidi, proteini i DNK (Kini i sar., 2011).

Uloga antioksidativnih enzima je veoma važna kod OS indukovanog Cd. Osnovni enzimi uključeni u održavanje nivoa ROS u organizmima koji se koriste kao biomarkeri stvaranja ROS su CAT i SOD (Wei i sar., 2011; Cheng i sar., 2011). Superoksidni anjon radikal, čiju razgradnju katalizuje SOD, se može stvarati posebnim enzimima, kao što su ksantin i NADPH oksidaza, ili kao nusproizvod ćelijskog metabolizma, posebno mitohondrijalnog transportnog lanca elektrona. Pored direktne oksidacije reduktanata niske molekulske težine i inaktivacije određenih enzima, reakcija O₂^{•-} sa NO dovodi do stvaranja visoko toksičnog oksidanta, peroksinitritnog anjona, ONOO⁻ (Aitken i Roman, 2008). U našoj studiji je opisano smanjenje nivoa tSOD u testisima nakon dužeg izlaganja Cd, sa pratećim povećanjem koncentracije O₂^{•-} od prvog dana izlaganja Cd, što direktno ukazuje na brz razvoj OS (*Grafici 5,7, 8.2. Prilog - Tabela 1,3*). Obe izoforme SOD (Cu/Zn-SOD i Mn/Zn-SOD) katalizuju dizmutaciju O₂^{•-} do H₂O₂ i O₂. Toksični efekat Cd na aktivnost tSOD može nastati iz interakcije Cd sa Zn, Cu ili Mn (Ognjanovic i sar., 2010; Djukic i sar., 2012, 2008).

Naši rezultati ukazuju da *i.p.* izloženost pacova Cd rezultira značajnim porastom LPO u testisima nakon 21 i 42 dana (*Grafik 6*). Razlog za ovaj odloženi efekat se može objasniti činjenicom da proizvodnja O₂^{•-} nije dovoljno potentna da izazove LPO (Djukic i sar., 2008) za razliku od HO[•]. Postepena inhibicija SOD vodi ka smanjenju proizvodnje H₂O₂, tako da naknadno nedovoljna proizvodnja HO[•] kroz Fentonovu reakciju nije dovoljno jak okidač za pokretanje LPO. Objavljeni rezultati koji govore o LPO kao osnovi za oštećenja ćelija kod izloženosti Cd su kontraverzni. Neki autori ukazuju da mnogi toksični događaji prethode LPO (Casalino i sar., 2000).

Katalaza metaboliše perokside, naročito H₂O₂, štiteći ćelijske membrane i ćelijske proteine i DNK od LPO. U prethodnim studijama koje su se bavile istraživanjem toksičnosti Cd na testisima pokazani su suprotni rezultati. U nekim studijama Cd je doveo do pada aktivnosti CAT

(Ognjanović i sar., 2010; Spiazzi i sar., 2013), dok je u drugim došlo do povećanja aktivnosti CAT nakon izlaganja Cd (Dzobo i sar., 2013). U našoj studiji je aktivnost CAT smanjena u grupama sa Cd (Cd₂₁ i Cd₄₂) u odnosu na kontrolu (*Grafik 8*). Smanjena aktivnost CAT može se objasniti redukovanom koncentracijom H₂O₂ (substrat za CAT) usled: a) neadekvatne konverzije O₂^{•-} u H₂O₂ (usled inhibicije SOD) (*Grafik 7*); i b) smanjenja nivoa H₂O₂ putem Fentonove reakcije (Ognjanovic i sar., 2010; Djukic i sar., 2008, 2012; Valko i sar., 2005). Akumuliranjem H₂O₂ javlja se mogućnost njegovog homolitičkog cepanja u HO[•], koji inicira LPO. Zabeleženi povećani nivoi Fe i Cu (*Grafici 1,2*) doprinose formiranju HO[•] kroz Fentonovu reakciju, što objašnjava razvoj LPO (Djukic i sar., 2012).

Kadmijum ima visoki afinitet vezivanja za –SH grupe antioksidativnih enzima, u odnosu na druge metale, i/ili može da zameni metalne kofaktore iz svojih aktivnih mesta, pretvarajući ove enzime u neaktivne oblike (Casalino i sar., 2000; Leverrier i sar., 2007; Thevenod, 2009). Skorašnja *in vivo* studija Wang i saradnika iz 2015. godine o molekularnim mehanizmima promena aktivnosti CAT i SOD indukovanih Cd, korišćenjem izotermalne titracione kalorimetrije, pokazala je da Cd izaziva promene u sekundarnoj strukturi CAT i SOD i dovodi do enzimskog "rasklapanja". Njihova molekularna *docking* studija pokazuje da Cd ometa širenje supstrata u aktivni centar CAT interakcijom sa glavnim aminokiselinama unutar velikog kanala, dok se u SOD, Cd vezuje za prostor između dve subjedinice enzima (Wang i sar., 2015).

Prema našim rezultatima, produženo izlaganje pacova Cd značajno smanjuje aktivnost GST i GR, smanjuje GSH i povećava nivo GSSG u testisima, što dovodi do povećanja odnosa GSSG/GSH u odnosu na kontrolu (*Grafik 9-13, 8.2. Prilog - Tabela 5-9*).

Glutation-S-transferaza je citozolni enzim uključen u detoksikaciju velikog broja ksenobiotika (II faza metabolizma, konjugacija). Protektivni efekat GST ostvaruje tako što katalizuje konjugaciju toksičnih supstanci (uključujući i Cd) sa GSH (Spiazzi i sar., 2013). Međutim, GST katalizuje vezivanje GSH i produkata LPO (što vodi ka okončanju LPO). Povišena aktivnost GST dovodi do smanjenja zaliha GSH, što u isto vreme može da dovede do OS. Stoga, postepena inhibicija aktivnosti GST (od prvoga dana izloženosti Cd) (*Tabela 6, Grafik 9, 8.2. Prilog - Tabela 5*), može da se interpretira na dva suprotna načina: pozitivan – čuvanjem GSH (smanjeno trošenje GSH od strane GST) antioksidativni odbranbeni sistem je efikasniji; negativan – procesi koji zahtevaju aktivnost GST su onemogućeni (detoksikacija

teških metala, okončanje LPO, itd.). Odnos GSSG/GSH je značajno povećan nakon 21 i 42 dana izloženosti Cd (*Grafik 13*), što ukazuje na prevagu elektron-donor reakcija koje zahtevaju prisustvo GSH (koje katalizuju GR i GPx i koje oslikavaju ćelijski/tkivni antioksidativni kapacitet) u odnosu na reakcije u kojima GSH učestvuje kao helirajući/konjugujući agens (Harris i Hansen, 2012).

Važne komponente AOS ćelije su GSH i enzimi vezani za GSH. Redukovani glutation je najvažniji hidrofilni antioksidans u ćeliji, koji ima ključnu ulogu u odgovoru ćelije na oksidativno i nitrozativno oštećenje indukovano egzogenim i endogenim toksinima. Reaktivne kiseonične/azotne vrste se uklanjaju ne-enzimskom redukcijom sa GSH i/ili enzimskom degradacijom, u kojoj GSH obezbeđuje redukujuće ekvivalente za enzime uključene u ove procese (Jozefczak i sar., 2012). Glutacion je posebno efikasan u uklanjanju HO•, koji je od velikog značaja, jer ne postoji enzimska odbrana od ove vrste radikala. S druge strane, GSH ne reaguje direktno (ne-enzimski) sa hidroperoksidima. U stvari, njegova uloga kao ko-supstrata za Se GPx je najvažniji mehanizam redukcije H₂O₂ i lipidnih hidroperoksida. Štaviše, familija proteina nazvanih peroksiredoksini katalizuje redukciju H₂O₂ preko GSH i/ili drugih tiola, ali sa cisteinom u njegovom tiolatnom obliku, u njihova aktivna mesta bolje nego sa Se-cisteinom (Dickinson i Forman, 2002).

Dodatno, GSH učestvuje u metabolizmu ksenobiotika u fazi II reakcije detoksikacije. Konjugacija GSH sa elektrofilnim centrima ksenobiotika je uglavnom posredovana GST, super familijom enzima faze II detoksikacije (Aquilano i sar., 2014). Glutacion-S-transferaza štiti ćelije od endogenih i egzogenih uzročnika OS katalizom reakcije između nukleofilnog atoma sumpora u GSH i elektrofilne grupe toksičnog jedinjenja. Substrat se konjuguje za GSH ili se redukuje sa nastalim stvorenim GSSG. Oksidovani glutacion koji se odlikuje disulfidnom vezom između dva molekula GSH, efikasno se redukuje vraćanjem u GSH preko GR. Glutacion reduktaza normalno održava ukupan depo glutaciona u pretežno redukovanom stanju. Povećani nivoi OS mogu značajno smanjiti nivo GSH u korist GSSG, uglavnom zbog niske aktivnosti GR.

Glutacion formira komplekse sa Cd preko slobodnih –SH grupa, čime menja distribuciju i izlučivanje Cd (Griffith, 1999; Singhal i sar., 1987; Rana i Verma, 1996). Poznato je da se nivo GSH smanjuje u tkivima izloženim Cd, kao i kompleks koji je formiran između Cd i GSH (Cd-GS) preko reakcije katalizovane GST (Singhal i sar., 1987; Casalino i sar., 2004).

Neposredna oksidacija i brza reaktivnost karakteristične za GSH određene su prisustvom slobodne –SH grupe, za razliku od disulfida koji su mnogo manje reaktivni od tiola. Sadržaj GSH unutar ćelije može biti povećan kao rezultat aktiviranih adaptivnih mehanizama usled razvoja OS, kroz povećanje sinteze GSH ili enzimske redukcije GSSG. Međutim, invazivan OS može da smanji nivo GSH zbog gubitka adaptivnih mehanizama i ošteti njegovo korišćenje kao redukujućeg ekvivalenta u glavnim enzimskim reakcijama i oksidaciji GSH u GSSG (Townsend i sar., 2003).

Postoji nekoliko mehanizama kojima Cd posreduje toksičnost u ćelijama. Kadmijum ispoljava svoje efekte preko fizičko-hemijskih svojstava jona Cd, odnosno njegove sličnosti sa Ca^{2+} (sličan jonski radijus) i Zn^{2+} (slična elektronska konfiguracija). Kao takav, Cd^{2+} verovatno može zameniti Ca^{2+} ili Zn^{2+} u ključnim fiziološkim procesima koji su posredovani ovim jonima, što rezultira u aktivaciji i/ili inhibiciji nekih signalnih puteva. Na primer, Cd može izazvati povećanje OS vezivanjem za –SH grupe proteina i potrošnjom GSH (Valko i sar., 2005). Nakon toga, OS može pokrenuti oštećenje DNK reparativnih mehanizama i indukciju ćelijske proliferacije, koja, dalje može dovesti do tumorogeneze (Beyersmann i Hechtenberg, 1997). Generalno, Cd indukovana toksičnost ćelije verovatno uključuje više signalnih puteva, zbog čega su testisi veoma često korišćeni kao model za istraživanje. Iako u testisima postoji ekspresija više antioksidativnih enzima, kao što su SOD, CAT i GPx koje sprečavaju nastanak OS, njihovi nivoi su znatno smanjeni nakon izlaganja Cd (Gupta i sar., 2004). Zbog toga je pretpostavljeno da antioksidativni agensi (enzimski i ne-enzimski) mogu sprečiti ili barem smanjiti toksičnost Cd u testisima. Kasnije studije sa supstancama koje imaju antioksidativne aktivnosti, kao što su vitamini C i E, Zn, Se i melatonin, takođe su pokazale da je OS povezan sa oštećenjem testisa indukovano Cd, jer ove supstance smanjuju i/ili sprečavaju kako OS, tako i oštećenja testisa indukovana Cd (Acharya i sar., 2008; Siu, 2009).

Rezultati naše studije su pokazali da subakutna i subhronična ekspozicija Cd smanjuje nivo testosterona u plazmi i testisima tretiranih pacova (*Tabela 7*), što je u skladu sa nedavno objavljenim studijama koje govore da Cd smanjuje produkciju testosterona, testikularni volumen, broj i pokretljivost spermatozoida (Pandya i sar., 2012; Ekhoye i sar., 2013). Smanjenje mase muškog polnog organa prepoznato je kao primarni pokazatelj mogućih izmena u androgenom statusu i može se pripisati nastanku apoptoze i nekroze tkiva testisa (Szuster-Ciesielska i sar., 2000). Zabeležene promene su u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na smanjenje

kvaliteta sperme, funkcije testisa i spermatogeneze u testisima pacova subakutno i subhronično izloženih Cd (*Slika 2*) (Ekhoje i sar., 2013; Ren i sar., 2012; Ola Mudathir i sar., 2008).

Poznato je da Cd oštećuje endokrini sistem tako što utiče na sintezu i/ili regulaciju nekih hormona (Henson i Chedrese, 2004; Darbre, 2006). Kadmijum reguliše ekspresiju androgenog receptora (AR), kao i aktivnost LNCaP ćelija (hormonski zavisna humana ćelijska linija kancera prostate) (Martin i sar., 2002). Kod mužjaka pacova je ustanovljeno da Cd značajno menja cirkulišuće nivoe nekoliko hormona (npr. testosterona, LH, FSH) (Lafuente i sar., 2004). Prethodne studije su pokazale da Cd smanjuje proizvodnju testosterona u izolovanim Lajdigovim ćelijama bez uticaja na njihovu vijabilnost (Laskey i Phelps, 1991), pokazujući da je steroidogeno oštećenje u ovim ćelijama verovatno početni cilj toksičnosti Cd kao endokrinog modulatora. Kadmijum takođe smanjuje steroidogeni akutni regulatorni protein (StAR), LH receptor i cAMP nivoe u testisima (Gunnarsson i sar., 2007). Kadmijum može menjati i nivo hormona preko ose: hipotalamus-hipofiza-testisi u različitim aspektima, ne samo preko njegovih efekata na Lajdigove ćelije. Na primer, Cd utiče ne cirkadijalni način oslobađanja noradrenalina, regulaciju hipotalamičke sekrecije hormona, što rezultira promenama u dnevnom ritmu testosterona i LH nivoa u plazmi (Lafuente i sar., 2003). Pored toga, nivoi hipofiznih hormona u plazmi (npr. LH, FSH, prolaktin, ACTH) su takođe modifikovani nakon izlaganja Cd (Lafuente i sar., 2003). Ukratko, važno je napomenuti da će endokrini poremećaj izazvan Cd verovatno biti multi faktorijalni, posredovan njegovim efektima na Lajdigove ćelije i/ili osu: hipotalamus-hipofiza-testisi (Lafuente i sar., 2003).

Utvrđeno je da Cd smanjuje produkciju testosterona tako što smanjuje broj testikularnih receptora za LH, nivoe mRNK i cikličnog adenzin monofosfata kod pacova (Marettová i sar., 2015; Gunnarsson i sar., 2003). Smanjenje nivoa testosterona u testisima stimuliše oslobađanje gonadotropin oslobađajućeg hormona iz hipotalamusa. Međutim, nakon akumulacije Cd u hipotalamusu, hipofizi i testisima, nastaje smanjen nivo FSH u plazmi, što pokazuje da Cd remeti osu hipotalamus-hipofiza-testisi (Lafuente i sar., 2000).

Histopatološkom analizom tkiva testisa utvrdili smo da subakutna i subhronična aplikacija Cd dovodi do degeneracije seminiferusnih tubula, germinativnih ćelija i odsustva spermatogeneze (*Slika 2*). Na mikroskopskim preparatima je vidljiva atrofija i propadanje lumena seminiferusnih tubula, dok se razlike između tubularnog i intertubularnog kompartimenta

ne mogu uvek uočiti (*Slika 2*). Smanjen nivo testikularnog testosterona može se pripisati njegovoj smanjenoj produkciji od strane Lajdigovih ćelija smeštenih u intersticijumu, koje su prema našem zapaženju postale edematozne prilikom izlaganja Cd (*Slika 2*) (Laskey i sar., 1984). Nepravilna preraspodela spermatogenih ćelijskih linija potvrđuje odsustvo spermatogeneze (*Slika 2*). Rezultati najnovijih studija dokazuju da Cd dovodi do abnormalne depozicije Ca-kalcifikacije krvnih sudova testisa, kolagenih vlakana u intertubularnom prostoru i citoplazme germinativnih ćelija seminiferusnog epitela. Rezultati transmisione elektronografije pokazuju da ekspozicija Cd izaziva vakuolizaciju germinativnih ćelija, uvećanu kondenzaciju hromatina i piknozu, što zajedno predstavlja citološki dokaz ćelijske smrti (Cupertino i sar., 2017).

Početne morfološke analize pokazale su da Cd može uzrokovati duboko i nepovratno oštećenje testisa sisara, pri čemu su opisana oštećenja endotelnih ćelija, edem i hemoragija (Parizek, 1960; Mason i sar., 1964) kao rezultat primarnog oštećenja vaskularnog sistema (Parizek, 1965), što povratno može uticati na semeni epitel i dovesti do ishemije i nekroze testisa (Chiquoine, 1964). Za razliku od drugih organa, testisi sisara su mnogo osetljiviji zbog svoje jedinstvene vaskularizacije (Mason i sar., 1964; Gunn i Gould, 1970). Setchell i Waites su 1970. godine pokazali da je KTB mnogo podložnija toksičnosti Cd nego tesne veze (*tight junction*) u mikrovezikulama testisa odraslih pacova, pošto se oštećenje KTB dešava pre u mikrovezikulama intersticijuma. Pored toga, jedna niska doza Cd od 1 mg/kg TM oštećuje *tight junction* povezane sa mikrofilamentima u Sertolijevim ćelijama pacova i dovodi do oštećenja spermiacije bez vidljivih vaskularnih oštećenja u testisima (Hew i sar., 1993a,b). Posmatrano zajedno, ova zapažanja su više nego neobična, jer je KTB jedna od najužih barijera između krvi i tkiva testisa kod sisara (Wong i Cheng, 2005; Yan i sar., 2008). Drugim rečima, iako je KTB bolje "zatvorena" od *tight junction* propustljivosti barijere koja se nalazi u mikrovezikulama, ona manje efikasno štiti testise od toksičnosti izazvane Cd. Krvno testisna barijera doprinosi uglavnom preko susednih Sertolijevih ćelija pronađenih u blizini bazalnog dela semenog epitela. Ova barijera je nastala preko *tight junction*, *desmosome-like junction*, *gap junction* i bazalne ektoplazmatske veze (Cheng i Mruk, 2002; Wong i Cheng, 2005; Mruk i sar., 2008).

5.3. UTICAJ INDIVIDUALNE SUBAKUTNE IZLOŽENOSTI DISULFIRAMU NA STATUS BIOELEMENATA, OKSIDATIVNI STRES, TESTOSTERONA I MORFOLOŠKE PROMENE U TESTISIMA PACOVA

Rezultati prethodnih studija su pokazali da DSF pokazuje antioksidativne i pro-oksidativne efekte (Ploemen i sar., 1996; Wadhwa i Mumper, 2013). Kako bismo ispitali efekat terapijske doze DSF, davali smo DSF *per os* u dozi od 178,5 mg/kg t.m. pacova što odgovara dozi održavanja za čoveka (125 mg/70 kg t.m./dan). Subakutna izloženost DSF dovela je do promena u statusima Fe (povećanja) i Cu (smanjenja) (*Grafik 1,3, Tabela 8*). Disulfiram je izazvao povećano stvaranje $O_2^{\cdot-}$, smanjenje aktivnosti tSOD i GST i sadržaja MDA u testisima pacova 21 dan nakon primene (*Tabela 9, Grafik 5-7,9, 8.2. Prilog - Tabele 1-3,5*). Prema našim rezultatima DSF *per se* nije uticao na produkciju testosterona, niti je izazvao morfološke promene u testisima (*Tabela 1, 10, Slika 3*).

Imajući u vidu značaj pomenutih esencijalnih metala, istraživali smo da li terapija sa DSF, kao i DSF *per se* utiče na homeostazu bioelementa u reproduktivnim organima mužjaka pacova. Tretman DSF kod pacova korišćen je kao animalni model koji vrlo blisko imitira alkoholne zavisnike na terapiji DSF i procenjuje održivost balansa metala u tkivu testisa. Predstavljeni rezultati pokazuju da primena DSF izaziva promene u statusu bioelementa na testisima pacova.

Dve najvažnije promene statusa metala odnose se na Cu (značajno smanjenje) i Fe (značajno povećanje). Disulfiram nije značajno uticao na Zn i Mg. Narušen status bioelemenata može dovesti do promena u strukturi i funkciji metaloproteina/metaloenzima.

Oksidaciono stanje metala diktira tip hemijskih veza sa drugim molekulima unutar ćelija. Tako se bakar (II) jon (Cu^{2+}) vezuje za azot i kiseonik-donor ligande, dok se bakar (I) jon (Cu^{1+}) vezuje kovalentnim vezama za sumpor-donore. Druga razlika se odnosi na koordinacioni broj i koordinativnu geometriju. Bakar (II) jon uglavnom zauzima četiri ili pet vezujućih mesta (maksimalna elektrostatička interakcija), dok Cu^{1+} gradi dve ili tri koordinativne veze (Blackburn i sar., 2014). Sintezom DDTC Cu (I) u laboratorijskim uslovima, Han je sa kolegama potvrdio da Cu^{1+} jon formira binuklearni kompleks sa DDTC (Han i sar., 2013).

Prema našim rezultatima, koncentracija Cu je smanjena u testisima i povećana u jetri tretiranih pacova nakon izlaganja DSF, što se može objasniti masovnim formiranjem kompleksa DDTC-Cu (I) u jetri i posledičnom distribucijom u druga tkiva, uključujući i testise (Begic i sar.,

2017). Vezivanjem Cu, DSF inhibira brojne enzime, među kojima i SOD, dopamin- β -hidroksilazu, karboksilestarazu i holinesterazu (Zemaitis i Green, 1976; Schroeder i sar, 2010). Dodatno, kompleks DSF-Cu sinergistički može značajnije da indukuje intracelularne stresogene odgovore nego sam Cu (II/I) jon, što se može koristiti u ciljnim tumorskim ćelijama u antikancerskoj terapiji (Lin i sar., 2011; Dalecki i sar., 2015).

Kod odraslih mužjaka su povećani zahtevi testisa za Zn, što je povezano sa većim nivoom Zn u prostati, nego u bilo kom drugom organu. Nedostatak Zn smanjuje aktivnost ACE, što uzrokuje potrošnju testosterona i inhibiciju spermatogeneze. Oštećenje spermatozoida je često opisano kod Zn-deficijentnih pacova (Bedwal i Behuguna, 1994). Ćelije testisa održavaju homeostazu Zn, što je od velikog značaja za funkcionisanje reproduktivnog sistema. Naši rezultati su 1, 3 i 10 dana nakon izlaganja DSF pokazali smanjenu koncentraciju Zn u testisima (*8.1. Prilog - Tabela 4*). Međutim, ćelijski reparacioni mehanizmi bili su u mogućnosti da vrate nivoe Zn na kontrolne vrednosti posle 21 dan, što dokazuje važnost očuvanja homeostaze Zn u testisima.

Gvožđe je u ćeliji vezano za GSH što predstavlja citozolno skladište ovog metala, dok ključnu ulogu u sintezi Fe-S klastera imaju glutaredoksini (Hider i Kong, 2013). Ovi proteini su neophodni za membranski vezane respiratorne transportne lance elektrona i za aktivnost enzima (Shergill i Cammack, 1994; Atta i sar., 1998; Schilke i sar., 1999). Opisana akumulacija Fe u testisima nakon subakutne izloženosti DSF u ovoj studiji, može se objasniti sintezom Fe-S klastera i shodno tome, u našem slučaju, vezivanjem Fe za cistein u DDTC (Thomson i sar., 1981). Povećanje sadržaja Fe u testisima može biti odgovorno za štetni uticaj ROS na tkivo testisa i oštećenu reproduktivnu funkcije muških pacova kod alkoholičara, kao i alkoholičara tretiranih DSF (Dosumu i sar., 2012). Povećane koncentracije Fe pokazuju negativan uticaj na pokretljivost sperme, njihovu morfologiju i koncentraciju, što može dovesti u vezu reproduktivnu toksičnost sa povišenim koncentracijama Fe u testisima (Marzec-Wróblewska i sar., 2012).

Homeostaza Mg u testisima se održala tokom subakutnog davanja DSF (*Grafik 4, Tabela 8*) što je u skladu sa podacima iz literature.

Rezultati ove studije potvrđuju da DSF ima veliki potencijal za prelazne metale. Predstavljene rezultati po prvi put ukazuju na veliki uticaj DSF na sadržaj biometala u muškim

reproduktivnim organima. Potrebna su dalja istraživanja da odrede posledice izmenjene homeostaze bioelemenata u testisima pacova tretiranih DSF.

Disulfiram poput drugih tiola niske molekulske težine (D-penicilamin, N-acetil cistein, kaptopril, tetratiomolibdat, itd) paradoksalno pokazuje antioksidativne i oksidativne efekte (Wadhwa i Mumper, 2013), koji su u skladu sa rezultatima naše studije. Prema podacima našeg istraživanja subakutna izloženost DSF uzrokuje porast nivoa $O_2^{\bullet-}$, smanjenu aktivnost tSOD i GST i smanjenu koncentraciju MDA dok promene ostalih parametara nisu uočene (GSH, GSSG, odnos GSSG/GSH, CAT i GR) u testisima u odnosu na kontrolu (*Tabela 9, Grafik 5-13, 8.2. Prilog - Tabela 1-9*). Antioksidativne mogućnosti DSF i njegovog glavnog metabolita DDTC mogu da se objasne prisustvom slobodne $-SH$ grupe koja funkcioniše kao donor elektrona i uzrokuje skupljanje radikala na sličan način kao GSH (Trachootham i sar., 2008; Wadhwa i Mumper, 2013). S druge strane, $-SH$ grupa može da se oksiduje u prisustvu jona prelaznih metala (kao što su Cu i Cd), što dodatno izaziva stvaranje SR. Stvaranje ROS preko tiola zavisi od proizvodnje tiolatnog anjona koji u suprotnom, zavisi od kiselosti $-SH$ grupe, pH medijuma, koncentracije jona prelaznih metala i njihove sposobnosti da katalizuju oksidaciju DSF (Vinterbourn i sar., 2008; Zheng i sar., 2010). Takođe je potvrđeno da $-SH$ grupe mogu biti direktno uključene u Fentonovu reakciju i ne zavise od stvaranja H_2O_2 (Mundai i sar., 1989, 1994; Wadhwa i Mumper, 2013).

Primena DSF je dovela do smanjenja nivoa MDA (*Grafik 6, Tabela 9*) i nije uzrokovala promenu nivoa GSH, GSSG i GSSG/GSH odnosa (*Grafik 11-13, Tabela 9*) u poređenju sa odgovarajućom kontrolnom grupom, što potvrđuje da DSF ima značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti GSH. Oksidacija GSH se dešava u reakcijama u kojima je GSH donor redukcionih ekvivalenata (kao što je reakcija koju katalizuje GPx). Najverovatnije redoks par DSF/DDC postaje aktivan u biološkom medijumu (DDC prestaje biti dostupan u slobodnoj formi usled vezivanja za metale ili kroz reakcije tiolizacije, odnosno postaje dostupan oslobađanjem iz veze sa metalima) tako da štiti oksidaciju GSH i ne dozvoljava narušavanje GSSG/GSH odnosa (Liu i sar., 1998).

Kako subakutna primena DSF nije dovela do promena u koncentraciji testosterona ni u plazmi ni u testisima tretiranih životinja (*Tabele 1, 10*), nisu očekivane ni promene u spermatogenezi, što je i potvrđeno histopatološkom analizom (*Slika 3*). Na mikroskopskim

preparatima su vidljive bazalne ćelije i očuvana je normalna struktura tkiva. Takođe, može se uočiti da su očuvane sve faze spermatogeneze, što ukazuje da subakutna izloženost DSF u primenjenoj dozi ne remeti strukturu tkiva, niti ometa produkciju testosterona.

5.4. UTICAJ KOMBINOVANE SUBAKUTNE IZLOŽENOSTI ALKOHOLU I KADMIJUMU NA STATUS BIOELEMENATA, OKSIDATIVNI STRES, TESTOSTERONA I MORFOLOŠKE PROMENE U TESTISIMA PACOVA

Poznata je povezanost između konzumiranja alkohola i procesa pušenja, ali kombinovani efekat nikada nije proučavan. Najčešći parametri koji su posmatrani ispitivanjem morfologije sperme bili su: zapremina sperme, koncentracija, pokretljivost (kao % pokretnih spermatozoida), morfologija (kao % spermatozoida normalnog oblika), ukupan broj spermatozoida u milionima i vijabilnost (kao % živih spermatozoida). Posmatranjem studija navike pušenja i morfologije sperme pokazano je da pušenje ima veoma mali efekat na morfologiju sperme. Analizom mnogobrojnih članaka pronađene su samo tri studije, od kojih je jedna sprovedena u Meksiku (Merino i sar., 1998), druga u Kuvajtu (Al-Bader i sar., 1999), a treća u Kini (Zhang i sar., 2000), koje jasno pokazuju uticaj pušenja na neke od parametara spermatogeneze. Studija Merino i saradnika iz 1998. godine je pokazala da pušači imaju lošiji procenat pokretljivosti spermatozoida, manji procenat normalne morfologije spermatozoida i manji procenat pokretnih spermatozoida od nepušača. Zhang je 2000. godine sa saradnicima pokazao da pušači za razliku od nepušača imaju manju gustinu i vijabilnost sperme. Al-Bader i saradnici (1999) su ukazali na vezu između pušenja i gustine sperme, pokretljivosti i morfologije. Tri druge studije (Goverde i sar., 1995; Chia i sar., 1998; Rubes i sar., 1998) su pokazale selektivne efekte pušenja na zapreminu sperme. Jedna studija iz 2000. godine (Mak i sar., 2000) je potvrdila da pušači imaju veći procenat izmenjenih spermatozoida, koja se smatra morfološkom promenom povezanom sa oštećenom funkcijom spermatozoida. Efekat različitih doza pušenja razmatran je u nekoliko studija, od kojih se u četiri (Merino i sar., 1998; Al-Bader i sar., 1999; Zhang i sar., 2000; Wang i sar., 2001) ukazuje na moguću vezu doznog odgovora. Dve studije (Oldereid i sar., 1992a,b; Goverde i sar., 1995) ne pokazuju dozno zavisne efekte, dok se u jednoj (Wong i sar., 2000) ipak ukazuje na doznu zavisnost.

Paralelna subakutna ekspozicija Cd i etanolu dovela je do povećanja Fe i Cu u odnosu na kontrolnu grupu, kao i do povećanja koncentracije Cu u odnosu na A₂₁ grupu i smanjenja u odnosu na Cd₂₁ grupu (*Grafik 1,2, Tabela 11, 8.1. Prilog - Tabela 2,3*). Rezultati sprovedene studije ukazuju da subakutna koekspozicija Cd i etanolu smanjuje koncentraciju Zn u testisima u poređenju sa odgovarajućom kontrolnom grupom (*Grafik 3, Tabela 11, 8.1. Prilog - Tabela 4*).

Studija Brzoske i saradnika je pokazala da A indirekto indukuje sintezu MT, koji su ključni proteini za vezivanje Cd i smanjenje njegove toksičnosti (Brzóška i sar., 2000). Upravo indukcija sinteze MT od strane A može biti objašnjenje zašto je 10. i 21. dana po koekspoziciji etanolu i Cd koncentracija Zn u testisima veća, a Cu manja u odnosu na pojedinačnu ekspoziciju Cd (*8.1. Prilog - Tabele 3,4*). Naime, sintetisani MT vezuju Cd i sprečavaju njegov negativan efekat na homeostazu Zn.

Ni paralelna izloženost Cd i etanolu nema uticaj na homeostazu Mg u testisima (*Tabela 11, Grafik 4, 8.1. Prilog - Tabela 5*), što je u skladu sa objavljenim podacima (Brzóška i sar., 2000) i potvrđuje da Mg ima stabilne mehanizme za održavanje homeostaze (Maret i Wedd, 2014), te je najstabilniji bioelement u uslovima paralelne i pojedinačne intoksikacije Cd i A.

Poznato je da oba agensa Cd (Pal i sar., 1993; Bagchi i sar, 1996; Kulikowska-Karpinska i sar., 1997) i A (Shaw i Jayatilleke, 1990; Kukielka i sar., 1994; Montoliu i sar., 1994; Dupont i sar., 1998; Thurman i sar, 1999) remete oksidativnu ravnotežu organizma i prepoznato je da su procesi nastajanja SR uključeni u mehanizme toksičnosti ovih supstanci.

Promene u metabolizmu Zn, Cu i Fe, koje smo i mi zabeležili (*Grafici 1-3, Tabela 11*) takođe mogu da dovedu do poremećaja u AOS (Stohs i Bagchi, 1995; Kulikowska-Karpinska i Moniuszko-Jakoniuk, 2001). Više autora je sugerisalo da interakcija između Cd i A može da utiče na oksidativni status organizma i ukazali da su alkoholičari koji su izloženi i Cd izloženi većem riziku po zdravlje (Sharma i sar., 1991; Pal i sar., 1993). Ipak, još uvek se ne može naći mnogo informacija o OS koji nastaje kao posledica simultane intoksikacije ovim supstancama.

Suprimirana aktivnost tSOD zabeležena je usled koekspozicije Cd i etanolu u odnosu na kontrolnu grupu (*Grafik 7*). Inhibicija enzima je u skladu sa porastom nivoa O₂^{•-} koji je značajno manji u odnosu na porast u Cd₂₁ grupi, dok se ne razlikuje značajno od porasta u A₂₁ grupi (*Grafik 5*).

Aktivnost CAT tokom koekspozicije Cd i etanolu je značajno smanjena u odnosu na kontrolnu grupu (*Grafik 8*). Niska aktivnost enzima ukazuje na visok sadržaj H₂O₂ što povećava mogućnost stvaranja potentnog OH[•] kroz Fentonovu reakciju i nastanak LPO, što je i potvrđeno našim rezultatima. Porast nivoa MDA u odnosu na kontrolnu grupu životinja je zabeležen pri paralelnoj ekspoziciji. Međutim, ovaj porast je istog nivoa kao prilikom pojedinačne izloženosti Cd i etanolu, te se ne može govoriti o sinergističkom efektu etanola i Cd na razvoj LPO (*Grafik 6*).

Simultana subakutna ekspozicija Cd i etanolu je dovela do smanjenja GSH i povećanja GSSG nivoa što je rezultiralo porastom GSSG/GSH odnosa u testisima tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu i A₂₁ grupu (*Grafik 11-13, Tabela 12*). Za očekivati je bilo da će Cd dovesti do praznjenja depoa GSH u testisima, kao što je zabeleženo kod individualne ekspozicije Cd, budući da individualna ekspozicija etanolu nije pokazala efekat na GSH (*Grafik 11*).

Narušavanje glutationskog statusa je potvrđeno i zabeleženim smanjenjem aktivnosti GST u odnosu na kontrolnu i A₂₁ grupu životinja (*Grafik 9, Tabela 12*). Redukovani glutation je supstrat za GST, enzim koji je odgovoran za detoksikaciju velikog broja ksenobiotika. Smanjene rezerve GSH mogu biti jedno od objašnjenja smanjene aktivnosti GST u testisima pacova kojima smo simultano davali Cd i etanol.

Paralelna subakutna izloženost etanolu i Cd dovodi do smanjenja koncentracije testosterona u plazmi u odnosu na pojedinačnu izloženost ovim agensima, dok je u testisima zabeleženo smanjenje koncentracije testosterona samo u odnosu na A-grupu (*Tabele 1,13*). Histopatološkom analizom utvrđeno je da paralelna ekspozicija dovodi do sličnih oštećenja tkiva testisa kao i usled pojedinačne primene Cd (*Slika 4*).

5.4.1. Uticaj nadovezane subakutne izloženosti alkoholu (1-21 dana) pa disulfiramu (22-42 dana) na status bioelemenata, oksidativni stres, testosterona i morfološke promene u testisima pacova

Pojedinačna primena etanola smanjuje koncentraciju Zn (*Grafik 3*), a DSF smanjuje Cu (*Grafik 2*), dok oba agensa prilikom pojedinačne ekspozicije povećavaju koncentraciju Fe u testisima pacova (*Grafik 1*). Primena DSF nakon subakutne izloženosti etanolu (podrazumeva se prestanak unosa etanola) povećava Fe i smanjuje Cu u testisima izloženih pacova (*Grafik 1,2*). Nije opisan efekat na Mg u bilo kojoj eksperimentalnoj grupi (*Grafik 4, Tabela 14*).

Nivo Zn u testisima je ispod kontrolnih vrednosti u svim A/DSF eksperimentalnim grupama, ali je ipak blago povišen (bez značaja) u poređenju sa A₂₁ grupom (*Tabela 14, 8.1. Prilog - Tabela 4*). Opisani rezultati ukazuju da DSF smanjuje uticaj etanola na nivo Zn u testisima. Visoka potreba za Zn u testisima kod odraslih ljudi je povezana sa funkcijom prostate. Nedostatak Zn smanjuje aktivnost ACE, što dovodi do nedostatka testosterona i inhibicije spermatogeneze. Oštećenja spermatozoida se često mogu videti kod Zn-deficijentnih pacova (Bedwal i Behuguna, 1994). Održavanje homeostaze Zn u testisima je od velikog značaja za pravilno funkcionisanje reproduktivnog sistema. Prema našim rezultatima, alkoholičari imaju visok rizik od gubitka Zn, tako da i blago povećanje koncentracije ovog metala do koga dovodi uvođenje DSF može biti od izuzetnog značaja i svedoči o protektivnom dejstvu DSF na homeostazu Zn. Uticaj na status Zn se najverovatnije može pripisati metabolitima DSF čije –SH grupe vezuju ovaj esencijalni metal (Bonda i sar, 2004).

Sam DSF značajno smanjuje nivo Cu u testisima sa vremenom, dok je suprotno pri subhroničnoj izloženosti etanolu, a potom DSF u trajanju od 3 i 10 dana primećeno značajno povećanje Cu (*8.1. Prilog - Tabela 3*).

Uvođenje DSF nakon završene subakutne ekspozicije etanolu je ispoljilo povoljan efekat na samo nekoliko parametara OS (O₂^{•-}, MDA i GSH) u testisima tretiranih životinja (*Grafik 5, 6, 11, Tabela 15*). Stvaranje O₂^{•-} je značajno niže u A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupi u odnosu na A₂₁ grupu, ali i dalje više od produkcije u odgovarajućoj kontrolnoj grupi (*Grafik 5*). Međutim, zabeleženo smanjenje sadržaja MDA u A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupi u odnosu na A₂₁ grupu i približavanje vrednosti ovog parametra kontrolnoj vrednosti se izdvaja kao najznačajniji pozitivan efekat DSF na narušen oksidativni status u testisima pacova usled subakutne izloženosti etanolu (*Grafik 6*). Imajući u vidu da se razvoj LPO u testisima dovodi u vezu sa poremećajima morfologije i pokretljivosti sperme i degenerativnim promenama seminiferusnih tubula (Glauca i sar., 2015), smanjenje LPO nakon uvođenja DSF, ukazuje na njegov protektivni efekat na tkivo testisa (*Tabela 15*). Disulfiram slično GSH ima slobodnu –SH grupu jakih redukcionih svojstava, usled čega može uticati na redoks balans (Schafer i Buettner, 2001).

Imitirajući GSSG/GSH par, biološka aktivnost DDTC/DSF para može poboljšati narušenu redoks homeostazu u testisima pacova prethodno izloženih etanolu. Iako je zabeleženo povećanje nivoa GSH u A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupi u odnosu na A₂₁ grupu, u istoj eksperimentalnoj grupi je

registrovan pad GSSG/GSH odnosa u poređenju sa A₂₁ grupom (*Grafik 11, 13, Tabela 15, 8.2. Prilog - Tabele 7, 9*). Kako je GSSG/GSH odnos jedan od glavnih pokazatelja antioksidativnog kapaciteta, smanjenje GSSG/GSH odnosa nakon uvođenja DSF potvrđuje njegov antioksidativni efekat (*Tabela 15*).

Međutim, davanje DSF nakon završene subakutne aplikacije etanola nije pokazalo pozitivan efekat na sve parametre OS. Uvođenje DSF je izazvalo dalje smanjenje aktivnosti tSOD i GST u odnosu na kontrolne vrednosti (*Grafici 7, 9*).

Uvođenje DSF po završetku subakutnog davanja etanola pokazao je trend daljeg smanjenja nivoa testosterona u plazmi, dok je u homogenatima testisa zabeležen blagi porast testosterona u odnosu na A₂₁ grupu (*Tabela 3*). Naša studija je potvrdila koncept da je LPO metabolička posledica davanja etanola i da je pojava LPO u korelaciji sa poremećajima funkcije gonada (Rosenblum i sar., 1989). Kako naši rezultati ukazuju na protektivno dejstvo DSF na stepen LPO u testisima pacova nakon završenog subakutnog tretmana etanolom (*Grafik 6*), delimično protektivni efekat DSF na produkciju testosterona u testisima pod istim uslovima je opravdan (*Tabela 13*).

Histopatološkom analizom utvrdili smo da DSF nije doveo do značajnijih promena u A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupi u odnosu na A₂₁ grupu. Evidentno je prisustvo složenog slojevitog epitela kanalića u različitim fazama spermatogeneze. Intraluminalno u semenim kanalićima vidi se složeni slojeviti germinativni, odnosno semeni epitel. Narušen proces spermatogeneze ne dešava se istovremeno i opisana asihronija je poznata pod imenom ciklus semenog epitela. Adluminalno se jasno vidi veliki broj spermatida i njihovih flagela povezanih sa Sertolijevim ćelijama (*Slika 5*).

5.4.2. Uticaj paralelne subakutne izloženosti kadmijumu i disulfiramu na status bioelemenata, oksidativni stres, testosterona i morfološke promene u testisima pacova

S obzirom na visoku osetljivost tkiva testisa na insult Cd, od velikog značaja su prevencija i/ili terapijske intervencije. Helatori metala, kao što su ditiokarbamati i monoizoamil mezo-2,3-dimerkaptosukcinat (Mi-ADMS) pokazuju ograničen uspeh, zbog svoje efikasnosti samo ukoliko se primenjuju jedan sat nakon davanja Cd (Kojima i sar., 1992; Yan i sar., 1997).

Disulfiram i njegovi metaboliti DDTCs, imaju veliki potencijal za –SH grupe i prelazne metale (Cd je jedan od njih), što ih čini veoma reaktivnim ne-specifičnim hemikalijama (Iakishich, 2001) i potvrđuje kao potentne *in vivo* i *in vitro* inhibitore mnogih enzima u biološkim sistemima. Neke od ovih enzima smo opisali u našoj studiji, uključujući GST (Ploemen i sar., 1996) i SOD (Marikovski i sar., 2003), ali takođe i nekoliko bakar-zavisnih enzima: dopamin β-hidroksilaza (DBH), karboksilestaraza i holinestaraza (Zemaitis i Greene, 1976; Barth i Malcolm, 2010; Schroeder i sar., 2010). Smatra se da ovo bakar-helirajuće dejstvo indukcijom inhibicije proteazoma i posledičnom apoptozom ćelije (Wang i sar., 2011), dovodi do predloga da se DSF može koristiti u antikancerskoj terapiji (Lin i Lin, 2011). Ovi inhibitorni efekti su pripisani bakru i/ili drugim osnovnim metal-helirajućim aktivnostima DSF metabolita DDTC.

Disulfiram sadrži R1R2NC(S)SR3 funkcionalnu grupu, koja mu daje mogućnost da gradi komplekse sa metalima. U studiji Li i saradnika (Li i sar., 2008) su prvo ispitivani kompleksi DSF sa raznim metalima, uključujući Mg, kalcijum (Ca), Cd, hrom (Cr), mangan (Mn), kobalt (Co), nikel (Ni) i Zn, na njihove proteazom-inhibitorne aktivnosti u humanim PC-3 ćelijama kancera prostate i pronađeno je da je kompleks DSF-Cd najpotentniji. DSF-Cd kompleks selektivno inhibira aktivnost proteozoma u humanim ćelijama kancera dojke, ali ne i kod netumorskih ćelija i njihove selektivne inhibicije proteozoma koja je povezana sa povećanom osetljivošću na indukciju apoptoze u humanim ćelijama kancera dojke. Studija pokazuje potencijalno korišćenje DSF kao agensa koji prevodi kancerogeni Cd selektivni lek protiv kancera inhibicijom proteazoma. Ovo je prvi način efikasnog lečenja nakon hronične intoksikacije Cd, posebno pretvaranjem ovog kancerogena u specifične ubice tumorskih ćelija. Zanimljivo je da kompleks DSF-Cd dovodi do više od 95% inhibicije pod istim uslovima, što ukazuje da je ovaj kompleks mnogo moćniji proteozomski inhibitor od kompleksa DSF-Cu. Drugi ispitivani metali sa DSF nisu uspeali da inhibiraju proteozomsku aktivnost u testiranim eksperimentalnim koncentracijama (Chen i sar., 2006).

Uvođenje DSF (posle 21 dan *i.p.* izlaganja CdCl₂, DSF je aplikovan *per os* narednih 21 dan sa kontinuiranim davanjem CdCl₂) ostvaruje pozitivan efekat na narušenu homeostazu Fe i Cu (Grafici 1,2, Tabela 17, 8.1. Prilog - Tabele 2, 3.). Disulfiram je ostvario protektivni efekat i na Cd narušen oksidativni status u testisima što se ogleda u povišenim aktivnostima tSOD, CAT i

GR i smanjenim koncentracijama $O_2^{\bullet-}$ i MDA, kao i u smanjenju odnosa GSSG/GSH u odnosu na odgovarajuću Cd grupu životinja (*Grafik 5-9, 13, Tabela 1, 18, 8.2. Prilog - Tabele 1-5, 9*).

Koekspozicija DSF i Cd u trajanju od 21 dana, kod pacova koji su prethodno subakutno bili izloženi pojedinačnom tretmanu Cd rezultirala je smanjenjem koncentracije Cd u testisima tretiranih pacova (*8.1. Prilog - Tabela 1*), što implicira da DSF ispoljava zaštitni efekat na testise, vezujući i uklanjajući Cd iz pomenutog tkiva.

U pogledu narušene homeostaze bioelemenata, koja se javlja usled subakutne i subhronične izloženosti Cd, DSF je ispoljio pozitivan efekat na sadržaje Fe i Cu u testisima tretiranih životinja. Disulfiram je smanjio prekomerno uvećanu koncentraciju Cu, koja je posledica subakutnog davanja Cd, i ponovo uspostavio homeostazu ovog bioelementa u testisima snižavajući njegovu koncentraciju čak ispod kontrolnih vrednosti (*Grafik 2*). Takođe, DSF je uspeo da poveća koncentraciju Zn (ali ne statistički značajno), koja je prethodno smanjena usled subakutnog davanja Cd (*Grafik 3*). Uspostavljanje homeostaze ovih metala se može dovesti u vezu sa porastom aktivnosti tSOD pri koekspoziciji Cd i DSF, koja je prethodno smanjena pod dejstvom pojedinačne izloženosti Cd (*Grafik 7*). Pošto je za normalnu aktivnost SOD neophodna odgovarajuća koncentracija Cu i Zn, ponovnim uspostavljanjem njihove homeostaze se obnavlja i inhibirana aktivnost SOD.

Kombinovana ekspozicija Cd i DSF ostvarila je i pozitivan efekat na Cd narušenu homeostazu Fe u testisima tretiranih pacova. Prilikom individualnog aplikovanja Cd zabeležen je drastičan porast koncentracije Fe, dok kombinovano aplikovanje Cd i DSF (Cd_{1-42}/DSF_{22-42} grupa) dovodi do pada vrednosti Fe u odnosu na Cd_{42} grupu (*Grafik 1*). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima studije Ono i saradnika (1997) koji su dokazali da je porast testikularnog Fe nakon aplikovanja Cd gotovo potpuno blokiran visokim dozama DSF ili DED, dok niske doze DSF ili DED nisu ostvarile ovaj efekat (Ono i sar., 1997).

Rezultati naše studije pokazuju da su aktivnosti tSOD, CAT i GR u testisima značajno veće, a koncentracija $O_2^{\bullet-}$ i MDA, kao i GSSG/GSH odnos značajno manje u Cd_{1-42}/DSF_{22-42} grupi u odnosu na Cd_{42} grupu (*Grafik 5-8, 10, 13, Tabela 18*). Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da DSF ima zaštitni efekat na oksidativne promene izazvane izlaganjem Cd u testisima tretiranih pacova. Međutim, aktivnosti tSOD i GST su i dalje niže u odnosu na odgovarajuću

kontrolnu grupu (*Grafik 7,9*). U Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ grupi vrednosti GSH su i dalje ispod, a GSSG i GSSG/GSH odnosa iznad kontrolnih (*Grafik 11-13, Tabela 18*).

Nivo MDA je često korišćen parametar za određivanje LPO i oksidativnog oštećenja, jer je MDA jedan od proizvoda LPO (Songur i sar., 2003). Membrane testisa su bogate lipidima koji su osetljivi na oksidativno oštećenje (Ognjanović i sar., 2010). Nakon dužeg izlaganja Cd dolazi do povišenih nivoa MDA i smanjenja aktivnosti CAT i tSOD, što ukazuje na narušen balans antioksidativne odbrane unutar ćelije i prekomerne količine ROS koje napadaju lipide ćelija (*Grafik 6-8*). Zato naši rezultati u kojima DSF aplikovan zajedno sa Cd vraća povišene koncentracije MDA u testisima pacova na kontrolne vrednosti mogu biti od velikog značaja i ukazuju da aplikacija DSF zajedno sa Cd onemogućava prekomerno stvaranje ROS i održava ravnotežu antioksidativnog balansa u ćelijama.

Primena DSF dovela je do značajnog povećanja aktivnosti CAT i GR u testisima (u Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ grupi u poređenju sa Cd₄₂ grupom) pacova i vratila aktivnosti ovih antioksidativnih enzima na kontrolne (*Grafik 8,10*), što je u skladu sa skorašnjim studijama na ćelijama fibroblasta koje su otkrile da su aktivnosti GR i CAT bile statistički značajno veće nakon izlaganja DDTC (Rahden-Staron i sar., 2012).

Disulfiram može ispoljiti pozitivan efekat na oštećeni redoks balans glutaciona i aktivnost enzima koji su uključeni u održavanje homeostaze redoks balansa glutaciona. Disulfiram vraća sve merene parametre koji se odnose na GSH i metabolizam GSH, a kompromitovani su zbog izlaganja Cd ka kontrolnim vrednostima (*Grafik 9-13, Tabela 18*). Disulfiram i DDTC predstavljaju biološki aktivni redoks par sličan GSH-GSSG paru (Mankhetkorn i sar., 1994), koji je potvrđen u našoj studiji. Disulfiram se redukuje *in vivo* ili *in vitro* u DDTC preko GSH ili drugih proteinskih tiola. Prema skorašnjoj studiji, tretman sa DSF, u većini ćelijskih linija, utiče na nivoe GSH i GSSG samo pri najvećoj koncentraciji, ističući da homeostaza glutaciona zavisi od koncentracije DSF i/ili njegovih metabolita na ciljnom mestu (Giustarini i sar., 2015). U zavisnosti od koncentracije, DSF/DDTC može imati različite uloge u različitim uslovima, kao što su modifikacija nivoa GSH ili umrežavanje (*eng. cross-linking*) proteina. DDTC inhibira peroksidativno oštećenje lipida izazvano trošenjem GSH. DDTC je takođe aktivan u uklanjanju ROS, O₂^{•-} i H₂O₂, što daje iste proizvode, prvenstveno hidratirani oblik DSF. Tako, egzogeni redoks par DSF/DDTC delimično može nadoknaditi oštećenu homeostazu endogenog

GSH/GSSG redoks para. Ovo može biti jedno od objašnjenja za protektivne efekte DSF na poremećenu redoks homeostazu u testisima pacova prethodno izloženih Cd.

Na osnovu naših rezultata primene DSF posle izlaganja Cd, dobijeni su pozitivni efekti merenih oštećenih parametara OS. Ovaj fenomen se može objasniti jakim kapacitetom heliranja DSF i antioksidativnim kapacitetom DSF/DDTC redoks para slično endogenom GSH/GSSG redoks paru. Vezivanjem toksičnih Cd jona DSF onemogućava prelaznom metalu da ostvari svoje štetne oksidativne efekte na tkivo testisa. Kadmijum helatna aktivnost DSF može dovesti do redukcije prooksidativne aktivnosti Cd, međutim, DSF može takođe delovati kao prooksidant helacijom esencijalnih metala i smanjenjem njihove katalitičke aktivnosti u antioksidativnim enzimima. S druge strane, imitiranjem aktivnosti GSH/GSSG redoks para, biološka aktivnost DSF/DDTC redoks para može dovesti do poboljšanja oštećene redoks homeostaze u testisima pacova indukovane izlaganjem Cd.

Subakutni tretman DSF nije pokazao protektivni efekat na produkciju testosterona u testisima, koja je prethodno narušena subakutnim izlaganjem Cd. Udružena izloženost Cd i DSF dovela je do povećanja nivoa testosterona u plazmi u grupi Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ u odnosu na Cd₄₂, ali su te vrednosti i dalje daleko ispod kontrolnih vrednosti (*Tabele 1, 19*). Očigledno da primena DSF u trajanju od 21 dana nije uspela da otkloni posledice OS, pre svega LPO, prethodnog izlaganja Cd na endokrinu funkciju testisa. Činjenica da je uvođenje DSF uspelo da ublaži štetni efekat Cd na nivo testosterona u plazmi je ohrabrujuća i zahteva dalja ispitivanja efekata DSF na androgene hormone i regulaciju sinteze testosterona.

Histopatološka analiza u našoj studiji potvrđuje da DSF nema potencijal da popravi negativne efekte na morfološke promene do kojih je dovela subakutna upotreba Cd (*Slika 6*). Sa mikrofografija se teško može pretpostaviti da se radi o tkivu testisa (jedino je dobro definisana bazalna membrana). Lumen kanalića je potpuno acelularan i ispunjen grudvičasto-homogenim ili mrvičasto-rastresitim sadržajem koji se boji jako eozinofilno. Na mikrofotografiji jednog preparata u intertubularnom prostoru vide se pojedinačni celularni elementi.

5.4.3. Uticaj udružene izloženosti disulfiramu (22-42 dana), kadmijumu (1-42 dana) i alkoholu (1-21 dana) na status bioelemenata, oksidativni stres, testosterona i morfološke promene u testisima pacova

Postavka ove eksperimentalne grupe imala je za cilj da imitira okolnosti otpočinjanja terapije DSF kod alkoholičara-pušača, koji tokom odvikavanja od konzumiranja etanola nastavljaju sa pušenjem. Posle 21 dana izlaganja CdCl_2 (*i.p.*) i etanolu (*per os*), uvedeno je aplikovanje DSF (*per os*) narednih 21 dan uz nastavak davanja CdCl_2 i prestanak administracije etanola. Disulfiram je ostvario pozitivan efekat na narušenu homeostazu Fe, Cu i Zn izazvanu paralelnim davanjem etanola i Cd (*Grafik 1-3, 8.1. Prilog - Tabele 2-4, Tabela 20*), kao i protektivni efekat na narušen oksidativni status u testisima što se ogleda u pomeranju vrednosti svih merenih parametara ka kontrolnim vrednostima (*Grafik 5-13, 8.2. Prilog - Tabele 1-9, Tabela 21*).

Pri kombinovanoj ekspoziciji Cd, etanola i DSF akumulacija Cd u testisima je značajno veća u odnosu na koekspoziciju Cd i etanolom, dok se ne razlikuje značajno u odnosu na individualnu ekspoziciju Cd tokom 42 dana (*8.1. Prilog - Tabela 1*).

Nivo Fe u $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ grupi je niži u odnosu Cd_{42} grupu, ali se ne razlikuje od kontrolnih vrednosti (*Grafik 1*). Disulfiram je ostvario značajan protektivni efekat na homeostazu Cu. O tome svedoči značajno niža koncentracija testikularnog Cu u $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ grupi u odnosu na Cd_{42} grupu (*Grafik 2, Tabela 20*). Subakutno aplikovanje DSF životinjama koje su prethodno subakutno bile izložene etanolu i Cd uz prestanak unosa etanola, a nastavak Cd, dovelo je do porasta nivoa Zn, koji je bio smanjen usled paralelne izloženosti etanolu i Cd (*Grafik 3, Tabela 20*).

Uticaj koekspozicije etanola, Cd i DSF na koncentraciju Mg u testisima je zanemarljiv kada se uporedi $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ grupa sa odgovarajućom kontrolnom grupom, kao i sa A- i/ili Cd- grupama (*Grafik 4, Tabela 20*).

Uvođenje DSF u tretman dovelo je do značajnog smanjenja nivoa $O_2^{\bullet-}$ u $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ grupi u odnosu na Cd_{42} grupu, iako je koncentracija $O_2^{\bullet-}$ i dalje iznad kontrolne vrednosti (*Grafik 5*). Po završetku kombinovanog tretmana aktivnost tSOD je i dalje drastično ispod nivoa kontrolne vrednosti (*Grafik 7, Tabela 21*). Pozitivan efekat na aktivnost tSOD DSF je ostvario jedino u $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ grupi u odnosu na Cd_{42} grupu. Restauracija aktivnosti SOD je u skladu sa pozitivnim efektom DSF na ponovno uspostavljanje homeostaze Cu i Zn u testisima

pacova podvrgnutih kombinaciji etanola, Cd i DSF (*Grafik 2,3*) i verovatno je rezultat reakcije između DDC-a i Cd.

Koekspozicija Cd i etanolu dovodi do smanjenja aktivnosti CAT, uvođenje DSF u tretman je rezultiralo povećanjem aktivnosti u $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ grupi u odnosu na A_{21}/Cd_{21} grupu (*Grafik 8, Tabela 21*), što ukazuje na to da inhibicija CAT aktivnosti nastaje verovatno usled vezivanja Cd za imidazolne ostake His-74 u strukturi CAT, i da DSF vezujući Cd smanjuje inhibiciju CAT.

Lipidna peroksidacija je toliko smanjena u kombinovanoj $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ grupi u odnosu na individualnu ekspoziciju/koekspoziciju Cd i etanolu da je dostigla kontrolne vrednosti (*Grafik 6*). Značajno smanjena LPO ukazuje na delimično protektivni efekat DSF (*Tabela 21*).

U $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ grupi registrovano je povećanje aktivnosti enzima glutationskog ciklusa, pri čemu GR dostiže kontrolne vrednosti, dok je aktivnost GST značajno veća u odnosu na Cd_{42} grupu (*Grafik 9,10, Tabela 21*). Disulfiram je ispoljio protektivno dejstvo na testise životinja prethodno izložene Cd i etanolu štiteći glavni ćelijski antioksidans GSH. Uvođenjem DSF u tretman životinjama koje su prethodno subakutno paralelno izložene etanolu i Cd u $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ eksperimentalnoj grupi zabeležen je porast GSH u odnosu na Cd_{42} grupu, smanjenje sadržaja GSSG u odnosu na Cd_{42} grupu, što je rezultiralo nižim vrednostima GSSG/GSH odnosa u poređenju sa Cd_{42} i A_{21}/Cd_{21} grupama (*Grafici 10-13*). Kako se vrednosti GSSG i GSSG/GSH odnosa u $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ grupi ne razlikuju od kontrolnih (*Grafik 12,13, Tabela 21*), kapacitet DSF da popravi narušenu homeostazu glutationskog ciklusa usled paralelne subakutne izloženosti Cd i etanolu se ističe kao jedno od ključnih saznanja ove studije i dokaz da DDTC/DSF par u biološkim uslovima imitira GSSG/GSH redoks par. Preuzimejući ulogu redukcionog ekvivalenta DSF šteti GSH rezerve u ćeliji i štiti ih od OS.

U grupi $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ detektovano je blago povećanje koncentracije testosterona u plazmi u odnosu na Cd_{42} grupu životinja, ali ne i u odnosu na A_{21}/Cd_{21} (*Tabela 22*). Koncentracija testosterona u homogenatima testisa je nastavila sa trendom opadanja i nakon uvođenja DSF, te je u grupi $A_{1-21}/Cd_{1-42}/DSF_{22-42}$ drastično niža u odnosu na A_{21} i kontrolnu grupu (*Tabele 1, 22*), tako da ne možemo govoriti o protektivnom efektu DSF na nivo testosterona u testisima.

Na osnovu analize preseka tkiva testisa ne može se zaključiti da li je DSF ostvario protektivni efekat u odnosu na pojedinačne i udruženu ekspoziciju etanolu i Cd (*Slika 7*).

6. ZAKLJUČAK

Postavljeni ciljevi sprovedenog eksperimenta na životinjama su bili da se utvrde mehanizmi reproduktivne toksičnosti alkohola i kadmijuma, kao i potencijalno protektivna uloga DSF. Doprinos studije je i rasvetljavanje uzročno-posledične veze između narušavanja homeostaze pojedinih bioelemenata i razvoja oksidativnog stresa u testisima tretiranih životinja. Potvrda ostvarenih toksičnih efekata ispitivanih supstanci je narušavanje morfologije testisa, kao i poremećaj u sintezi testosterona.

Analizom rezultata sprovedene studije izvedeni su sledeći zaključci:

4. pri odabranoj dozi i subakutnoj izloženosti etanolu, u testisima pacova došlo je do nastanka OS, generisanjem slobodnih radikala tokom njegovog metabolizma, inhibicijom antioksidativnih enzima (SOD i GST) i razvojem procesa LPO. Nastalim promenama je doprineo i porast katalitički aktivnog Fe, oslobođenog iz feritina, koje u Fentonovoj reakciji doprinosi nastanku LPO;
5. pri odabranoj dozi i subakutnoj i subhroničnoj izloženosti Cd došlo je do nastanka OS, što se ogleda u stvaranju SR, razvoju LPO, oštećenju antioksidativnog neenzimskog sistema odbrane (smanjenju GSH i povećanju GSSG) i inhibiciji aktivnosti antioksidativnih enzima. Nastanak OS je praćen i narušavanjem homeostaze merenih bioelemenata (povećanja koncentracije Fe i Cu i smanjenja koncentracije Zn);
6. paralelna izloženost Cd i etanolu je narušila redoks balans u testisima u većoj meri nego pojedinačni tretmani, posebno se ističe povišen GSSG/GSH odnos u poređenju sa individualnim tretmanima;
7. protektivni efekat DSF na testise pacova prethodno izložene etanolu se može opisati kao delimično antioksidativan, pošto je, prema našim rezultatima DSF pozitivno uticao i značajno smanjio koncentracije $O_2^{\cdot-}$ i MDA;
8. uvođenje DSF u tretman nakon ekspozicije Cd i nastavak koekspozicije ostvario je pozitivan efekat na narušenu homeostazu merenih metala (Fe, Cu, Zn) i vratio gotovo sve merene parametre OS na kontrolne vrednosti;

9. uvođenje DSF i nakon kombinovanog tretmana Cd i etanola je ostvarilo protektivni efekat na narušene homeostaze bioelemenata (smanjenje koncentracije metala u odnosu na pojedinačnu izloženost primenjenih supstanci) i redoks sistema u testisima tretiranih pacova;
10. subakutni tretman DSF nije pokazao protektivni efekat na produkciju testosterona u testisima, koja je prethodno narušena izlaganjem etanolu (subakutno) i/ili Cd (subakutno/subhronično);
11. DSF nema potencijal da reparira narušenu morfologiju testisa pacova prethodno subakutno izloženih etanolu A i/ili Cd.

7. LITERATURA

1. Abarikwu SO, Duru QC, Chinonso OV, Njoku RC. Antioxidant enzymes activity, lipid peroxidation, oxidative damage in the testis and epididymis, and steroidogenesis in rats after co-exposure to atrazine and ethanol. *Andrologia* 2016; 48(5): 548-57.
2. Acharya U, Mishra M, Patro J, Panda M. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reprod Toxicol* 2008; 25: 84-8.
3. Aitken JR, Krausz C, Burkingham D. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 268-79.
4. Aitken R, Roman S. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 2008; 1: 15-24.
5. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1987; 81: 459-69.
6. Al-Bader A, Omu AE, Dashti H. Chronic cadmium toxicity to sperm of heavy cigarette smokers: immunomodulation by zinc. *Arch Andr* 1999; 43: 135-40.
7. Almroth BC. Oxidative damage in fish used as biomarkers in field and laboratory studies. Doctoral Dissertation, Department of Zoology/Zoophysiology, Göteborg University, Sweden; 2008. p. 1-74.
8. Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 2002; 53: 1331-41.
9. Altura BM, Altura BT. Association of alcohol in brain injury, headaches, and stroke with brain tissue and serum levels of ionized magnesium: a review of recent findings and mechanisms of action. *Alcohol* 1999; 19: 119-30.
10. Anderson ME, Meister A. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(3): 707-11.
11. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70(2): 200-14.
12. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 2014; 00196
13. ATSDR toxicological profile for cadmium U. S. department of health and human services public health service agency for toxic substances and disease registry; 2012.
14. ATSDR, Agency for toxic substances and disease registry, toxicological profile for cadmium (Draft for Public Comment). US department of health and human services, Public Health Service. 2008; Atlanta.
15. ATSDR. The 2007 CERCLA priority list of hazardous substances. Agency for toxic substances and disease registry. U. S. department of health and human services, 2007; Atlanta, GA.

16. ATSDR. Toxicological profile for cadmium. Agency for toxic substances and disease registry. U. S. department of health and human services, 2012; Atlanta, GA.
17. Atta M, Lafferty ME, Johnson MK, Gaillard J, Meyer J. Heterologous biosynthesis and characterization of the [2Fe-2S]-containing N-terminal domain of *Clostridium pasteurianum* hydrogenase. *Biochemistry* 1998; 37(45): 15974-80.
18. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. Handbook of methods for oxygen radicals research. R. A. Greenwald (Ed.). CRC Press (Boca Raton); 1985; 123-32.
19. Augustyniak A, Michalak K, Skrzydlewska E. The action of oxidative stress induced by ethanol on the central nervous system (CNS). *Postepy Hig Med Dosw* 2005; 59: 464-71.
20. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 360438.
21. Aylett JB. The chemistry and bioinorganic chemistry of cadmium. In: Webb M (Ed.). *The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*. Elsevier, Amsterdam. 1979; pp. 1-43.
22. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. Cadmium induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague Dawley rats biological trace element research 1996; 53: 143-7.
23. Baker HW, Brindle J, Irvine DS, Aitken RJ. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil Steril* 1996; 65: 411-9.
24. Bandivdekar AH. Development of antifertility vaccine using sperm specific proteins. *Indian J Med Res* 2014; 140 Suppl: S73-7.
25. Barth KS, Malcolm RJ. Disulfiram: an old therapeutic with new applications, CNS & neurological disorders. *Drug Targets* 2010; 9: 5-12.
26. Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* 1994; 50(7): 626-40.
27. Begic A, Djuric A, Gobeljic B, Stevanovic I, Lukic V, Stanojevic I, Ninkovic M, Saso L, Vojvodic D, Djukic M. The simple isocratic HPLC-UV method for the simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in animal tissue. *Acta Chromatographica* 2017; 32 (1): 478-489.
28. Beyersmann D, Hechtenberg S. Cadmium, gene regulation, and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 144: 247-61.
29. Birnbaumer L, Zurita AR. On the roles of Mg in the activation of G proteins. *J Recept Signal Transduct Res* 2010; 30 (6): 372-5.
30. Blackburn NJ, Yan Z, Lutsenko S. Copper in Eukaryotes. In: Wedd A, Maret W. (Eds.). *Binding, transport and storage of metal ions in biological cells*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry. 2014; p. 524-55.
31. Blanco AM, Guerri C. Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL-1RI receptors. *Front Biosci* 2007; 12: 2616-30.

32. Bolumar F, Olsen J, Boldsen J. For the European group on infertility and subfecundity: smoking reduces fecundity: a European multicenter study on infertility and subfecundity. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 578-87.
33. Bonda E, Wlostowski T, Krasowska A. Testicular toxicity induced by dietary cadmium is associated with decreased testicular zinc and increased hepatic and renal metallothionein and zinc in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Biometals* 2004; 17: 615-24.
34. Bonnel JA. Emphysema and proteinuria in man casting copper-cadmium alloys. *Br J Ind Med* 1955; 12: 181-97.
35. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 951-65.
36. Brzóska MM, Gałazyn-Sidorczuk M, Dzwilewska I. Ethanol consumption modifies the body turnover of cadmium: a study in a rat model of human exposure. *J Appl Toxicol* 2013; 33(8): 784-98.
37. Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Jurczuk M, Gałazyn-Sidorczuk M, Rogalska J. Effect of short-term ethanol administration on cadmium retention and bioelement metabolism in rats continuously exposed to cadmium. *Alcohol Alcohol* 2000; 35(5): 439-45.
38. Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Jurczuk M, Gałazyn-Sidorczuk M. Cadmium turnover and changes of zinc and copper body status of rats continuously exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol Alcohol* 2002; 37 (3): 213-21.
39. Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem. Toxicol* 2001; 39 (10): 967-80.
40. Bulmer FMR, Rothwell HE, Frankish ER. Industrial cadmium poisoning. *Can Public Health J* 1938; 29: 19-26.
41. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15: 186-90.
42. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 1989; 58: 79-110.
43. Carreau S, Isabelle GD. Transcripts of aromatase and estrogen receptors and significance of other RNAs in human spermatozoa. *Arch Androl* 2007; 53 (5): 249-55.
44. Casalino E, Calzaretto G, Sblano C, Landriscina C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicol* 2002; 179: 37-50.
45. Casalino E, Calzaretto G, Sblano L, Landriscina C. Cadmium dependent enzyme activity alteration is not imputable to lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 2000; 383: 288-95.
46. Casalino E, Sblano C, Landriscina V, Calzaretto G, Landriscina C. Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. *Toxicol* 2004; 200: 29-38.
47. Cederbaum A. Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible role in alcohol hepatotoxicity. *Alcohol Alcohol Suppl* 1991; 1: 291-6.
48. Cederbaum A. Role of CYP2E1 in ethanol-induced oxidant stress, fatty liver and hepatotoxicity. *Dig Dis* 2010; 28(6): 802-11.

49. Chaudhuri JD. Alcohol and the developing fetus—a review. *Med Sci Monit* 2000; 6(5): 1031-41.
50. Chen H, Tappel AL. Protection by vitamin E, selenium, trolox C, ascorbic acid palmitate, acetylcysteine, coenzyme Q0, coenzyme Q10, beta-carotene, canthaxantine, and (+)-catechin against oxidative damage to rat blood and tissues in vivo. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 949-53.
51. Chen H, Zirkin BR. Long-term suppression of Leydig cell steroidogenesis prevents Leydig cell aging. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1999; 96: 14877-81.
52. Chen D, Cui QC, Yang H, Dou QP. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res* 2006; 66(21): 10425-33.
53. Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli–germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002; 82: 825-74.
54. Cheng D, Liang B, Li M, Jin M. Influence of laminarin polysaccharides on oxidative damage. *Int J Biol Macromol* 2011; 48(1): 63-6.
55. Cherian MG, Kang YJ. Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp Biol Med* 2006; 231: 138-44.
56. Chia SE, Lim ST, Tay SK, Lim ST. Factors associated with male infertility: a case control study of 218 infertile and 240 fertile men. *BJOG* 2000; 107: 55-61.
57. Chia SE, Tay SK, Lim ST. What constitutes a normal seminal analysis? Semen parameters of 243 fertile men. *Hum Reprod* 1998; 13: 3394-8.
58. Chiquoine AD. Observations on the early events of cadmium necrosis of the testis. *Anat Rec* 1964; 149: 23-35.
59. Chiriboga CA. Fetal alcohol and drug effects. *Neurologist* 2003; 9(6): 267-79.
60. Chung RS, West AK. A role for extracellular metallothioneins in CNS injury and repair. *Neurosci* 2004; 123: 595-9.
61. Cohen DJ, Da Ros VG, Busso D, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, Cuasnicú PS. Participation of epididymal cysteine-rich secretory proteins in sperm-egg fusion and their potential use for male fertility regulation. *Asian J Androl* 2007; 9 (4): 528-32.
62. Cornwall GA, Von Horsten HH, Whelley S. Cystatin-related epididymal spermatogenic aggregates in the epididymis. *J Androl* 2011; 32 (6): 679-85.
63. Ćorović V. *Istorija srpskog naroda* 2001; Ars Libri, Beograd.
64. Craig J, McClain MD, Le-Chu Su. Zinc deficiency in the alcoholic. *JAMA* 1983; 250 (1): 5-10.
65. Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr* 2001; 20: 591-8.
66. Cunningham CC, Bailey SM. Ethanol consumption and liver mitochondria function. *Biological Signals and Receptors* 2001; 10 (3–4): 271-82.
67. Cupertino MC, Novaes RD, Santos EC, Bastos DSS, Santos DCM, Fialho MCK. Cadmium-induced testicular damage is associated with mineral imbalance, increased antioxidant enzymes activity and protein oxidation in rats. *Life Sciences* 2017; 175: 23-30.

68. Curtis KM, Savitz DA, Arbuckie TE. Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 32-41.
69. Dalecki AG, Haeili M, Shah S, Speer A, Niederweis M, Kutsch O. Disulfiram and copper ions kill mycobacterium tuberculosis in a synergistic manner. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(8): 4835-44.
70. Dalton T, Fu K, Enders GC, Palmiter RD, Andrews GK. Analysis of the effects of overexpression of metallothionein-I in transgenic mice on the reproductive toxicology of cadmium. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 68-76.
71. Danielson KG, Ohi S, Huang PC. Immunochemical detection of metallothionein in specific epithelial cells of rat organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 2301-4.
72. Darbre PD. Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *J Appl Toxicol* 2006; 26: 191-7.
73. Das SK, Nayak P, Vasudevan DM. Consequences of ethanol consumption. *J Indian Soc Toxicol* 2005; 1: 1-10.
74. De SK, Enders GC, Andrews GK. High levels of metallothionein messenger RNAs in male germ cells of the adult mouse. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 628-36.
75. Debnath D, Mandal TK. Study of quinalphos (an environmental oestrogenic insecticide) formulation (Ekalux 25 E.C.)—induced damage of the testicular tissues and antioxidant defense systems in Sprague–Dawley albino rats. *J Appl Toxicol* 2000; 20: 197-204.
76. Deitrich RA, Erwin VG. Mechanism of the inhibition of aldehyde dehydrogenase in vivo by disulfiram and diethyldithiocarbamate. *Mol Pharmacol* 1971; 7 (3): 301-7.
77. Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology*. 2006; 43(2):S63-74.
78. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and tiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1019-26.
79. Djukić M, Jovanović M, Nedeljković M, Ignjatović S, Antonijević B. Influence of a two week disulfiram treatment on GGT and ALP activities in alcoholics. *Jugoslav Med Biochem* 1999; 18: 161-5.
80. Djukic M, Ninkovic M, Jovanovic M. Oxidative stress – clinical diagnostic significance. *J Mol Biol* 2008; 27: 4.
81. Djukic MM, Jovanovic MD, Ninkovic M, Stevanovic I, Ilic K, Curcic M, Vekic J. Protective role of glutathione reductase in paraquat induced neurotoxicity. *Chem Biol Interact* 2012; 199(2): 74-86.
82. Djukic-Cosic D, Ninkovic M, Malicevic Z, Plamenac-Bulat Z, Matovic V. Effect of supplemental magnesium on the kidney levels of cadmium, zinc and copper of mice exposed to toxic levels of cadmium. *Biol Trace Elem Res* 2006; 114: 281-91.
83. Djuric A, Smaic A, Gobeljic B, Ninkovic M, Stanojevic I, Vojvodic D, Pantelic A, Zebic G, Prokic V, Dejanovic B, Stojanovic I, Pavlica M, Djukic D, Saso L, Djurdjevic D, Pavlovic M, Topic A, Vujanovic D, Stevanovic I, Djukic M. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. *Food Chem Toxicol* 2015; 86: 25-33.

84. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. Karakteristike slobodnih radikala. U: Biohemija slobodnih radikala. Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu; 2000. p. 6-87.
85. Dosumu OO, Akinola OB, Akang EN. Alcohol-induced testicular oxidative stress and cholesterol homeostasis in rats – the therapeutic potential of virgin coconut oil. *Middle East Fertil Society J* 2012; 17: 122-8.
86. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
87. Dupont I, D Klucas, P Clot, C Menez, E Albano Cytochrome P4502E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics *Journal of Hepatology* 1998; 28: 564-71.
88. Dzobo K, Yogeshkumar NS. Effect of selenium on cadmium induced oxidative stress and esteraseactivity in rat organs: research article. In: *South African Journal of Science* 2013; 109(5,6): 1-8.
89. Ekhoje EI, Nwangwaand EK, Aloamaka CP. Changes in some testicular biometric parameters and testicular function in cadmium chloride administered Wistar rats. *Br Med Med Res* 2013; 3(4): 2031-41.
90. Emanuele MA, Emanuele N. Alcohol and the male reproductive system. *Alcohol Res Health* 2001; 25 (4): 282-7.
91. Eneanya DI, Bianchine JR, Duran DO, Andresen BD. The actions of metabolic fate of disulfiram. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1981; 21: 575-96.
92. Fidaleo M. Peroxisomes and peroxisomal disorders: the main facts. *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62(6): 615-25.
93. Francielli W, Santos FW, Oro T, Zeni G, Rocha JBT, do Nascimento PC, Nogueira CW. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicol Lett* 2004; 152(3): 255-63.
94. Freisinger E, Vašák M. Cadmium in metallothioneins. *Met Ions Life Sci* 2013; 11: 339-71.
95. Friberg L. Proteinuria and kidney injury among workers exposed to cadmium and nickel dust. *J Ind Hyg Toxicol* 1948; 30: 32-6.
96. Frick J, Aulitzky W. Physiology of the prostate. *Infection* 1991; 19 Suppl 3: S115-8.
97. Gao Y, Xiao X, Lui WY, Lee WM, Mruk D, Cheng CY. Cell polarity proteins and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2016; pii: S1084-9521 (16)30170-7.
98. Gaval-Cruz M, Weinshenker D. Mechanisms of disulfiram-induced cocaine abstinence: antabuse and cocaine relapse. *Mol Interv* 2009; 9 (4): 175-87.
99. Girotti M, Khan N, McLellan B. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991; 31:32-5.
100. Giustarini D, Galvagni F, Tesei A, Farolfi A, Zanoni M, Pignatta S, Milzani A, Marone IM, Dalle-Donne I, Nassini R, Rossi R. Glutathione, glutathione disulfide, and S-glutathionylated proteins in cell cultures. *Free Radical Biology and Medicine* 2015; 89: 972-81.

101. Goering P, Waalkes M, Klaasen C. Toxicology of cadmium. In: Goyer R, Cherian M. (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology: Toxicology of metals, biochemical effects*, 1994; vol. 115. Springer-Verlag, New York, pp. 189-214.
102. Goldstein G, Tarter RE, Shelly C, Alterman AI, Petrarulo E. Withdrawal seizures in black and white alcoholic patients: intellectual and neuropsychological sequelae. *Drug Alcohol Depend* 1983; 12(4): 349-54.
103. Gonzalez-Reimers E, Martinez-Riera A, Santolaria-Fernandez F, Mas-Puscual A, Rodriguez-Moreno F, Galindo-Martin L, Molina-Perez M, Barros-Lopez N. Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on zinc, iron, copper, and manganese contents in different organs and urinary and fecal excretion. *Alcohol* 1998; 16: 7-12.
104. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196(2-3): 143-51.
105. Gottesfeld Z. Sympathetic neural response to immune signals involves nitric oxide: effects of exposure to alcohol in utero. *Alcohol* 1998; 16(2): 177-81.
106. Goverde HJM, Dekker HS, Janssen HJG, Bastiaans BA, Rolland R, Zielhuis GA. Semen quality and frequency of smoking and alcohol consumption \pm an explorative study. *Int J Fertil* 1995; 40: 135-8.
107. Goyer RA, Liu J, Waalkes MP. Cadmium and cancer of prostate and testis. *BioMetals* 2004; 17: 555-8.
108. Griffith OW. Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 922-35.
109. Gu W, Hecht NB. Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *J Androl* 1996; 17: 256-62.
110. Gunn S, Gould T. Cadmium and other mineral elements. In: Johnson A, Gomes W, Van Demark N. (Eds.). *The Testis: Influencing Factors*. Academic Press 1970; New York.
111. Gunnarsson D, Nordberg G, Lundgren P, Selstam G. Cadmium-induced decrement of the LH receptor expression and cAMP levels in the testis of rats. *Toxicol* 2003; 183: 57-63.
112. Gunnarsson D, Nordberg G, Selstam G. Differential effects of cadmium on the gene expression of seven-transmembrane-spanning receptors and GAPDH in the rat testis. *Toxicol Lett* 2007; 168: 51-7.
113. Gupta RS, Gupta ES, Dhakal BK, Thakur AR, Ahnn J. Vitamin C and Vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Mol cells* 2004;17: 132-9.
114. Gur S, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Purinergic (P2) receptor control of lower genitourinary tract function and new avenues for drug action: an overview. *Curr Pharm Des* 2007; 13(31): 3236-44.
115. Gurd JW, Jones LR, Mahler HR, Moore WJ. Isolation and partial characterization of rat brain synaptic membrane. *J Neurochem* 1974; 22: 281-90.

116. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak PF, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New Engl J Med* 2001; 345: 1388-93.
117. Hald J, Jacobsen E. A drug sensitizing the organism to ethyl alcohol. *Lancet* 1948; 2: 1001-4.
118. Hales BD. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol* 2002; 57: 3-18.
119. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4rd edition New York: Oxford University Press; 2007.
120. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, Third edition, Oxford University Press Inc., New York, USA; 1999. p. 1-936.
121. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press (Clarendon). 1989; pp. 221-38.
122. Han J, Liu L, Yue X, Chang J, Shi W, Hua Y. A binuclear complex constituted by diethyldithiocarbamate and copper(I) functions as a proteasome activity inhibitor in pancreatic cancer cultures and xenografts. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 273(3): 477-83.
123. Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab Rev* 2006; 38: 171-96.
124. Haouem S, Najjar M, Hani A, Sakly R. Accumulation of cadmium and its effects on testis function in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 59: 307-11.
125. Harris C, Hansen JM. Oxidative stress, thiols, and redox profiles. *Methods Mol Biol* 2012; 889: 325-46.
126. Hart BW, Faiman MD. Bioactivation of S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate to S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate sulfoxide. Implications for the role of cytochrome P450. *Biochem Pharmacol* 1993; 46(12): 2285-90.
127. Henson MC, Chedrese PJ. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med* 2004; 229: 383-92.
128. Hew KW, Ericson WA, Welsh MJ. A single low cadmium dose cause failure of spermiation in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 121: 15-21.
129. Hew KW, Heath GL, Jiwa AH, Welsh MJ. Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 1993b; 49: 840-9.
130. Hider RC, Kong X. Iron: effect of overload and deficiency. *Met Ions Life Sci* 2013; 13: 229-94.
131. Hogstrand C, Fu D. Zinc. In: Wedd A, Maret W. (Eds.). *Binding, transport and storage of metal ions in biological cells*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry. 2014; p. 666-94.
132. Honma T, Suda M. Correlation of lethal doses of industrial chemicals between oral or intraperitoneal administration and inhalation exposure. *Ind Health* 1998; 36: 273-281.

133. Hsieh Y, Guan Y, Tu C, Bratt PJ, Angerhofer JR, Lepock M, Hickey MJ, Tainer JA, Nick HS, Silverman DN. Probing the active site of human manganese superoxide dismutase: the role of glutamine 143. *Biochemistry* 1998; 37: 4731-9.
134. Hu H. Exposure to metals. *Prim Care* 2000; 27: 983-96.
135. IARC. International agency for research on cancer monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. vol. 58. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. Lyons, France: IARC Scientific Publications; 1993. p. 119-238.
136. Ischi T, Matsuki S, Iuchi Y, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, Ikeda Y, Fujii J. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1- knockout mice under heat stress. *Free Radic Res* 2005; 39: 695-705.
137. Ishizaki A. On the so called itai-itai disease. *J Jpn Med Soc* 1969; 62: 242-9.
138. Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *JNCI* 1997; 89: 238-44.
139. Jihen E, Imed M, Fatima H, Abdelhamid K. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: Histology and Cd accumulation. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 3522-7.
140. Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 3145-75.
141. Katen AL, Roman SD. The genetic consequences of paternal acrylamide exposure and potential for amelioration. *Mutat Res* 2015; 777: 91-100.
142. Kaur P, Bansal MP. Effect of experimental oxidative stress on steroidogenesis and DNA damage in mouse testis. *J Biomed Sci* 2004; 11: 391-7.
143. Keen JH, Jakoby WB. Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J Biol Chem.* 1978; 253(16): 5654-7.
144. Kelley C. Cadmium therapeutic agents. *Curr Pharm Des* 1999; 5: 229-40.
145. Kini RD, Tripathi Y, Raghuvver CV, Pai SR, Ramaswamy C, Kamath P. Role of Vitamin C as an antioxidant in cadmium chloride induced testicular damage. *Int J Appl Biol Pharm Techn* 2011; 2(3): 484-8.
146. Kitson TM. Effect of some thiocarbamate compounds on aldehyde dehydrogenase and implications for the disulfiram ethanol reaction. *Biochem J* 1991; 278(Pt 1): 189-92.
147. Kitson TM. Mechanism of inactivation of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Biochem J* 1983; 213(2): 551-4.
148. Kitson TM. The effect of disulfiram on the aldehyde dehydrogenases of sheep liver. *Biochem J* 1975; 151(2): 407-12.
149. Klaassen CD, Kiu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 267-94.

150. Klein SM, Cohen G, Lieber CS, Cederbaum AI. Increased microsomal oxidation of hydroxyl radical scavenging agents and ethanol after chronic consumption of ethanol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1983; 223: 425-32.
151. Klimisch H. Lung deposition, lung clearance and renal accumulation of inhaled cadmium chloride and cadmium sulphide in rats. *Toxicol* 1993; 84: 103-24.
152. Koizumi T, Li ZG. Role of oxidative stress in single-dose, cadmium induced testicular cancer. *J Toxicol Environ Health* 1992; 37: 25-36.
153. Kojima S, Sugimura Y, Hirukawa H, Kiyozumi M, Shimada H, Funakoshi T. Effects of dithiocarbamates on testicular toxicity in rats caused by acute exposure to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 116: 24-9.
154. Kojima S, Sugimura Y, Ono H, Shimada H, Funakoshi T. N-benzyl-D-glucamine dithiocarbamate and N-p-isopropylbenzyl-D-glucamine dithiocarbamate improve the protective effect of diethyldithiocarbamate against cadmium-induced testicular toxicity in rats. *Biol Pharm Bull* 1993; 16(3): 244-7.
155. Kona FR, Buac D, M Burger A. Disulfiram, and disulfiram derivatives as novel potential anticancer drugs targeting the ubiquitin-proteasome system in both preclinical and clinical studies. *Curr Cancer Drug Targets* 2011; 11(3): 338-46.
156. Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev* 2012; 64(3): 520-39.
157. Kosman DJ. Redox cycling in iron uptake, efflux, and trafficking. *J Biol Chem* 2010; 285(35): 26729-35.
158. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1997-2015.
159. Kukielka E, Dicker E, Cederbaum AI. Increased production of reactive oxygen species by rat mitochondria after chronic ethanol treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1994; 309: pp. 377-86.
160. Kulikowska-Karpińska E, Moniuszko-Jakoniuk J, Rogalska J. The influence of cadmium on the peroxidation of lipids in rats. *Acta Polonica Toxicologica* 1997; 5: 41-5.
161. Kulikowska-Karpińska E, Moniuszko-Jakoniuk J. Lead and zinc influence on antioxidant enzyme activity and malondialdehyde concentration. *Polish Journal of Environmental Studies* 2001; 10: 161-5.
162. Kusakabe T, Nakajima K, Suzuki K, Nakazato K, Takada H, Satoh T, Oikawa M, Kobayashi K, Koyama H, Arakawa K, Nagamine T. The changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure. *BioMetals* 2008; 21: 71-81.
163. Lafuente A, Cano P, Esquifino A. Are cadmium effects on plasma gonadotropins, prolactin, ACTH, GH and TSH levels, dose-dependent? *BioMetals* 2003; 16: 243-50.

164. Lafuente A, Gonza'lez-Carracedo A, Romero A, Cano P, Esquifino AI. Cadmium exposure differentially modifies the circadian patterns of norepinephrine at the median eminence and plasma LH, FSH and testosterone levels. *Toxicol Lett* 2004; 14: 175-82.
165. Lafuente A, Marquez N, Perez-Lorenzo M, Pazo D, Esquifino AI. Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic–pituitary–testicular axis function in the rat. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 913-23.
166. Laskey JW, Phelps PV. Effect of cadmium and other metal cations on in vitro Leydig cell testosterone production. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 108: 296-306.
167. Laskey JW, Rehnberg GL, Laws SC, Hein JF. Reproductive effects of low acute doses of cadmium chloride in adult male rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 73: 250-5.
168. Leverrier P, Montigny C, Garrigos M, Champeil P. Metal binding to ligands: cadmium complexes with glutathione revised. *Anal Biochem* 2007; 371: 215-28.
169. Lewis GP, Jusko WJ, Coughlin LL, Hartz S. Cadmium accumulation in man: influence of smoking, occupation, alcoholic habit and disease. *J Chronic Dis* 1972; 25: 717-26.
170. Li L, Yang H, Chen D, Cui C, Dou QP. Disulfiram promotes the conversion of carcinogenic cadmium to a proteasome inhibitor with pro-apoptotic activity in human cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008; 229: 206-14.
171. Li Y, Wang S, Ni HM, Huang H, Ding WX. Autophagy in alcohol-induced multiorgan injury: mechanisms and potential therapeutic targets. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 498491.
172. Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 673-702.
173. Lin J, Haffner MC, Zhang Y, Lee BH, Brennen WN, Britton J, Kachhap SK, Shim JS, Liu JO, Nelson WG, Yegnasubramanian S, Carducci MA. Disulfiram is a DNA demethylating agent and inhibits prostate cancer cell growth. *Prostate* 2011; 71(4): 333-43.
174. Lin LZ, Lin J. Antabuse (disulfiram) as an affordable and promising anticancer drug. *Int J Cancer* 2011; 129(5): 1285-6.
175. Lipiński P, Starzyński RR, Styś A, Gajowiak A, Staroń R. Heme metabolism as an integral part of iron homeostasis. *Postepy Hig Med Dosw* 2014; 68: 557-70.
176. Lipsky JJ, Shen ML, Naylor S. In vivo inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Chem Biol Interact* 2001; 130-132(1-3): 93-102.
177. Liu J, Corton C, Dix DJ, Liu Y, Waalkes MP, Klaassen CD. Genetic background but not metallothionein phenotype dictates sensitivity to cadmium-induced testicular injury in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 176: 1-9.
178. Liu GY, Frank N, Bartsch H, Lin JK. Induction of apoptosis by thiuramdisulfides, the reactive metabolites of dithiocarbamates, through coordinative modulation of NFkappaB, c-fos/c-jun, and p53 proteins. *Mol Carcinog* 1998; 22(4): 235-46.
179. Longnecker MP, Tseng M. Alcohol, hormones, and postmenopausal women. *Alcohol Health Res World* 1998; 22(3): 185-9.
180. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265-75.

181. Luchese C, Pinton S, Nogueira C. Brain and lungs of rats are differently affected by cigarette smoke exposure: antioxidant effect of an organoselenium compound. *Pharmacol Res* 2009; 59: 194-201.
182. Luo L, Chen H, Trush MA, Show MD, Anway MD, Zirkin BR. Aging and the Brown Norway rat Leydig cell antioxidant defense system. *J Androl* 2006; 27: 240-7.
183. Maiorino M, Bosello V, Ursini F, Foresta C, Garolla A, Scapin M, Sztajer H, Flohe L. Genetic variations of gpx-4 and male infertility in humans. *Biol Reprod* 2003; 68: 1134-41.
184. Mak V, Jarvi K, Buckspan M, Freeman M, Hechter S, Zini A. Smoking is associated with the retention of cytoplasm by human spermatozoa. *Urol* 2000; 56: 463-6.
185. Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian J Physiol Pharmacol* 2006; 50: 291-6.
186. Maneesh M, Jayalekshmi H, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Effect of chronic ethanol administration on testicular antioxidant system and steroidogenic enzyme activity in rats. *Indian J Exp Biol* 2005; 43(5): 445-9.
187. Mankhetkorn S, Abedinzadeh Z, Houee-Levin C. Antioxidant action of sodium diethyldithiocarbamate: reaction with hydrogen peroxide and superoxide radical. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 517-27.
188. Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* 2011; 10: 1378-84.
189. Maret W, Wedd A. Binding, transport and storage of metal ions in biological cells. *RSC Metallobiology* 2014.
190. Maretová E, Maretta M, Legáth J. Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: a review. *Anim Reprod Sci* 2015; 155: 1-10.
191. Marikovsky M, Ziv V, Nevo N, Harris-Cerruti C, Mahler O. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. *J Immunol* 2003; 170(6): 2993-3001.
192. Marinelli D, Gaspari L, Pedotti P, Taioli E. Mini-review of studies on the effect of smoking and drinking habits on semen parameters. *Int J Hyg Environ Health* 2004; 207: 185-92.
193. Martelli A, Rousselet E, Dycke C, Bouron A, Moulis JM. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 2006; 88 (11): 1807-14.
194. Martin MB, Voeller HJ, Gelmann EP, Lu J, Stoica EG, Hebert EJ, Reiter R, Singh B, Danielsen M, Pentecost E, Stoica A. Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity. *Endocrinol* 2002; 143: 263-75.
195. Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Lakota P. Influence of chemical elements on mammalian spermatozoa. *Folia Biol (Praha)* 2012; 58(1): 7-15.
196. Mason KE, Brown JA, Young JO, Nesbit RR. Cadmium-induced injury of the rat testis. *Anat Rec* 1964; 149: 135-48.
197. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999; 4: 339-45.

198. Mates M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol* 2000; 153: 83-104.
199. Mattison DR. The effects of smoking on fertility from gametogenesis to implantation. *Environ Res* 1982; 28: 410-33.
200. Mawhinney M, Mariotti A. Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontol* 2000 2013; 61(1): 232-51.
201. Mays DC, Nelson AN, Lam-Holt J, Fauq AH, Lipsky JJ. S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate sulfoxide and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate sulfone, two candidates for the active metabolite of disulfiram. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20(3): 595-600.
202. Mays DC, Ortiz-Bermudez P, Lam JP, Tong IH, Fauq AH, Lipsky JJ. Inhibition of recombinant human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by two intermediate metabolites of disulfiram. *Biochem Pharmacol* 1998; 55(7): 1099-103.
203. McElroy JA, Shafer MM, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Newcomb PA. Cadmium exposure and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 869-73.
204. McKenna IM, Bare RM, Waalkes MP. Metallothionein gene expression in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium. *Toxicol* 1996; 107: 121-30.
205. McLaren A. Germ cells and germ cell transplantation. *Int J Dev Biol* 1998; 42(7): 855-60.
206. Meinhardt A, Bacher M, Wennemuth G, Eickhoff R, Hedger M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a paracrine mediator in the interaction of testicular somatic cells. *Andrologia* 2000; 32(1): 46-8.
207. Merino G, Lira SC, Martinez-Chequer JC. Effects of cigarette smoking on semen characteristics of a population in Mexico. *Arch Androl* 1998; 41: 11-5.
208. Misra RR, Hochadel JF, Smith GT, Cook JC, Waalkes MP, Wink DA. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 326-32.
209. Mohamed D, Saber A, Omar A, Soliman A. Effect of cadmium on the testes of adult Albino rats and the ameliorating affect of zinc and vitamin E. *Br J Sci* 2014; 11(1): 72-94.
210. Montoliu C, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C. Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain. Effect of chronic ethanol consumption *Journal of Neurochemistry* 1994; 63: 1855-62.
211. Morawska A, Król A, Gomólka E, Piekoszewski W, Kamenczak A. Disturbances of zinc homeostasis among alcoholics. *Problems of Forensic Sciences* 2003; 55: 120-30.
212. Moulis JM. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals* 2010; 23(5): 877-96.
213. Mruk DD, Silvestrini B, Cheng CY. Anchoring junctions as drug targets: role in contraceptive development. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 146-80.
214. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY. Antioxidant superoxide dismutase - A review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* 2002; 65: 305-11.

- 215.** Munday R. Bioactivation of thiols by one-electron oxidation. *Adv Pharmacol* 1994; 27: 237-70.
- 216.** Munday R. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 659-73.
- 217.** Nagamine T, Nakazato K, Suzuki K, Kusakabe T, Sakai T, Oikawa M, Satoh T, Kamiya T, Arakawa K. Analysis of tissue cadmium distribution in chronic cadmium-exposed mice using in-air micro-PIXE. *Biol Trace Elem Res* 2007; 117(1-3): 115-26.
- 218.** Nagy EM, Ronconi L, Nardon C, Fregona D. Noble metal-dithiocarbamates precious allies in the fight against cancer. *Mini Rev Med Chem* 2012; 12(12): 1216-29.
- 219.** Nair N, Bedwal S, Prasad S, Saini MR, Bedwal RS. Short-term zinc deficiency in diet induces increased oxidative stress in testes and epididymis of rats. *Indian J Exp Biol* 2005; 43(9): 786-94.
- 220.** Nigam D, Shukla GS, Agarwal AK. Glutathione depletion and oxidative damage in mitochondria following exposure to cadmium in rat liver and kidney. *Toxicol Lett* 1999; 106: 151-7.
- 221.** Nikolić I. Muški i ženski reproduktivni sistem. U: Osnovna i oralna histologija i embriologija. Data Status, Beograd; 2014. p. 291-5.
- 222.** Nishimura H, Nishimura N, Tohyama C. Localization of metallothionein in the genital organs of the male rat. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 927-33.
- 223.** Nordmann R, Ribière C, Rouach H. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol* 1990; 25(2-3): 231-7.
- 224.** Nordsblom GD, Coon MJ. Hydrogen peroxide formation and stoichiometry of hydroxylation reactions catalyzed by highly purified liver microsomal cytochrome P450. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997; 180: 343-7.
- 225.** Ognjanovic B, Markovic S, Djordevic N, Trbojevic I, Stajna A, Saicicb Z. Cadmium induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reproductive Toxicol* 2010; 29: 191-7.
- 226.** Ola-Mudathir KF, Suru SM, Fafunso MA, Obioha UE, Faremi TY. Protective roles of onion and garlic extracts on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 3604-11.
- 227.** Oldereid NB, Rui H, Purvis K. Life styles of men in barren couples and their relationship to sperm quality. *Int J Fertil* 1992a; 37: 343-9.
- 228.** Oldereid NB, Rui H, Purvis K. Life styles of men in barren couples and their relationship to sperm quality. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992b; 43: 51-7.
- 229.** Oliva SU, Messias AG, Silva DA, Pereira OC, Gerardin DC, Kempinas WG. Impairment of adult male reproductive function in rats exposed to ethanol since puberty. *Reprod Toxicol* 2006; 22(4): 599-605.
- 230.** Olufunke O, Dosumu A, Oluwole B, Akinola B, Edidiong N. AkangAlcohol-induced testicular oxidative stress and cholesterol homeostasis in rats – The therapeutic potential of virgin coconut oil. *Middle East Fertility Society Journal* 2012; 17: 122-8.

- 231.** Ondarza RN, Rendón JL, Ondarza M. Glutathione reductase in evolution. *J Mol Evol* 1983; 19(5): 371-5.
- 232.** Oner-Iyidogan Y, Gurdol F, Oner P. The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enzyme activities in rat testes. *Pharmacol Res* 2001; 44: 44-9.
- 233.** Ono H, Funakoshi T, Shimada H, Kojima S. Comparative effects of disulfiram and diethyldithiocarbamate against testicular toxicity in rats caused by acute exposure to cadmium. *J Toxicol Environ Health* 1997; 50(4): 389-99.
- 234.** Oremosu AA, Akang EN. Impact of alcohol on male reproductive hormones, oxidative stress and semen parameters in Sprague–Dawley rats. *Middle East Fertility Society Journal* 2014.
- 235.** Pal R, Nath R, Gill KD. Influence of ethanol on cadmium accumulation and its impact on lipid peroxidation and membrane bound functional enzymes (Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase) in various regions of adult rat brain. *Neurochemical Investigation* 1993; 23: 451-8.
- 236.** Pan J, Plant JA, Voulvoulis N, Oates CJ, Ihlenfeld C. Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environ Geochem Health* 2010; 32(1): 1-12.
- 237.** Pandey M. Environmental pollutants in gallbladder carcinogenesis. *J Surg Oncol* 2006; 93: 640-3.
- 238.** Pandya C, Pillai P, Nampoothiri LP, Bhatt N, Gupta S, Gupta S. Effect of lead and cadmium co-exposure on testicular steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats. *Andrologia* 2012; 44(1): 813-22.
- 239.** Parizek J. Sterilization of the male by cadmium salts. *J Reprod Fertil* 1960; 1: 294-309.
- 240.** Parizek J. Vascular changes at sites of oestrogen biosynthesis produced by parenteral injections of cadmium salts. *J Reprod Fertil* 1965; 7: 263-5.
- 241.** Parris M, Kidd PD. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern Med Rev* 1997; 2: 155-76.
- 242.** Peltola V, Huhtaniemi I, Ketala TM, Ahotupa M. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology* 1996; 137: 105-12.
- 243.** Pérez-Gallardo RV, Briones LS, Díaz-Pérez AL, Gutiérrez S, Rodríguez-Zavala JS, Campos-García J. Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron–sulfur cluster assembly system. *FEMS Yeast Res* 2013; 13: 804-19.
- 244.** Ploemen JP, van Iersel ML, Wormhoudt LW, Commandeur JN, Vermeulen NP, van Bladeren PJ. In vitro inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by disulfiram and diethyldithiocarbamate. *Biochem Pharmacol* 1996; 52(2): 197-204.
- 245.** Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJA. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291: R491-R511.
- 246.** Qian X, Mruk DD, Cheng YH, Tang EI, Han D, Lee WM, Wong EW, Cheng CY. Actin binding proteins, spermatid transport and spermiation. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 30: 75-85.

247. Quertemont E, Tambour S, Tirelli E. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. *Prog Neurobiol* 2005; 75: 247-74.
248. Quertemont E, Eriksson CJ, Zimatkin SM, Pronko PS, Diana M, Pisano M, Rodd ZA, Bell RR, Ward RJ. Is ethanol a pro-drug? Acetaldehyde contribution to brain ethanol effects. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29(8): 1514-21.
249. Quig D. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern Med Rev* 1998; 3: 262-70.
250. Rahden-Staron E, Grosicka-Macia G, Kurpios-Piec D, Czczot H, Grzela T, Szumiło M. The effects of sodium diethyldithiocarbamate in fibroblasts V79 cells in relation to cytotoxicity, antioxidative enzymes, glutathione, and apoptosis. *Arch Toxicol* 2012; 86: 1841-50.
251. Rana SV, Verma S. Protective effects of GSH, Vitamin E and selenium on lipid peroxidation in cadmium fed rats. *Biol Trace Elem Res* 1996; 51: 161-8.
252. Razi M, Malekinejad H. Varicocele-Induced Infertility in Animal Models. *Int J Fertil Steril* 2015; 9(2): 141-9.
253. Ren X, Wang G, Xu D, Luo K, Liu Y, Zhong Y, Cai Y. The protection of selenium on cadmium-induced inhibition of spermatogenesis via activating testosterone synthesis in mice. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 3521-9.
254. Ren XY, Zhou Y, Zhang JP, Feng WH, Jiao BH. Expression of metallothionein gene at different time in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium. *World J Gastroenterol* 2003a; 9: 1554-8.
255. Ren XY, Zhou Y, Zhang JP, Feng WH, Jiao BH. Metallothionein gene expression under different time in testicular sertoli and spermatogenic cells of rats treated with cadmium. *Reprod Toxicol* 2003; 17: 219-27.
256. Robaire B, Henderson NA. Actions of 5alpha-reductase inhibitors on the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250(1-2): 190-5.
257. Romani A. Magnesium. In: Wedd A, Maret W, editors. *Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 2014. p. 83-122.
258. Rosenblum ER, Gavalier JS, Van Thiel DH. Lipid peroxidation: a mechanism for alcohol-induced testicular injury. *Free Radic Biol Med* 1989; 7(5): 569-77.
259. Rotter I, Kosik-Bogacka D, Dołęgowska B, Safranow K, Lubkowska A, Laszczyńska M. Relationship between the concentrations of heavy metals and bioelements in aging men with metabolic syndrome. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12(4): 3944-61.
260. Rubes J, Lowe X, Moore D, Perreault S, Slott V, Evenson D, Selevan SG, Wyrobek AJ. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil Steril* 1998; 70: 715-23.
261. Rubin E, Beattie DS, Toth A, Lieber CS. Structural and functional effects of ethanol on hepatic mitochondria. *Federation Proceedings* 1972; 31: 131-40.

- 262.** Rukkumani R, Aruna K, Suresh-Varma P, Menon VP. Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant-antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 551-61.
- 263.** Salehi-Ashtiani K, Widrow RJ, Markert CL, Goldberg E. Testis-specific expression of a metallothionein I-driven transgene correlates with undermethylation of the locus in testicular DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8886-90.
- 264.** Sargent S. The aetiology, management and complications of alcoholic hepatitis. *Br J Nurs* 2005; 14(10): 556-62.
- 265.** Satarug S, Moore MR. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1099-103.
- 266.** Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences. *Brazilian J Med Biol Res* 2005; 38: 995-1014.
- 267.** Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1191-212.
- 268.** Schilit S, Benzeroual KE. Silodosin: a selective alpha1A-adrenergic receptor antagonist for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Clin Ther* 2009; 31(11): 2489-502.
- 269.** Schilit S, Benzeroual KE. Silodosin: a selective alpha1A-adrenergic receptor antagonist for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Clin Ther* 2009; 31(11): 2489-502.
- 270.** Schilke B, Voisine C, Beinert H, Craig E. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(18): 10206-11.
- 271.** Schlorff EC, Husain K, Somani SM. Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol* 1999; 18(2-3): 203-14.
- 272.** Schroeder JP, Cooper DA, Schank JR, Lyle MA, Gaval-Cruz M, Ogbonmwan YE. Disulfiram attenuates drug-primed reinstatement of cocaine seeking via inhibition of dopamine β -hydroxylase. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35(12): 2440-9.
- 273.** Sargent O, Griffon B, Cillard P, Cillard J. Alcohol and oxidative stress. *Pathologie Biologie* 2001; 49(9): 689-95.
- 274.** Setchell BP, Waites GMH. Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the "blood-testis barrier" after injection of cadmium chloride in the rat. *J Endocrinol* 1970; 47: 81-6.
- 275.** Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1129S-34S.
- 276.** Shaikh ZA, Vu T, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium induced hepatotoxicity and renal toxicity and prevention by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 154: 256-63.
- 277.** Sharma G, Nath R, Gill KD. Effect ethanol on cadmium-induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver. *Biochemical Pharmacology* 1991; 42(Suppl.): S9-16.

- 278.** Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48: 835-50.
- 279.** Shaw H, Jayatileke E. The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat. *Biochemical Journal* 1990; 268: 579-83.
- 280.** Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2001; 360(Pt 1): 1-16.
- 281.** Shergill JK, Cammack R. ESEEM and ENDOR studies of the Rieske iron-sulphur protein in bovine heart mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1185(1): 35-42.
- 282.** Shi Q, Emanuele NV, Emanuele MA. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on preventing ethanol-induced suppression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the male rat. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22(8): 1763-70.
- 283.** Shiraishi K, Matsuyama H, Takihara H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. *Int J Urol* 2012; 19(6): 538-50.
- 284.** Singhal RK, Anderson ME, Meister A. Glutathione, a first line of defense against Cd toxicity. *FASEB J* 1987; 1: 220-3.
- 285.** Siu ER, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Applied Pharmacol* 2009; 238: 240-9.
- 286.** Songur A, Akpolat N, Kus I, Ozen OA, Zararsiz I, Sarsilmaz M. The effects of the inhaled formaldehyde during the early postnatal period in the hippocampus of rats: a morphological and immunohistochemical study. *Neurosci Res Commun* 2003; 33: 168-78.
- 287.** Spiazzi CC, Manfredini V, Barcellos da Silva FE, Flores Aryele EMM, Izaguirry P, Vargas LM, Soares MB, Santos FW. c-Oryzanol protects against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 55: 526-32.
- 288.** Stajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS. Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja. Udžbenik, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac; 2007. p. 1-449.
- 289.** Stohs S, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Bio Med* 1995; 18: 321-36.
- 290.** Sunderman FW. Nickel and copper mobilization by sodium diethyldithiocarbamate. *J New Drugs* 1964; 4 (3): 154-61.
- 291.** Suzuki JS, Kodama N, Molotkov A, Aoki E, Tohyama C. Isolation and identification of metallothionein isoforms (MT-1 and MT-2) in the rat testis. *Biochem J* 1998; 334: 695-701.
- 292.** Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Słotwińska M, Kamińska T, Sniezko R, Paduch R, Abramczyk D, Filar J, Kandfer-Szerszeń M. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicol* 2000; 145 (2-3): 159-71.
- 293.** Taati M, Alirezaei M, Meshkatsadat MH, Rasoulilian B, Kheradmand A, Neamati Sh. Antioxidant effects of aqueous fruit extract of *Ziziphus jujuba* on ethanol-induced oxidative stress in the rat testes. *Iranian J Vet Res Shiraz Univ* 2011; 12(1): 39-45.

- 294.** Taketo T. The role of sex chromosomes in mammalian germ cell differentiation: can the germ cells carrying X and Y chromosomes differentiate into fertile oocytes? *Asian J Androl* 2015; 17(3): 360-6.
- 295.** Tandon SK, Singh S, Prasad S, Khandekar K, Dwivedi VK, Chatterjee M. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicol Lett* 2003; 145: 211-7.
- 296.** Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathol* 2004; 45: 103-18.
- 297.** Thevenod F. Cadmium and cellular signaling cascade: to be or not to be? *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238: 221-39.
- 298.** Thompson J, Bannigan J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod Toxicol* 2008; 25: 304-315.
- 299.** Thomson AJ, Robinson AE, Johnson MK, Moura JJ, Moura I, Xavier AV. The three-iron cluster in a ferredoxin from *Desulphovibrio gigas*. A low-temperature magnetic circular dichroism study. *Biochim Biophys Acta* 1981; 670(1): 93-100.
- 300.** Thornalley PJ, Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress, kinetics and mechanisms of its reaction with superoxide and hydrogen radicals. *BBA* 1985; 827: 36-44.
- 301.** Thorne PS. Occupational toxicology, in Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons 6th ed. In: Klaassen, C.D. (Ed.). McGraw-Hill, New York, 2001; pp. 1123-40.
- 302.** Thurman RG, Bradford BU, Iimuro Y, Frankenberg MV, Knecht KT, Connor HD, Adachi Y, Wall C, Arteel GE, Raieigh JA, Forman DT, Mason RP. Mechanism of alcohol-induced hepatotoxicity: studies in rats. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4: 42-6.
- 303.** Tohyama C, Nishimura N, Suzuki JS, Karasawa M, Nishimura H. Metallothionein mRNA in the testis and prostate of the rat detected by digoxigenin-labeled riboprobe. *Histochem* 1994; 101: 341-6.
- 304.** Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 145-55.
- 305.** Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1343-74.
- 306.** Trevisiol CH, Turner RT, Pfaff JE, Hunter JC, Menagh PJ, Hardin K, Ho E, Iwaniec UT. Impaired osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. *Bone* 2007; 41: 175-80.
- 307.** Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative Stress: A Common Factor in Testicular Dysfunction. *J Andrology* 2008; 29(5): 488-98.
- 308.** Uhlikova E, Kupcova V, Szantova M, Turecky L. Plasma copper and ceruloplasmin in patients with alcoholic liver steatosis. *Bratisl Lek Listy* 2008; 109(10): 431-3.
- 309.** Ulusu NN, Tandoğan B. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol Cell Biochem* 2007; 303(1-2): 45-51.

- 310.** Uygur R, Yagmurca M, Alkoc OA, Genc A, Songur A, Ucok K, Ozen OA. Effects of quercetin and fish n-3 fatty acids on testicular injury induced by ethanol in rats. *Andrologia* 2014; 46: 356-9.
- 311.** Uygur R, Yagmurca M, Alkoc OA, Genc A, Songur A, Ucok K, Ozen OA. Effects of quercetin and fish n-3 fatty acids on testicular injury induced by ethanol in rats. *Andrologia* 2013; 1-14.
- 312.** Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mayur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
- 313.** Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12(10): 1161-1208.
- 314.** Vallari RC, Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science* 1982; 216(4546): 637-9.
- 315.** Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003; 13: 57-149.
- 316.** Vignozzi L, Filippi S, Morelli A, Luconi M, Jannini E, Forti G, Maggi M. Regulation of epididymal contractility during semen emission, the first part of the ejaculatory process: a role for estrogen. *J Sex Med* 2008; 5(9): 2010-6.
- 317.** Vine MF. Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl* 1996; 19: 323-37.
- 318.** Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem* 2000; 79: 241-4.
- 319.** Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 2003; 533: 107-20.
- 320.** Wadhwa S, Mumper RJ. D-penicillamine and other low molecular weight thiols: Review of anticancer effects and related mechanisms. *Cancer Letters* 2013; 337: 8-21.
- 321.** Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003; 192(2-3): 95-117.
- 322.** Waites GM, Setchell BP. Changes in blood flow and vascular permeability of the testis, epididymis and accessory reproductive organs of the rat after the administration of cadmium chloride. *J Endocrinol* 1966; 34(3): 329-42.
- 323.** Wang J, Zhang H, Zhang T, Zhang R, Liu R, Chen Y. Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. *International Journal of Biological Macromolecules* 2015; 77: 59-67.
- 324.** Wang SL, Wang XR, Chia SE, Shen HM, Song L, Xing HX, Chen HY, Ong CN. A study on occupational exposure to petrochemicals and smoking on seminal quality. *J Androl* 2001; 22: 73-8.
- 325.** Wang W, Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 335-55.
- 326.** Wang F, Zhai S, Liu X, Li L, Wu S, Dou QP, Yan B. A novel dithiocarbamate analogue with potentially decreased ALDH inhibition has copper-dependent proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing activity in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 2011; 300 (1): 87-95.

- 327.** Wei XJ, Hu TJ, Chen JR, Wei YY. Inhibitory effect of carboxymethylpachymaran on cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. *Int J Biol Macromol* 2011; 49(4): 801-5.
- 328.** Welch-Carre E. The neurodevelopmental consequences of prenatal alcohol exposure. *Adv Neonatal Care* 2005; 5(4): 217-29.
- 329.** Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981; 77: 325-33.
- 330.** WHO, World Health Organization, Chemical Fact Sheets: Guidelines for Drinking-Water Quality, fourth ed. World Health Organization. 2011; Geneva.
- 331.** WHO, World Health Organization, Preventing Disease Through Healthy Environments. Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern. World Health Organization. 2010; Geneva.
- 332.** WHO. Cadmium. Air Quality Guidelines. World Health Organization. Regional Office for Europe. 2000; Copenhagen, Denmark.
- 333.** WHO. Cadmium. Vol. 134. Geneva: World Health Organization; 1992. p. 92-205.
- 334.** Wong CH, Cheng CY. The blood–testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2005; 71: 263-96.
- 335.** Wong WY, Thomas CMG, Merkus HMWM, Zielhuis GA, Doesburg WH, Steegers-Theunissen RPM. Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil Steril* 2000; 74: 930-5.
- 336.** Wood CM, Farrell AP and Brauner CJ. (Eds.) Homeostasis and toxicology of non-essential metals. Academic Press 2011. *Fish Physiology* 31, Part B.
- 337.** Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2002; 27: 277-84.
- 338.** Yadav N, Khandelwal S. Effect of picroliv on cadmium induced testicular damage in rat. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 494-501.
- 339.** Yakisich JS, Sidén A, Eneroth P, Cruz M. Disulfiram is a potent in vitro inhibitor of DNA topoisomerases. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289(2): 586-90.
- 340.** Yan H, Carter CE, Xu C, Singh PK, Jones MM, Johnson JE, Dietrich MS. Cadmium-induced apoptosis in urogenital organs of the male rat and its suppression by chelation. *J Toxicol Environ Health* 1997; 52: 149-68.
- 341.** Yan HHN, Mruk DD, Cheng CY. Junction restructuring and spermatogenesis: the biology, regulation, and implication in male contraceptive development. *Curr Top Dev Biol* 2008; 80: 57-92.
- 342.** Yeung CH. Aquaporins in spermatozoa and testicular germ cells: identification and potential role. *Asian J Androl* 2010; 12(4): 490-9.
- 343.** Zahr NM, Kaufman KL, Harper CG. Clinical and pathological features of alcohol-related brain damage. *Nat Rev Neurol* 2011; 7(5): 284-94.
- 344.** Zemaitis MA, Greene FE. Impairment of hepatic microsomal drug metabolism in the rat during daily disulfiram administration. *Biochem Pharmacol* 1976; 25(12): 1355-60.

- 345.** Zenzes MT, Bielecki R, Reed TE. Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke. *Fertil Steril* 1999; 72(2): 330-5.
- 346.** Zhang JP, Meng QY, Wang Q, Zhang LJ, Mao YL, Sun ZX. Effect of smoking on semen quality of infertile men in Shandong, China. *Asian J Androl* 2000; 2: 143-6.
- 347.** Zhang Y, Ou Y, Cheng M, Saadi HS, Thundathil JC, van der Hoorn FA. KLC3 is involved in sperm tail midpiece formation and sperm function. *Dev Biol* 2012; 366(2): 101-10.
- 348.** Zheng J, Lou JR, Zhang XX, Benbrook DM, Hanigan MH, Lind SE, Ding WQ. N-acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death. *Cancer Lett* 2010; 298: 186-94.
- 349.** Zhou T, Zhou G, Song W, Eguchi N, Lu W, Lundin E, Jin T, Nordberg G. Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of p53, c-jun and MT-I genes in testes and ventral prostate of rats. *Toxicol* 1999; 142: 1-13.
- 350.** Žikić RV, Štajn AŠ, Saičić ZS, Spasić MB, Milovanović SR. Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. Monografija, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac; 2000. p. 1-150.
- 351.** Zini A, Schlegel PN. Cu/Zn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase mRNA expression in the rat testis after surgical cryptorchidism and efferent duct ligation. *J Urol* 1997; 158: 659-63.

8. PRILOZI

8.1.PRILOG - STATUS METALA

Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD (n = 6). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću Cd₁ grupu (κ) životinja. Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: **p<0.01 *** i p<0.001.

Tabela 1. Status metala- kadmijum u testisima pacova

Parametar	Cd ($\mu\text{g Cd/g tkiva}$)				
	Cd ₁	Cd ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije					
1 dan	0,35 \pm 0,07	0,35 \pm 0,071	0,33 \pm 0,050		
3 dana		0,45 \pm 0,091	0,86 \pm 0,180		
10 dana		1,05 \pm 0,178, κ ***	1,17 \pm 0,047, κ ***		
21 dan		2,70 \pm 0,550, κ ***	2,67 \pm 0,432, κ ***		
22 dana				2,24 \pm 0,421, κ ***	1,65 \pm 0,234, κ ***
24 dana				1,40 \pm 0,030, κ **	1,45 \pm 0,101, κ ***
31 dan		3,50 \pm 0,844, κ ***		1,80 \pm 0,261, κ ***	2,18 \pm 0,171, κ ***
42 dana		4,41 \pm 0,932, κ ***		2,34 \pm 0,022, κ ***	5,13 \pm 0,574, κ ***

Tabela 2. Status metala- gvožđe u testisima pacova

Parametar	Fe ($\mu\text{g Fe/g tkiva}$)									
	Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A _{1-21/} Cd ₁₋₂₁	A _{1-21/} DSF ₂₂₋₄₂	Cd _{1-42/} DSF ₂₂₋₄₂	A _{1-21/} Cd _{1-42/} DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije										
1 dan		12,21 ± 1,853	17,03 ± 2,318	13,01 ± 0,941	15,33 ± 1,342	13,08 ± 1,230	13,27 ± 1,638			
3 dana				13,26 ± 1,481	15,62 ± 1,262	13,07 ± 0,786	21,52 ± 1,214, κ***, α**			
10 dana				14,79 ± 1,401	18,56 ± 2,596	13,15 ± 1,022	37,25 ± 5,421, (κ,α,β)***			
21 dan		12,95 ± 1,575	12,95 ± 1,575	18,79 ± 1,259, κ**	21,67 ± 3,970, κ***	21,12 ± 0,509, κ***	18,72 ± 1,214, κ*			
22 dana								15,84 ± 2,557	13,15 ± 2,333	18,44 ± 1,327, κ*
24 dana								15,79 ± 0,458	15,38 ± 1,059	15,89 ± 1,746
31 dan					39,99 ± 8,392, κ***			15,46 ± 0,564	14,74 ± 1,494, β***	16,00 ± 1,550, β***
42 dana		15,91 ± 2,637	14,91 ± 3,405		39,29 ± 9,004, κ***			20,56 ± 1,997, κ*	17,12 ± 1,175, β***	16,31 ± 0,619, β***

Tabela 3. Status metala- bakar u testisima pacova

Parametar	Cu ($\mu\text{g Cu/g tkiva}$)									
	Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A _{1-21/} Cd ₁₋₂₁	A _{1-21/} DSF ₂₂₋₄₂	Cd _{1-42/} DSF ₂₂₋₄₂	A _{1-21/} Cd _{1-42/} DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije										
1 dan		0,91 ± 0,027	1,25 ± 0,221	0,81 ± 0,077	0,88 ± 0,087	0,66 ± 0,136, κ*	0,83 ± 0,101			
3 dana				0,84 ± 0,073	1,07 ± 0,169	0,59 ± 0,067, κ**	1,16 ± 0,267			
10 dana				0,85 ± 0,053	1,47 ± 0,210, κ*	0,68 ± 0,123, κ*	1,38 ± 0,299			
21 dan		0,92 ± 0,067	1,46 ± 0,199	0,92 ± 0,125	1,90 ± 0,162, κ***	0,71 ± 0,089, κ***	1,44 ± 0,225, (κ, α)**, β*			
22 dana								1,01 ± 0,173	1,86 ± 0,143, κ***	1,02 ± 0,214, β***
24 dana								1,59 ± 0,254, (κ, α)**	1,37 ± 0,220	0,86 ± 0,135, β***, γ*
31 dan					2,83 ± 0,687, κ***			1,31 ± 0,180	0,80 ± 0,145, β***	0,95 ± 0,062, β***
42 dana		0,91 ± 0,027	1,47 ± 0,301		3,73 ± 0,710, κ***			0,92 ± 0,120, κ**	0,90 ± 0,068, κ**, β***	1,05 ± 0,102, β***

Tabela 4. Status metala- cink u testisima pacova

Parametar	Zn ($\mu\text{g Zn/g tkiva}$)								
Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A _{1-21/} Cd ₁₋₂₁	A _{1-21/} DSF ₂₂₋₄₂	Cd _{1-42/} DSF ₂₂₋₄₂	A _{1-21/} Cd _{1-42/} DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije									
1 dan	36,56 ± 3,197	32,82 ± 5,207	31,65 ± 2,389	32,85 ± 5,097	28,76 ± 2,406	32,75 ± 5,241			
3 dana			30,64 ± 2,272	28,23 ± 2,509	28,34 ± 2,060	19,13 ± 2,578, (κ, α)***, β*			
10 dana			26,82 ± 1,673, κ**	25,80 ± 1,327, κ**	28,60 ± 2,131	33,08 ± 8,118			
21 dan	39,41 ± 3,077	32,81 ± 5,937	25,49 ± 1,101, κ***	22,93 ± 3,715, κ***	31,01 ± 2,989	26,19 ± 4,298, κ***			
22 dana							28,42 ± 1,947, κ***	26,31 ± 3,737, κ***	26,15 ± 2,041, κ***
24 dana							29,39 ± 1,492, κ**	27,20 ± 2,701, κ***	25,98 ± 0,701
31 dan				24,11 ± 6,346, κ***			28,45 ± 0,803, κ**	30,29 ± 3,618, κ*	23,49 ± 5,278
42 dana	38,89 ± 2,520	34,07 ± 6,626		24,20 ± 5,167, κ***			27,78 ± 0,610	29,04 ± 1,333	33,18 ± 1,959, β*

Tabela 5. Status metala- magnezijum u testisima pacova

Parametar	Mg ($\mu\text{g Mg/g tkiva}$)								
Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A _{1-21/} Cd ₁₋₂₁	A _{1-21/} DSF ₂₂₋₄₂	Cd _{1-42/} DSF ₂₂₋₄₂	A _{1-21/} Cd _{1-42/} DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije									
1 dan	149,47 ± 5,302	122,16 ± 10,946	152,01 ± 12,012	152,10 ± 17,672	154,70 ± 5,671, κ**	144,89 ± 17,253			
3 dana			162,04 ± 21,969	152,61 ± 6,932	152,90 ± 6,347	131,57 ± 19,424			
10 dana			149,82 ± 9,107	148,05 ± 24,572	149,44 ± 5,639	138,20 ± 27,455			
21 dan	149,75 ± 5,234	125,85 ± 17,053	147,10 ± 4,610	153,41 ± 8,313	131,83 ± 9,316	148,59 ± 6,442			
22 dana							144,37 ± 14,096	152,89 ± 11,795	146,54 ± 5,729
24 dana							144,15 ± 12,764	134,88 ± 14,870	140,82 ± 3,779
31 dan				128,32 ± 23,187			139,13 ± 4,902	130,53 ± 9,640	148,44 ± 6,670
42 dana	129,25 ± 15,646	119,97 ± 14,841		133,86 ± 31,398			139,48 ± 5,782	125,55 ± 17,032	141,40 ± 5,499

8.2.PRILOG - PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA

Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD (n = 6). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (κ), A grupu (α) i Cd grupu (β) životinja. Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tabela 1. Parametar oksidativnog statusa - superoksid anjon radikal u testisima pacova

Parametar	SAR (nmol red NBT/min/mg proteina)								
Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / DSF ₂₂₋₄₂	Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije									
1 dan	67,36 \pm 5,355	80,01 \pm 5,443	73,04 \pm 10,922	146,78 \pm 20,330, κ^{***}	248,23 \pm 29,506, κ^{***}	231,55 \pm 19,761, (κ , α , β) ^{***}			
3 dana			177,03 \pm 28,316, κ^{***}	173,51 \pm 17,836, κ^{***}	247,42 \pm 17,889, κ^{***}	274,67 \pm 10,676, (κ , α , β) ^{***}			
10 dana			182,01 \pm 11,752, κ^{***}	186,45 \pm 11,893, κ^{***}	258,41 \pm 40,242, κ^{***}	216,73 \pm 8,361, κ^{***}			
21 dan	68,22 \pm 2,283	72,27 \pm 11,688	201,13 \pm 25,193, κ^{***}	253,38 \pm 29,539, κ^{***}	352,01 \pm 28,841, κ^{***}	197,04 \pm 11,332, (κ , β) ^{***}			
22 dana							205,32 \pm 4,595, κ^{***}	261,07 \pm 27,001, κ^{***}	194,45 \pm 13,655, κ^{***}
24 dana							199,2 \pm 9,988, κ^{***}	196,77 \pm 13,237, (κ , β) ^{***}	193,01 \pm 11,081, (κ , β) ^{***}
31 dan				304,22 \pm 31,056			175,13 \pm 9,076, κ^{***}	186,04 \pm 19,985, (κ , β) ^{***}	187,92 \pm 8,372, (κ , β) ^{***}
42 dana	87,58 \pm 11,720	77,67 \pm 11,724		321,37 \pm 47,592, κ^{***}			146,67 \pm 9,795, κ^{***} , α^{**}	183,71 \pm 11,716, (κ , β) ^{***}	167,97 \pm 10,206, (κ , β) ^{***}

Tabela 2. Parametar oksidativnog statusa - malondialdehid u testisima pacova

Parametar	MDA (nmol MDA/mg proteina)									
	Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / DSF ₂₂₋₄₂	Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije										
1 dan		136,48 ± 8,341	147,91 ± 15,989	154,64 ± 7,733	135,35 ± 3,952	127,75 ± 12,611	149,46 ± 19,113, κ*			
3 dana				179,36 ± 6,551	132,48 ± 9,878	102,6 ± 8,537, κ*	211,14 ± 27,406, (κ, β)***			
10 dana				186,68 ± 4,636, κ**	141,07 ± 25,566	102,57 ± 11,829, κ*	211,32 ± 10,093, (κ, β)***			
21 dan		134,60 ± 6,374	144,75 ± 16,125	199,63 ± 13,249, κ***	192,99 ± 32,080, κ***	101,96 ± 10,686, κ*	225,21 ± 30,283, κ***			
22 dana								178,86 ± 18,891, κ*	194,77 ± 35,905, κ***	191,03 ± 19,928, κ***
24 dana								161,6 ± 4,328	108,02 ± 21,025, β***	150,30 ± 27,857, α**, γ***
31 dan					220,72 ± 38,270, κ***			148,40 ± 6,283, α**	92,31 ± 8,896, β***	136,79 ± 7,533, (α, β, γ)***
42 dana		142,51 ± 17,749	160,82 ± 14,518		285,28 ± 36,213, κ***			142,59 ± 6,411, α***	134,55 ± 21,295, β***	135,38 ± 20,169, (α, β, γ)***

Tabela 3. Parametar antioksidativnog sistema zaštite - ukupna superoksid dismutaza u testisima pacova

Parametar	tSOD (U tSOD/mg proteina)									
	Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / DSF ₂₂₋₄₂	Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije										
1 dan		6,51 ± 0,622	6,97 ± 0,684	5,7 ± 0,559	4,56 ± 0,526, κ***	5,24 ± 0,716, κ***	4,16 ± 0,116, (κ, α)***			
3 dana				4,59 ± 0,410, κ***	2,58 ± 0,398, κ***	2,75 ± 0,413, κ***	3,09 ± 0,518, (κ, α)***			
10 dana				3,35 ± 0,575, κ***	2,01 ± 0,344, κ***	2,52 ± 0,316, κ***	2,43 ± 0,351, κ***, β*			
21 dan		6,43 ± 0,823	6,90 ± 0,471	2,99 ± 0,543, κ***	1,4 ± 0,149, κ***	2,04 ± 0,151, κ***	1,99 ± 0,224, κ***			
22 dana								2,73 ± 0,210, κ***	1,4 ± 0,158, κ***	1,94 ± 0,192, κ***
24 dana								2,6 ± 0,060, κ***	1,37 ± 0,191, κ***	1,94 ± 0,269, κ***
31 dan					1,19 ± 0,220			2,48 ± 0,040, κ***	1,41 ± 0,122, κ***	1,98 ± 0,267, κ***
42 dana		8,43 ± 0,663	7,54 ± 0,896		1,0 ± 0,139, κ***			2,06 ± 0,281, κ***	2,75 ± 0,371, (κ, β)***	2,13 ± 0,392, κ***, β*

Tabela 4. Parametar antioksidativnog sistema zaštite - katalaza u testisima pacova

Parametar	CAT (U CAT/mg proteina)									
	Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / DSF ₂₂₋₄₂	Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije										
1 dan	6,22 ± 0,407	5,14 ± 1,145	6,01 ± 0,760	6,78 ± 1,210	6,56 ± 1,072	5,45 ± 0,896				
3 dana			5,64 ± 0,631	5,32 ± 0,543	6,71 ± 1,454	4,41 ± 0,848				
10 dana			5,66 ± 1,450	5,39 ± 0,812	6,37 ± 1,023	3,76 ± 0,601, κ**				
21 dan	6,40 ± 0,411	5,61 ± 0,709	4,77 ± 0,597	4,44 ± 0,917, κ***	6,87 ± 1,311	3,29 ± 0,873, κ***				
22 dana							5,27 ± 0,626	4,51 ± 0,694	4,3 ± 0,926, κ*	
24 dana							4,98 ± 1,250	4,81 ± 0,958	5,31 ± 0,989	
31 dan				3,99 ± 1,008, κ***			5,04 ± 0,274	5,99 ± 0,807	5,08 ± 0,568	
42 dana	6,09 ± 1,221	6,21 ± 1,149		3,47 ± 0,759, κ***			4,47 ± 0,598	6,06 ± 1,129, β***	5,23 ± 0,815, γ*	

Tabela 5. Parametar antioksidativnog sistema zaštite - glutation-S-transferaza u testisima Wistar pacova.

Parametar	GST (mU GST/mg proteina)									
	Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / DSF ₂₂₋₄₂	Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije										
1 dan	97,60 ± 11,899	81,69 ± 12,449	96,90 ± 17,656	93,55 ± 8,217	64,57 ± 16,146, κ***	51,69 ± 15,033, (κ, α, β)***				
3 dana			68,23 ± 15,642, κ*	73,73 ± 4,027	65,97 ± 15,805	48,54 ± 10,051, κ***				
10 dana			63,27 ± 13,809, κ**	32,62 ± 7,018, κ***	56,19 ± 26,535	39,99 ± 8,153, κ***				
21 dan	109,46 ± 11,869	72,85 ± 17,915	37,05 ± 5,173, κ***	17,33 ± 7,701, κ***	36,34 ± 9,267, κ***	11,99 ± 4,760, κ***, α*				
22 dana							48,32 ± 12,921, κ***	19,94 ± 6,096, κ***	24,78 ± 10,783, κ***	
24 dana							44,46 ± 16,152	23,55 ± 5,016, κ***	25,61 ± 10,828, κ***	
31 dan				9,89 ± 1,775			40,13 ± 12,574	25,11 ± 6,039, κ***	25,38 ± 10,555, κ***	
42 dana	91,79 ± 16,172	96,66 ± 6,539		9,02 ± 2,315, κ***			47,81 ± 16,021, κ***	30,17 ± 4,449, κ***	23,31 ± 3,943, κ***	

Tabela 6. Parametar antioksidativnog sistema zaštite - glutation reduktaza u testisima pacova

Parametar	GR (mU GR/mg proteina)									
	Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / DSF ₂₂₋₄₂	Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije										
1 dan		2,58 ± 0,442	2,47 ± 1,071	2,25 ± 0,276	1,84 ± 0,217	1,59 ± 0,559	1,99 ± 0,544			
3 dana				2,36 ± 0,458	1,77 ± 0,151	1,84 ± 0,406	1,95 ± 0,151			
10 dana				2,44 ± 0,333	1,78 ± 0,187	2,75 ± 0,236	1,97 ± 0,194			
21 dan		2,55 ± 0,340	2,55 ± 0,927	2,24 ± 0,290	1,43 ± 0,241, κ*	2,49 ± 0,582	1,60 ± 0,117			
22 dana								1,97 ± 0,321	1,43 ± 0,057, κ*	1,91 ± 0,288
24 dana								2,38 ± 0,939	2,90 ± 0,409, β**	2,29 ± 0,648
31 dan					1,38 ± 0,153, κ*			3,38 ± 0,662	1,30 ± 0,205, κ*	2,27 ± 0,699
42 dana		2,51 ± 1,099	2,69 ± 0,568		1,25 ± 0,146, κ*			2,37 ± 0,477	2,77 ± 0,669, β***	2,71 ± 0,402, β***

Tabela 7. Parametar antioksidativnog sistema zaštite - redukovani glutation u testisima Wistar pacova.

Parametar	GSH (nmol GSH/mg proteina)									
	Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / DSF ₂₂₋₄₂	Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije										
1 dan		37,71 ± 3,011	37,14 ± 4,006	38,81 ± 3,893	37,86 ± 4,850	32,56 ± 2,514	32,32 ± 4,536			
3 dana				35,14 ± 6,437	37,83 ± 3,861	39,25 ± 4,961	27,44 ± 2,225, κ*, β**			
10 dana				29,18 ± 4,660	30,74 ± 4,587	24,28 ± 2,538, κ***	24,20 ± 2,082, κ***			
21 dan		38,02 ± 3,598	38,07 ± 5,669	32,37 ± 3,352	25,26 ± 6,054, κ***	39,31 ± 3,187	22,00 ± 1,889, κ***, α**			
22 dana								30,71 ± 5,247, κ***	26,57 ± 5,549, κ***	24,07 ± 1,904, κ***
24 dana								37,36 ± 4,354	23,71 ± 5,690, κ***	24,43 ± 1,541
31 dan					19,88 ± 1,459, κ***			41,46 ± 5,194	29,18 ± 1,209, β*	24,28 ± 2,933
42 dana		39,65 ± 3,696	38,60 ± 5,382		17,26 ± 0,638, κ***			41,30 ± 4,381, α*	24,97 ± 0,543, κ***	26,98 ± 3,218, κ***, β**

Tabela 8. Parametar oksidativnog statusa - oksidovani glutation u testisima pacova

Parametar	GSSG (nmol GSSG/mg proteina)										
	Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / DSF ₂₂₋₄₂	Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂	
Dužina ekspozicije											
1 dan		1,37 ± 0,095	1,46 ± 0,054	1,40 ± 0,106	1,39 ± 0,198	1,38 ± 0,138	1,50 ± 0,104				
3 dana				1,49 ± 0,189	1,37 ± 0,244	1,13 ± 0,252	1,79 ± 0,184				
10 dana				1,56 ± 0,114	1,53 ± 0,252	1,70 ± 0,359	1,93 ± 0,163, κ**				
21 dan		1,27 ± 0,096	1,33 ± 0,197	1,57 ± 0,073	1,76 ± 0,066, κ*	1,13 ± 0,205	2,07 ± 0,334, κ***, α**				
22 dana								1,74 ± 0,426, κ*	1,96 ± 0,443, κ***	2,05 ± 0,211, κ***, α*	
24 dana								1,48 ± 0,173	1,97 ± 0,106, κ***	2,08 ± 0,108, κ***, α*	
31 dan					2,02 ± 0,174, κ***				1,38 ± 0,223	1,90 ± 0,133, κ***	1,85 ± 0,288, κ**

Tabela 9. Marker oksidativnog stresa - odnos oksidovanog i redukovano glutationa u testisima pacova

Parametar	GSSG/GSH									
	Tretman	K ₁₋₄₂	MU ₁₋₄₂	A ₁₋₂₁	Cd ₁₋₄₂	DSF ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₂₁	A ₁₋₂₁ / DSF ₂₂₋₄₂	Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂	A ₁₋₂₁ / Cd ₁₋₄₂ / DSF ₂₂₋₄₂
Dužina ekspozicije										
1 dan		0,04 ± 0,002	0,04 ± 0,005	0,04 ± 0,004	0,04 ± 0,007	0,04 ± 0,004	0,05 ± 0,007			
3 dana				0,04 ± 0,014	0,04 ± 0,007	0,03 ± 0,007	0,07 ± 0,009, (κ, β)*			
10 dana				0,05 ± 0,009	0,05 ± 0,010	0,07 ± 0,016, κ**	0,08 ± 0,010, κ***, β*			
21 dan		0,03 ± 0,005	0,04 ± 0,009	0,05 ± 0,006	0,07 ± 0,020, κ***	0,03 ± 0,004	0,09 ± 0,010, (κ, α)***			
22 dana								0,06 ± 0,023	0,08 ± 0,038, κ***	0,08 ± 0,009, (κ, α)***
24 dana								0,04 ± 0,004	0,09 ± 0,018, κ***	0,08 ± 0,005, (κ, α)***
31 dan					0,10 ± 0,014				0,06 ± 0,005, κ**, β***	0,08 ± 0,016, κ***, α*
42 dana		0,03 ± 0,003	0,04 ± 0,004		0,13 ± 0,010, κ***			0,03 ± 0,006	0,08 ± 0,011, (κ, β)***	0,06 ± 0,013, β***, γ*

8.3.PRILOG - PRIRAST MASE TESTISA

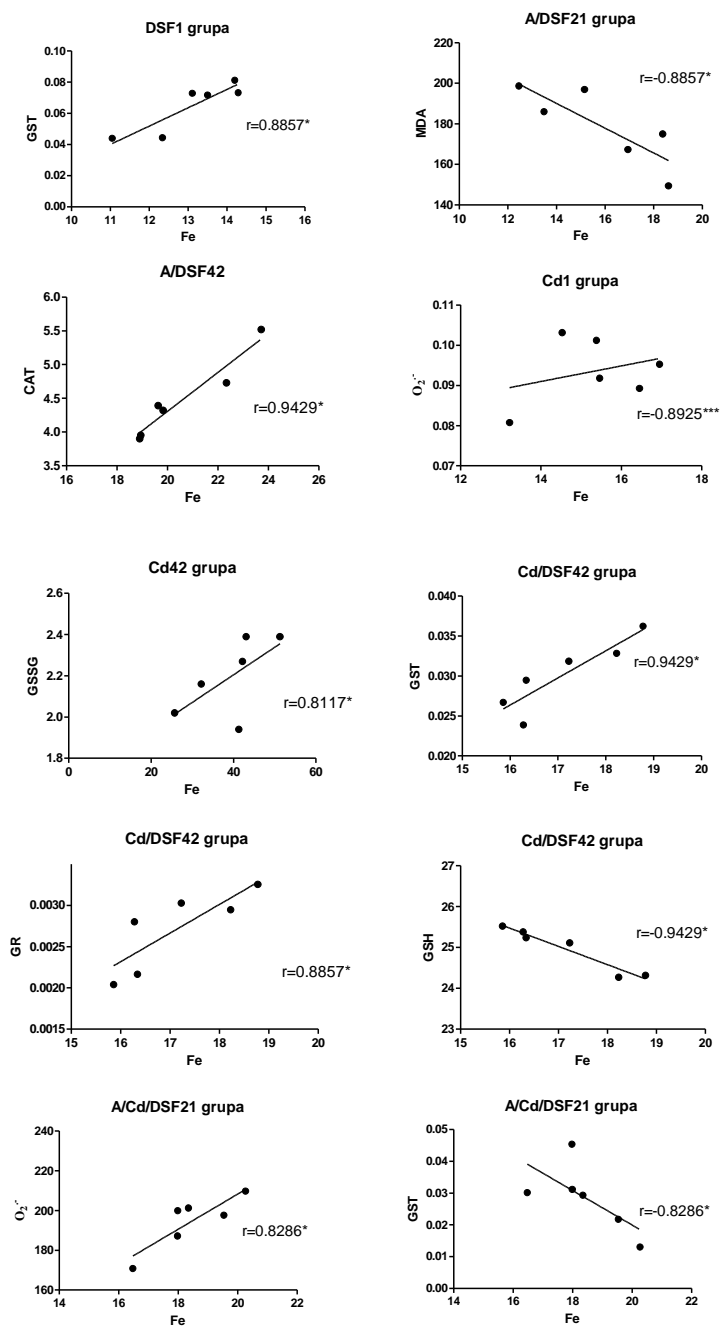
Tabela 1. Prirast mase testisa Wistar pacova kontrolnih i eksperimentalnih grupa.

Tretman	Parametar Prirast mase testisa (g)
K ₁	0
K ₁₋₂₁	0,69 ± 0,079
K ₁₋₄₂	0,69 ± 0,087
MU ₁	0
MU ₁₋₂₁	0,82 ± 0,106
MU ₁₋₄₂	0,89 ± 0,075
Cd ₁₋₁₀	0,44 ± 0,065
Cd ₁₋₂₁	0,3 ± 0,030, κ***
Cd ₁₋₃₁	0,22 ± 0,043
Cd ₁₋₄₂	0,2 ± 0,029, κ***
A ₁₋₁₀	0,72 ± 0,062
A ₁₋₂₁	0,69 ± 0,044
A ₁₋₁₀ /Cd ₁₋₁₀	0,35 ± 0,054
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₂₁	0,22 ± 0,105
DSF ₁₋₁₀	0,71 ± 0,034
DSF ₁₋₂₁	0,70 ± 0,07
A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₃₁	0,69 ± 0,037
A ₁₋₂₁ /DSF ₂₂₋₄₂	0,82 ± 0,038
Cd ₁₋₃₁ /DSF ₂₂₋₃₁	0,3 ± 0,059
Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	0,28 ± 0,061, κ***
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₃₁ /DSF ₂₂₋₃₁	0,23 ± 0,052, κ***
A ₁₋₂₁ /Cd ₁₋₄₂ /DSF ₂₂₋₄₂	0,29 ± 0,043, κ***

Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD (n = 6). Oznake za razlike između grupa u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (κ) životinja. Jednofaktorska ANOVA - nivo značajnosti: ***p<0.001.

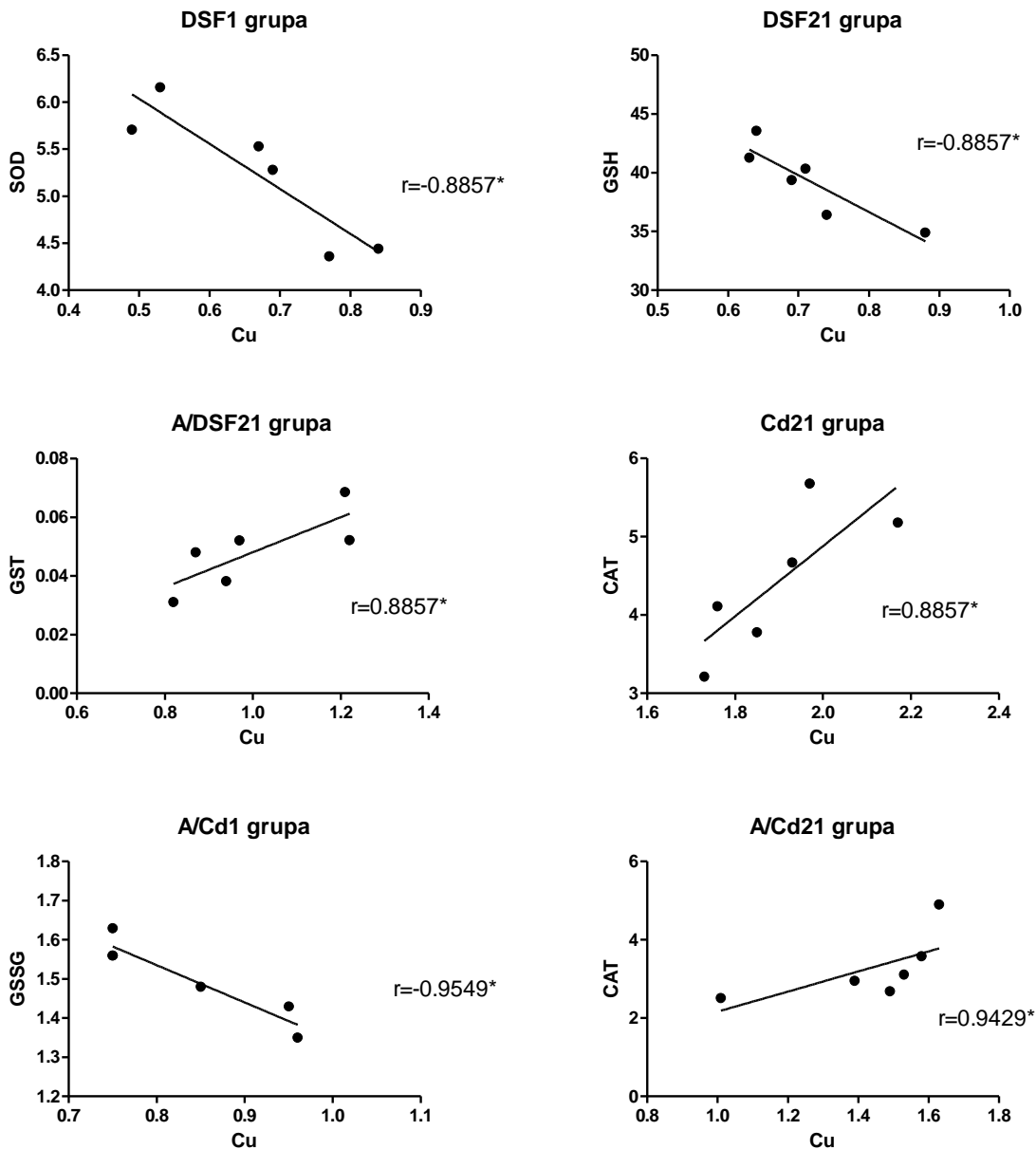
8.4.PRILOG - KORELACIJE

8.4.1. Korelacije između metala i parametara oksidativnog statusa u testisima pacova

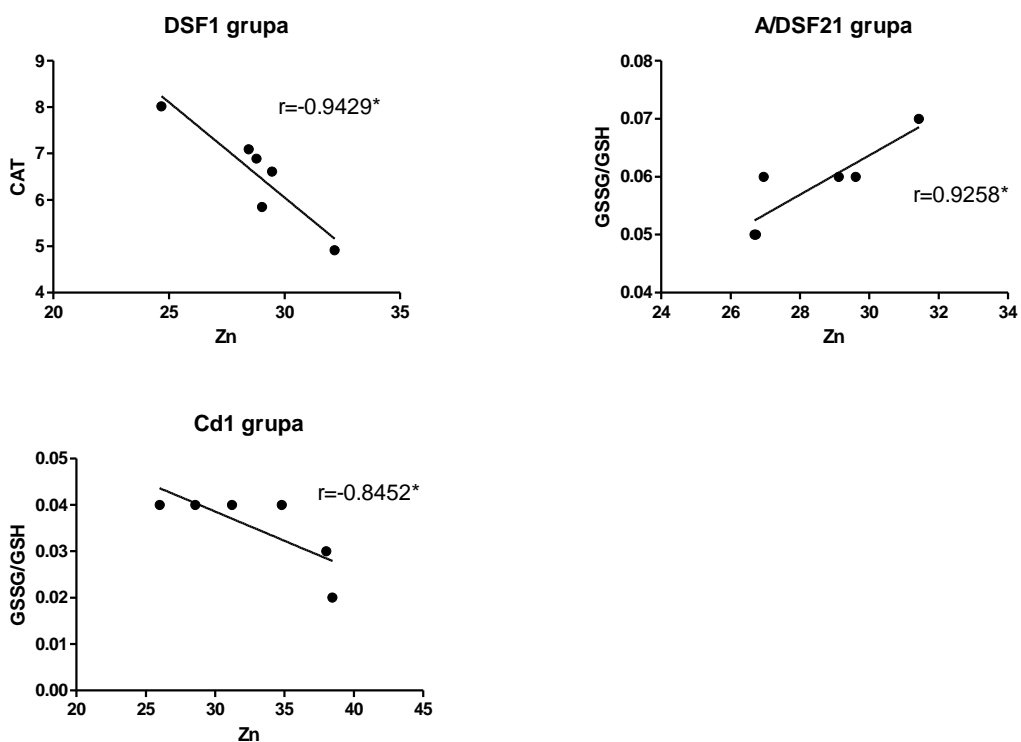


Grafik 1. Spearman-ova korelacija između gvožđa i parametara oksidativnog statusa u testisima pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično

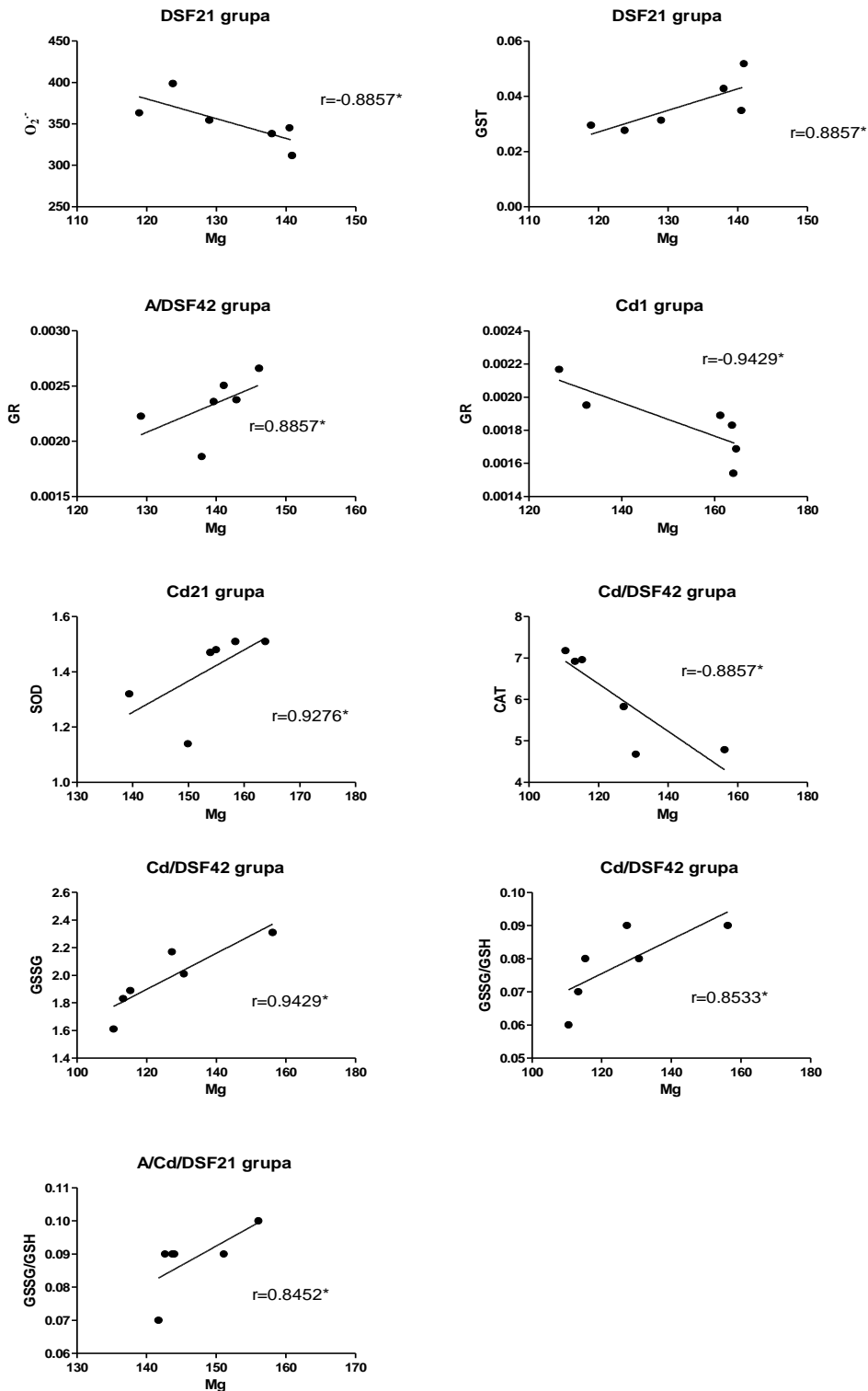
kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.



Grafik 2. Spearman-ova korelacija između bakra i parametara oksidativnog statusa u testisima *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.

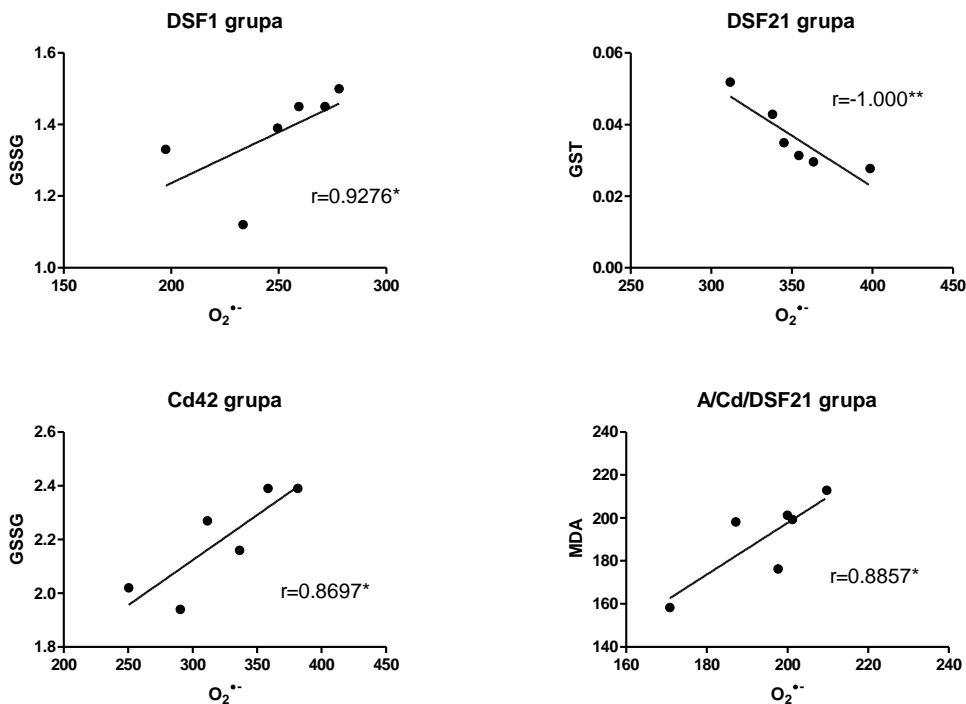


Grafik 3. Spearman-ova korelacija između cinka i parametara oksidativnog statusa u testisima *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.

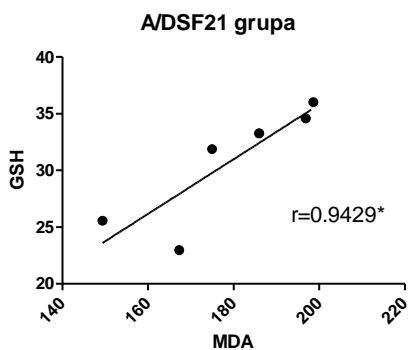


Grafik 4. Spearman-ova korelacija između magnezijuma i parametara oksidativnog statusa u testisima *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.

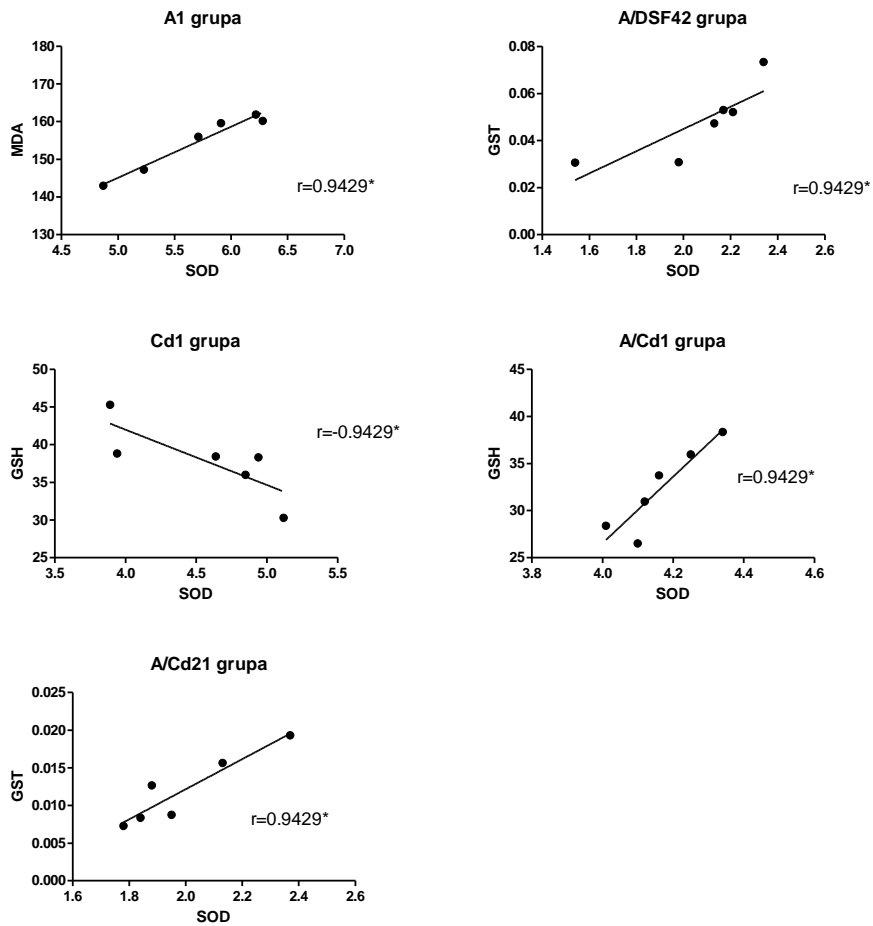
8.4.2. Korelacije između parametara oksidativnog statusa u testisima wistar pacova



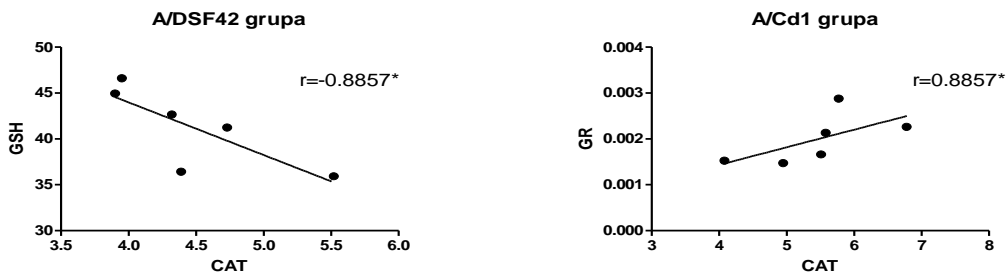
Grafik 5. Spearman-ova korelacija između O_2^- i ostalih parametara oksidativnog statusa u testisima *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.



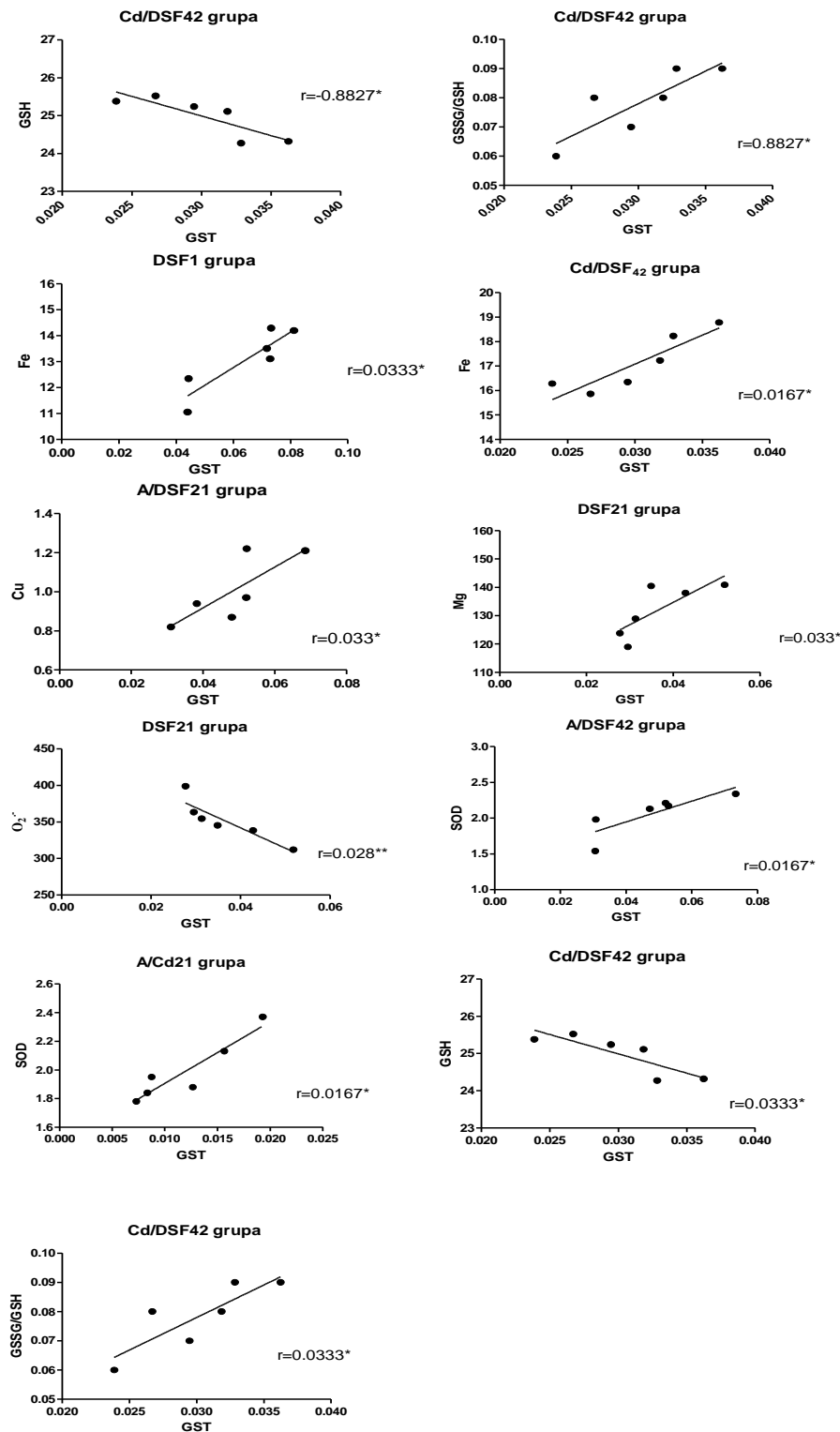
Grafik 6. Spearman-ova korelacija između MDA i ostalih parametara oksidativnog statusa u testisima *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.



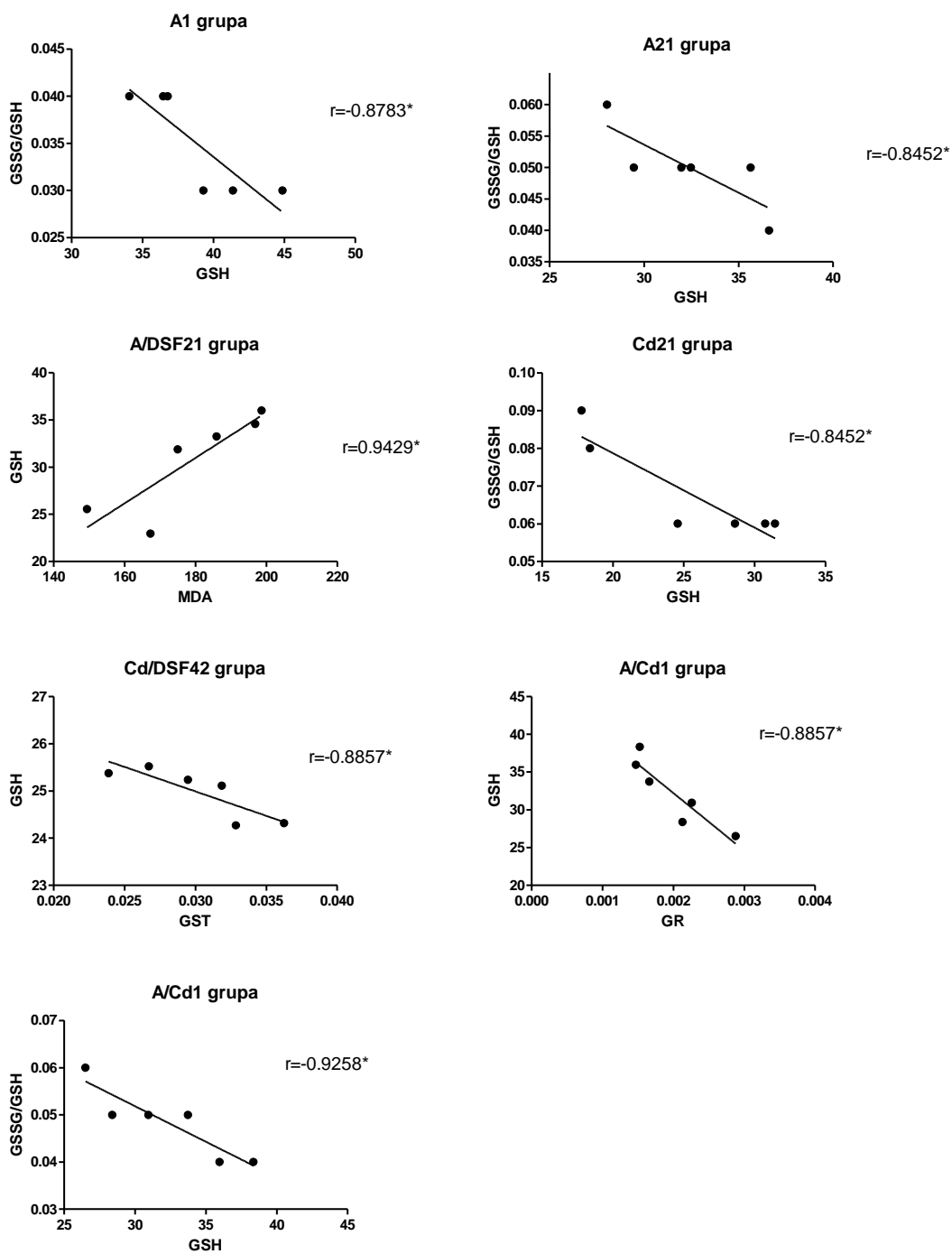
Grafik 7. Spearman-ova korelacija između SOD i ostalih parametara oksidativnog statusa u testisima *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.



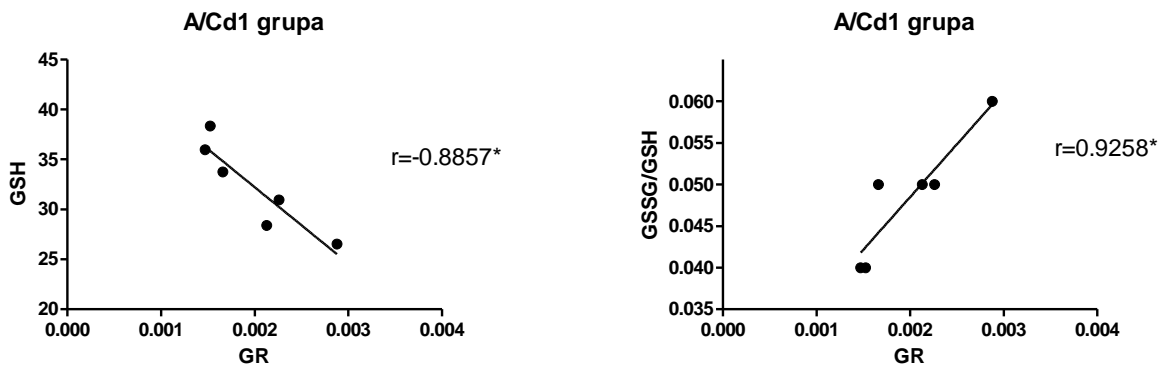
Grafik 8. Spearman-ova korelacija između CAT i ostalih parametara oksidativnog statusa u testisima *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.



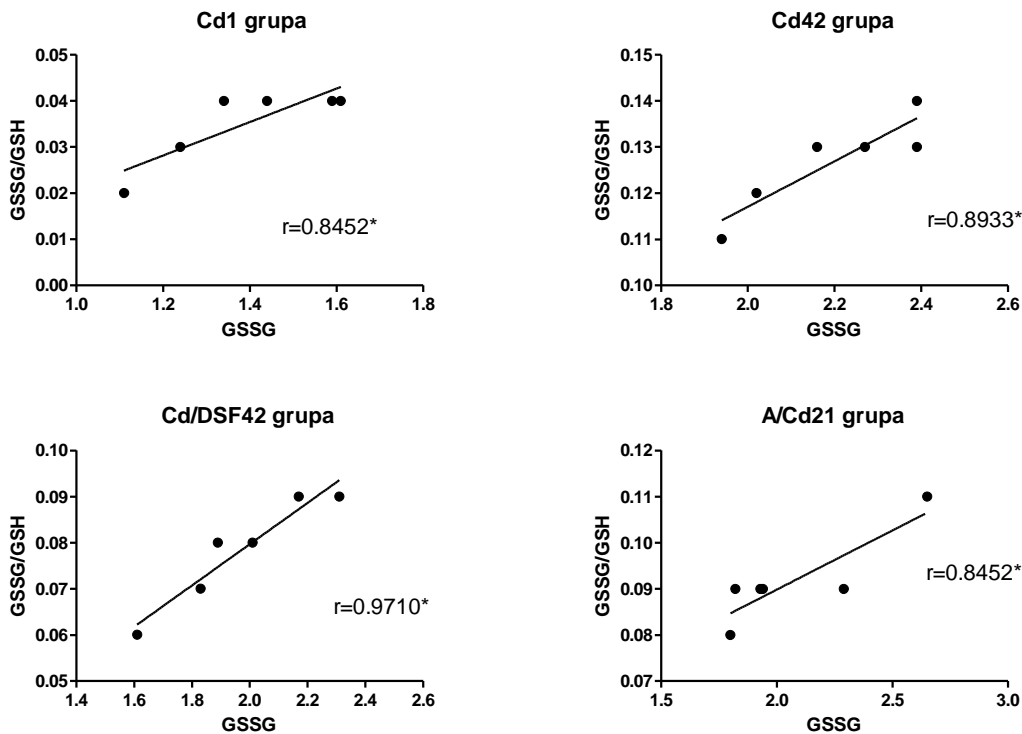
Grafik 9. Spearman-ova korelacija između GST i ostalih parametara oksidativnog statusa u testisima *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.



Grafik 10. Spearman-ova korelacija između GSH i ostalih parametara oksidativnog statusa u testisima *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.



Grafik 11. Spearman-ova korelacija između GR i ostalih parametara oksidativnog statusa u testisima *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.



Grafik 12. Spearman-ova korelacija između GSSG i ostalih parametara oksidativnog statusa u testisima *Wistar* pacova izloženih subakutno i subhronično kadmijumu, subakutno etanolu i disulfiramu, i subhronično kombinaciji kadmijuma i alkohola, alkohola i disulfirama, kadmijuma i disulfirama, i kadmijuma, alkohola i disulfirama.

Korelacija je procenjena između svih parametara za odabrane vremenske intervale ekspozicije (Cd: 21 i 42 dana; A: 21 dan; DSF: 21 dan; Cd 21 i A 21 dan koekspozicije; A 21 i DSF 21 dan kombinovane ekspozicije; Cd 42 i DSF 21 dan kombinovane ekspozicije i A 21, Cd 42 i DSF 21 dan kombinovane ekspozicije). *Wistar* pacovi su izloženi *i.p.* 1 mg CdCl₂/kg t.m./dan, *per os* 3 ml 20 % etanola/dan i *per os* 178,5 mg DSF/kg t.m./dan. Spearman-ov koeficijent korelacije (r) > ± 0,70 je razmatran. Parametri su izraženi u sledećim jedinicama: malondialdehid (MDA): nmol MDA/mg proteina; superoksidni anion radikal (O₂^{•-}): nmol red NBT/min/mg proteina; superoksid dismutaza (SOD): U SOD/mg proteina; katalaza (CAT): U CAT/mg proteina; glutation – redukovani i oksidovani (GSH i GSSG): nmol GSH i GSSG/mg proteina; glutation reduktaza (GR): U GR/mg proteina; glutation-S-transferaza (GST): U GST/mg proteina; i koncentracija metala – gvožđe (Fe): µg Fe/g tkiva; bakar (Cu): µg Cu/g tkiva; cink (Zn): µg Zn/g tkiva i magnezijum (Mg): µg Mg/g tkiva. Razmatrane su razlike statističke značajnosti za $p < 0,05$.

Biografija autora

Diplomirani farmaceut Ana Đurić rođena je 04. 07. 1980. godine u Valjevu. Osnovnu školu „Vuk Karadžić“ u Beogradu završila je kao đak generacije i nosilac Vukove diplome. Prvu beogradsku gimnaziju, prirodno-matematički smer, u Beogradu završila je kao nosilac Vukove diplome. Studije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisala je školske 1999/2000. godine i diplomirala 2008. godine. Diplomski rad pod nazivom „*Stimulansi kokainsko tipa-toksikološki aspekt*“ odbranila je na Katedri za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“ sa ocenom 10.

Od marta do oktobra 2008. godine obavila je pripravnički staž u Apotekarsoj ustanovi „Apoteka Beograd“ i potom položila stučni državni ispit za diplomirane farmaceute u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije. Od oktobra 2008. do februara 2011. godine radila je u apotekarskim ustanovama „Biofarm“ i „Anafarm“. Od februara 2011. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (projekat III 41018) *Preventivni, terapijski i etički pristup u prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, upalnom i proliferativnom odgovoru ćelije*, čiji je nosilac Medicinski fakultet, Univerziteta u Nišu.

Ana Đurić je doktorske akademske studije, modul Toksikologija, upisala je školske 2008/2009. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i položila sve ispite predviđene studijskim programom doktorskih akademskih studija farmaceutskih nauka, modul Toksikologija sa prosečnom ocenom 9.78: Metodologija naučnog istraživanja (8), Statistika u istraživanju (10), Opšta toksikologija (10), Toksikološka hemija 1 (10), Toksikološka hemija 2 (10), Molekularna toksikologija (10), Regulativa u toksikologiji (10), Sredstva koja izazivaju zavisnost (10), Toksični efekti na organe i organske sisteme (10).

Veće naučnih oblasti medicinskih nauka, Univerziteta u Beogradu je donelo odluku o saglasnosti na predlog teme doktorske disertacije pod nazivom „*Efekat disulfirama na mehanizme reproduktivne subakutne toksičnosti etanola i/ili kadmijuma kod mužjaka pacova*“ (02-01 Broj: 61206-2992) na XIV sednici održanoj 27.10.2015.godine.

Dipl. farmaceut Ana Đurić je učestvovala na brojnim naučnim skupovima i obukama: 1) marta 2015. godine je pohađala obuku za rad sa eksperimentalnim životinjama predviđenu za naučnog istraživača (kategorija B) i nakon uspešno položenog kursa „*Principi rada sa eksperimentalnim životinjama*“ upisana je u *Registar za rad sa ogledim na životinjama*; 2) Web konferencija o dobrobiti eksperimentalnih životinja: The Laboratory Animal Sciences BioConference Live, 13-14. februar 2013;

3) Web konferencija: Cancer: Research, Discovery & Therapeutics, BioConference Live, 29-30. oktobar 2014; 4) Simpozijum: Masena spektroskopija, Institut Superlab, Vinča, Beograd, 7. novembar 2014; 5) U okviru projekata obuke nastavno-naučnog osoblja *TRAIN (Training & Research for Academic Newcomers)* pohađala je sledeće module (kurseve): Preduzetništvo, Metodologija istraživanja, pisanje naučnih radova i prezentacija rezultata, Priprema prijava za projekte i upravljanje projektima, Veštine držanja efektivnih prezentacija i Umrežavanje i timski rad (sertifikovane od strane Senata Univerziteta u Beogradu), novembar-decembar 2014.

Ana Đurić je autor i koautor 7 radova publikovanih u časopisima M20 kategorije (4-M21, 1-M22 i 2-M23) i jednog u časopisu M50 kategorije i 15 saopštenja na međunarodnih skupovima.

Strani jezici: engleski, ruski, grčki, norveški.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Ана Ђурић

Број индекса: 24/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Ефекат дисулфирама на механизме репродуктивне субакутне токсичности етанола и/или кадмијума код мужјака 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, 05. мај 2017.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Ана Ђурић

Број индекса: 24/08

Студијски програм: Докторске студије (Изборни модул: Токсиколошка хемија)

Наслов рада: „Ефекат дисулфирама на механизме репродуктивне субакутне токсичности етанола и/или кадмијума код мужјака пацова“.

Ментор: Проф. др Мирјана Ђукић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена 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, 05. мај 2017.

Изјава о коришћењу

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

„Ефекат дисулфирама на механизме репродуктивне субакутне токсичности етанола и/или кадмијума код мужјака 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, 5. мај 2017.
