

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU**  
**UNIVERZITET U BEOGRADU - FARMACEUTSKI FAKULTET**

**Komisiji za poslediplomsku nastavu – doktorske studije**

U Beogradu, 12.11.2015.

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 24.09.2015. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Vesna Matović, (mentor i predsednik Komisije), redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. Dr sc. Biljana Antonijević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Milena Kataranovski, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „Toksični efekti produžene izloženosti kadmijumu i/ili polihlorovanim bifenilima u pacova“ kandidata asistenta Aleksandre Buha. Na osnovu analize priložene doktorske disertacije podnosimo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

**IZVEŠTAJ**

**A. SADRŽAJ DOKTORSKE TEZE**

Doktorska disertacija asistenta Aleksandre Buha pod nazivom „Toksični efekti produžene izloženosti kadmijumu i/ili polihlorovanim bifenilima u pacova“ napisana je na 182 strane kucanog teksta formata A4, fontom Book Antiqua, veličine 12 i proredom 1,5. Disertacija se sastoji iz sledećih celina: 1. Uvod (27 strana), 2. Hipoteza i cilj istraživanja (2 strane), 3. Materijal i metode (16 strana), 4. Rezultati (59 strana), 5.

Diskusija (48 strana), 6. Zaključci (6 strana), 7. Literatura (18 strana), 8. Prilozi (6 strana). Na početku doktorske disertacije dat je sažetak na srpskom i engleskom jeziku. Disertacija sadrži 38 slika, 42 tabele i 246 literaturna navoda.

U poglavlju Uvod dat je prikaz dosadašnjih saznanja o toksičnosti kadmijuma (Cd) i polihlorovanih bifenila (PCB), kao i o toksikologiji smeša. Poglavlje Uvod podeljeno je u tri odeljka. U prvom odeljku su date najznačajnije činjenice o toksikologiji Cd, od kratkog istorijskog pregleda pa do toksikološkog značaja koji ovaj metal ima danas. Potom su, oslanjajući se na najnovije saznanja, obrađene sledeće celine: toksikokinetika Cd, mehanizmi njegove toksičnosti, posebno oksidativni stres i interakcije sa bioelementima, kao i toksični efekti Cd, sa posebnim osvrtom na potencijal Cd kao ometača endokrine funkcije, a dat je i kratak prikaz najznačajnijih dokaza o karcinogenosti Cd. U drugom odeljku uvoda razmatrana je toksičnost PCB. Dat je kratak istorijat upotrebe PCB i njihov toksikološki značaj. Kao i u slučaju Cd opisana je toksikokinetika PCB, mehanizmi toksičnosti PCB, kako onih sličnih dioksinima tako i PCB koji nisu slični dioksinima, kao i toksični efekti i najznačajniji dokazi o karcinogenosti ovih perzistentnih organskih zagađivača. U odeljku Toksikologija smeša predložen je značaj ispitivanja toksikologije smeša, uz navođenje postojećih koncepata koji se koriste u istraživanju toksičnosti smeša, kao i mogućnosti statističke obrade podataka pri proceni interakcija između komponenata smeše.

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su sledeći: 1) ispitivanje toksičnih efekata Cd primenom šest različitih doza Cd ili PCB (opseg obuhvata i niske doze koje odgovaraju izloženosti opšte populacije) na prirast telesne mase, hematološke parametre, parametre funkcije jetre, bubrega i tireoidne žlezde i dozne zavisnosti tih efekata, 2) ispitivanje uticaja Cd ili PCB na oksidativni status i interakcija Cd ili PCB sa bioelementima kao mogućih mehanizama njihove toksičnosti, 3) modelovanje odnosa doza–odgovor za ispitivane parametre pri primeni Cd ili PCB, te izračunavanje granične *Benchmark* doze ( $BMD_5$ , odnosno  $BMD_{10}$ ) za kritične toksične efekte i poređenje dobijenih BMD vrednosti sa NOAEL vrednostima procenjenim na osnovu rezultata ove studije, 4) ispitivanje toksičnih efekata smeše različitih doza Cd i PCB (primenom 3x3 dizajna) na prirast telesne mase, hematološke parametre, parametre funkcije jetre, bubrega i tireoidne žlezde, 5) ispitivanje uticaja smeša Cd i PCB na oksidativni status i interakcija smeše

Cd i PCB sa bioelementima kao mogućih mehanizama toksičnosti, 6) utvrđivanje eventualnog prisustva i potom tipa interakcija Cd i PCB na nivou ispitivanih parametara pri primeni različitih smeša Cd i PCB i ispitivanje uticaja doznog režima na prisustvo i tip interakcija Cd i PCB, 7) poređenje efekata smeša Cd i PCB i mehanizama njihove toksičnosti sa efektima i mehanizmima toksičnosti pojedinačno primenjenih agenasa Cd ili PCB.

U poglavlju Materijal i metode detaljno su navedeni podaci o eksperimentu i protokolu ispitivanja. U eksperimentu korišćeni su mužjaci Wistar pacova, a životinje su bile podeljene u 23 grupe koje su oralno putem sonde tokom 28 dana primale: vodu odnosno kukuruzno ulje – kontrolne grupe; Cd, kao vodeni rastvor CdCl<sub>2</sub>, u dozama 0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5 i 10 mg/kg t.m/dan; PCB, kao rastvor komercijalne smeše Aroclor 1254 u kukuruznom ulju, u dozama 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 mg/kg t.m/dan i 9 odabranih doznih kombinacija Cd i PCB. Po završetku eksperimenta životinje su žrtvovane dekapitacijom i prikupljena je krv i sledeći organi: jetra, bubrezi i štitasta žlezda. U okviru ovog poglavlja opisane su i metode za određivanje hematoloških parametara, albumina u serumu, aktivnosti enzima funkcije jetre u serumu (ALT, AST, ALP), parametara funkcije bubrega u serumu (uree i kreatinina), te hormona štitaste žlezde u serumu (T3, T4, FT3, FT4). Takođe su opisane i metode koje su korišćene za određivanje Cd, bioelemenata i PCB u prikupljenim uzorcima tkiva. Dat je i detaljan opis korišćenih metoda za ispitivanje parametara oksidativnog statusa u jetri i bubrezima: malondialdehida (MDA), ukupne –SH grupe, glutationa (GSH) i aktivnosti izoenzima citosolne superoksid dismutaze (CuZnSOD). U odeljku Statistička obrada podataka dat je prikaz statističkih metoda kao i softvera korišćenih u obradi dobijenih rezultata.

U poglavlju Rezultati predstavljeni su rezultati o uticaju pojedinačnih supstanci i njihovih smeša na prirast telesne mase, hematološke parametre, relativnu masu jetre, koncentraciju albumina i aktivnost enzima funkcije jetre u serumu, relativnu masu bubrega, na parametre funkcije bubrega, koncentraciju bioelemenata u jetri i bubrezima, nivoe parametara oksidativnog stresa u jetri i bubrezima, te relativnu masu štitaste žlezde i koncentraciju hormona štitaste žlezde u serumu. Dobijeni rezultati upoređeni su korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) sa LSD post hoc testom odnosno upotrebom neparametarskog Kruskal-Volisovog testa praćenog testom razlika medijana

za podatke koji nisu pratili normalnu raspodelu. Takođe uspostavljene su i korelacije između doza Cd i izmerenih koncentracija Cd u krvi, jetri i bubrezima, kao i između doza PCB i nivoa PCB u jetri i bubrezima životinja tretiranih pojedinačnim supstancama. Nakon uspostavljene korelacije između eksterne i interne doze primenjenih hemikalija ispitana je dozna zavisnost i za efekte kod kojih je utvrđena dozna zavisnost od pojedinačnih supstanci izračunate su granične BMD doze. Primenom analize razlika u nagibima krivih doza-odgovor ispitano je prisustvo interakcija i utvrđen tip interakcija u smešama Cd i PCB za ispitivane efekte smeše.

Poglavlje Diskusija je, kao i poglavlje Rezultati, podeljeno na tri dela: prvi deo u kome su analizirani rezultati dobijeni za efekte šest različitih doza Cd, drugi deo u kome su analizirani rezultati dobijeni za efekte šest različitih doza PCB i treći deo u kome su analizirani efekti smeša ove dve supstance. Dobijeni rezultati detaljno su analizirani i upoređeni sa odgovarajućim rezultatima drugih autora. Data su objašnjenja uočenih toksičnih efekata Cd i PCB, kao i smeša na ispitivane organe na osnovu utvrđenih mehanizama toksičnog dejstva za pojedinačne supstance i njihove smeše. Predloženi su mogući tipovi interakcija Cd i PCB za ispitivane efekte smeša. Efekti različitih doznih opsega smeša Cd i PCB i predloženi mehanizmi toksičnosti smeša upoređeni su sa efektima i mehanizmima toksičnosti pojedinačno primenjenih supstanci.

Na kraju rada, dati su Zaključci koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

## **B. ANALIZA REZULTATA**

Sprovedena studija je doprinela izučavanju toksičnih efekata pri subakutnoj ekspoziciji različitim dozama Cd ili PCB od kojih najniže odgovaraju izloženosti opšte populacije, te toksičnih efekata smeša različitih doznih opsega Cd i PCB, kao i sagledavanju mogućih mehanizama toksičnosti kako pojedinačnih supstanci tako i njihovih smeša. U studiji je ispitana zavisnost definisanih parametara toksičnosti od doza Cd ili PCB i izračunate su granične BMD doze pojedinačnih supstanci. Takođe, upoređeni su efekti pojedinačnih supstanci sa efektima njihove smeše i ispitano prisustvo i tip interakcija Cd i PCB, čime je dat značajan doprinos oblasti izučavanja toksičnosti smeše Cd i PCB.

Saglasno postavljenoj hipotezi u studiji je dokazan toksični efekat Cd odnosno PCB na prirast telesne mase, hematopoetski sistem, jetru, bubrege i štitastu žlezdu. Rezultati studije pokazali su da doze Cd  $\geq 1,25$  mg/kg t.m/dan dovode do smanjenja prirasta telesne mase pacova, da sve primenjenije doze Cd imaju za posledicu porast broj leukocita, a da je smanjenje broja trombocita dokazano samo primenom najviše doze, za razliku od eritrocita i hemoglobina čiji sadržaj nije bio promenjen pri intoksikaciji Cd. Na hepatotoksičnost Cd ukazuje i povećanje relativne mase jetre čak i pri najnižim primenjenim dozama kao i smanjenje nivoa albumina. Trovanje Cd dovelo je do povećanja nivoa uree i kreatinina u serumu pri primeni najviših doza Cd. Takođe, potvrđena je i uloga Cd kao ometača funkcije štitaste žlezde i to na osnovu smanjenja nivoa T3 i T4 hormona u serumu. Izraženiji uticaj Cd na nivoe T3 hormona upućuje da su ekstratireoidni procesi regulacije funkcije štitaste žlezde osetljiviji na dejstvo Cd od procesa koji se odigravaju u samoj žlezdi. Primena PCB takođe je dovela do smanjenja prirasta telesne mase pacov pri svim primenjenim dozama. Efekat na broj Er i Hb je kao i pri primeni Cd izostao, iako je najviša doza PCB izazvala smanjenje broja Tr i Leu. Hepatotoksičnost PCB dokazan je povećanom relativnom masom jetre do koje je došlo i pri najnižim dozama PCB, kao i povećanim nivoima AST u serumu koje je izazvala najviša doza, dok je o eventualnoj nefrotoksičnosti PCB svedoči dozno zavisni porast nivoa uree u serumu. Efekat PCB kao ometača funkcije štitaste žlezde dokazan je izraženim padom nivoa T4 i umerenim efektom na smanjenje T3 nivoa, kao i hipotrofijom štitaste žlezde

Dobijeni rezultati o uticaju ispitivanih hemikalija na oksidativni status u jetri i bubrežima, kao i na sadržaj bioeleminata u ovim organima potvrdili su pretpostavku o učešću ovih mehanizama u toksičnosti i Cd i PCB. Potvrđena je uloga nastanka oksidativnog stresa u toksičnim efektima ovih agenasa na jetru i bubrege, kao i efektima koje ispoljavaju na funkciju štitaste žlezde. Utvrđeno je da Cd izaziva smanjenje nivoa GSH, kao i akumulaciju Fentonovog metala Fe u jetri čime se tumači i porast lipidne peroksidacije u ovom organu. Osim oksidativnog stresa i interakcija sa bioelementima, inflamacija izazvana Cd, o kojoj svedoči porast broja leukocita dokazan u ovoj studiji, predložena je za još jedan mehanizam hepatotoksičnosti Cd. Uloga oksidativnog stresa u hepatotoksičnosti dokazana je i za PCB, pri čemu su, nasuprot Cd, PCB ispoljili izražen

uticaj na enzimsku komponentu sistema antioksidativne zaštite – CuZnSOD što se bar delom može objasniti smanjenjem sadržaja Zn u jetri. Ova studija je dokazala značajnu ulogu oksidativnog stresa i u toksičnosti koju Cd ispoljava na bubrege i to prevashodno uticajem Cd na enzimsku komponentu antioksidativne zaštite – citosolni enzim CuZnSOD. Dobijeni rezultati ukazuju da se i nefrotoksičnost PCB može objasniti na isti način, tj. efektom smanjenja aktivnosti CuZnSOD. Uočena disfunkcija štitaste žlezde pod uticajem Cd može se, bar delom, objasniti oksidativnim stresom i smanjenim sadržajem Se u jetri, dok se efekat PCB na funkciju štitaste žlezde objašnjava pre svega njihovim direktnim efektom na ovu žlezdu.

Primena šest različitih doza Cd, kao i PCB i utvrđena jaka korelacija između eksternih i internih doza ovih hemikalija omogućila je ispitivanje dozne zavisnosti definisanih parametara, procenu NOAEL vrednosti i izračunavanje znatno pouzdanije BMD doze. Utvrđena je dozna zavisnost za brojne ispitivane parametre. Vrlo niske BMDL<sub>5</sub> vrednosti dobijene pri primeni Cd za povećanje broja Leu u krvi, smanjenje sadržaja GSH u jetri, smanjenje aktivnosti enzima CuZnSOD u bubrezima i smanjenje nivoa T3 hormona u serumu upućuju da bi se ovi efekte Cd na posmatrane organe mogli smatrati kritičnim. Predloženi kritični efekti intoksikacije PCB su smanjenje broja Leu u krvi, smanjenje aktivnosti enzima CuZnSOD u jetri i bubrezima, kao i smanjenje nivoa T4 hormona u serumu. Izračunate BMDL<sub>5</sub> vrednosti u najvećem broju slučajeva niže su od NOAEL vrednosti procenjenih u ovoj studiji, kao i NOAEL vrednosti dobijenih u drugim studijama, čime ova studija otvara mogućnost dobijanja nižih referentnih doza pri predviđanju zdravstvenih rizika od izloženosti Cd ili PCB. Naročito treba istaći niske BMDL<sub>5</sub> vrednosti dobijene za efekat Cd na nivo T3 i BMDL<sub>5</sub> vrednosti dobijene za efekat PCB na nivo T4 hormona, s obzirom na to da su efekti na štitastu žlezdu i hormonalni status uopšte od izuzetnog značaja za pravilan rast, razvoj i funkcionisanje organizma.

Saglasno postavljenoj hipotezi, dobijeni rezultati pokazuju da je smeša Cd i PCB u najvećem broju slučajeva toksičnija od pojedinačno primenjenih supstanci te da je čak dovela i do ispoljavanja nekih efekata koji nisu uočeni pri primeni pojedinačnih supstanci. Ispitivanje efekata smeše Cd i PCB ukazalo je da smeša ima izraženiji uticaj na prirast telesne mase u odnosu na pojedinačno primenjene supstance. Uočena je i veća

hematotoksičnost smeša u odnosu na pojedinačne supstance što potvrđuje izraženije smanjenje nivoa Leu i Tr u poređenju sa efektom pojedinačnih supstanci, dok je smeša Cd i PCB dovela i do statistički značajnog smanjenja broja Er i sadržaja Hb, efekata koji nisu ni uočeni pri davanju pojedinačnih supstanci. Izraženija hepatotoksičnost smeše u odnosu na pojedinačne supstance potvrđena je intenzivnijem povećanjem relativne mase jetre, kao i izraženijem efektu smeše na koncentraciju albumina i aktivnost AST enzima u serumu. Rezultati dobijeni za relativnu masu bubrega, kao i za parametre funkcije bubrega u serumu svedoče o većoj toksičnosti smeše na bubrege. Dokazan je i veći potencijal smeše Cd i PCB da ometa funkciju štitaste žlezde o čemu svedoči manja relativna mase štitaste žlezde, kao i niži nivoi T3 i T4 hormona u serumu životinja tretiranih smešom. Izraženiji efekti smeša Cd i PCB na jetru i bubrege mogu se objasniti i izraženijim efektima smeša na parametre oksidativnog stresa što je i dokazano u jetri i bubrezima.

Studija takođe daje i odgovor na pitanje da li Cd i PCB primenjeni istovremeno stupaju u interakcije pri delovanju na ispitivane organe ili je pak njihovo dejstvo aditivno. Rezultati ukazuju da Cd i PCB stupaju u interakcije na nivou bubrega i štitaste žlezde tako što deluju sinergistički, dok je za efekat na jetru i krv dokazan aditivnost.

### **C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA IZ DOKTORSKOG RADA SA PODACIMA IZ LITERATURE**

Saglasno literaturnim podacima (El-Demerdash i sar, 2004), Cd je ispoljio imunomodularne efekte, odnosno doveo je do statistički značajnog porasta broja leukocita. Porast broja Leu može se objasniti aktivacijom imunološkog odgovora pod uticajem Cd, posebno aktivacijom Kupferovih ćelija koje potom stvaraju različite medijatore inflamacije koje doprinose nastanku Leu (Yamano i sar, 2000), kao i efektima Cd na slezinu koji su uočeni i u ovoj studiji. Eksperimentalne studije svedoče o hepatotoksičnim efektima Cd (Larregle i sar, 2008; Renugadevi i Milton Prabu, 2010), a rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji, tačnije uočeno smanjenje nivoa albumina, povećanje relativne mase jetre, kao i uspostavljena dozna zavisnost za nivoe AST u serumu, govore da je pod uticajem oralne subakutne izloženosti Cd došlo do izvesnih oštećenja jetre. U ovoj studiji uočene su značajne promena nivoa uree i kreatinina u

serumu, kao i smanjenje sadržaja albumina u serumu koje se može, osim sa smanjenom sintetskom sposobnošću jetre povezati i sa ranom albuminurijom što je u skladu sa nefrotoksičnošću Cd opisanoj u literaturi (Brzoska i sar, 2003). Rezultati ove teze nedvosmisleno su potvrdili ulogu Cd i kao ometača funkcije štitaste žlezde. Drugi autori su takođe ispitivali uticaj Cd na serumske nivoe hormona štitaste žlezde i uočili da Cd ometa funkciju štitaste žlezde (Curcic i sar, 2012; Gupta i Kar, 1999; Hammouda i sar, 2008). Na bazi rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj tezi nameće se zaključak da Cd interferira sa funkcijom štitaste žlezde i na nivou procesa koji se dešavaju izvan same žlezde, te da su ovi procesi čak osetljiviji na uticaj Cd od procesa koji se dešavaju u samoj žlezdi.

U disertaciji je ispitan i uticaj Cd na oksidativni status i sadržaj bioelemenata u jetri i bubrezima. Rezultati brojnih eksperimentalnih studija nesumnjivo potvrđuju uticaj akutne i subakutne intoksikacije Cd na nivoe GSH u jetri (Djukić-Ćosić i sar, 2007; Matović i sar, 2012), a u ovoj studiji dokazano je dozno zavisno i statistički značajno smanjenje nivoa GSH u jetri čak i pri najnižoj dozi Cd. Iako druge eksperimentalne studije ukazuju na efekte Cd na različite enzime antioksidativne zaštite (Yalin i sar, 2006; Wang et al., 2014), u ovoj doktorskoj studiji nije uočena promena aktivnosti CuZnSOD u jetri, kao ni zavisnost ovog parametra kako od primenjene doze Cd, tako ni od sadržaja Cd u jetri. Još jedan mehanizam delovanja Cd u jetri preko koga se objašnjava nastanak oksidativnog stresa je produkcija ROS pod uticajem Fe (Casalino i sar, 1997), što je potvrđeno i ovim eksperimentom budući da su doze  $\geq 1,25$  mg Cd/kg t.m/dan dovele do statistički značajnog povećanja sadržaja Fe u jetri. Utvrđeno smanjenje aktivnosti CuZnSOD u bubregu pod uticajem Cd u skladu je sa rezultatima drugih studija (Casalino i sar, 2002; Morales i sar, 2006), a ovaj efekat Cd objašnjen je direktnim interakcijama između Cd i enzima i to usled vezivanja Cd za -SH grupe, kao i zamenom metala kofaktora u aktivnim centrima enzima sa Cd (Renugadevi i Prabu, 2010), što je potvrđeno i rezultatima ove eksperimentalne studije. Efekti Cd kao ometača endokrine funkcije mogu se takođe delom tumačiti preko ispitivanih mehanizama toksičnosti, jer je jedan od predloženih mehanizama inhibicije enzima 5'-monodejodinaze koji, izvan štitaste žlezde, vrši konverziju T4 hormona u aktivnu formu T3 upravo lipidna peroksidacija membrana ćelija za koje se ovaj enzim mora vezati kako bi ispoljio svoju



aktivnost (Chaurasia i sar, 1996). Smanjeni nivoi Se u jetri uočeni u ovoj studiji, kao i uspostavljena srednja jačina korelacije između nivoa Se u jetri i nivoa T3 u serumu svakako potvrđuju i ulogu interakcija Cd sa bioelementima u smanjenju nivoa T3 pod uticajem Cd.

Kada je u pitanju toksičnost PCB rezultati ove disertacije pokazuju da PCB dovode do statistički značajnog smanjenja prirasta telesne mase u svim tretiranim grupama pacova u odnosu na kontrolnu grupu, a slični rezultati dobijeni su i u drugim studijama u kojima je ispitivana toksičnost kako komercijalnih smeša PCB, tako i pojedinačnih kongenera (Banudevi i sar, 2006; Lai i sar, 2013). U ovoj doktorskoj tezi primena komercijalne smeše PCB nije ispoljila značajne efekte na broj Er, kao ni na nivo Hb u krvi, dok je pri najvišoj dozi došlo do statistički značajnog smanjenja broja Tr i Leu u odnosu na kontrolnu grupu. Uočena imunosupresija pri višim dozama PCB može se tumačiti sposobnošću PCB da izazovu apoptozu monocita i timocita što je dokazano u *in vitro* studijama (Shin i sar, 2000; Tan i sar, 2003). Hepatotoksičnost PCB je obimno dokumentovana u studijama na eksperimentalnim životinjama (Esteban i sar, 2014; Kutlu i sar, 2007), a rezultati ove doktorske disertacije dokazali su povećanje relativne mase jetre, te promene nivoa AST u serumu pacova i dozno-zavisno sniženje nivoa albumina u serumu. Sa druge strane, ne postoji dovoljno literaturnih podataka vezanih za efekte PCB na parametre renalne funkcije, naročito ako se broj ovih studija uporedi sa brojem studija u kojima su ispitani hepatotoksični efekti PCB. U ovoj doktorskoj disertaciji kao parametri funkcije bubrega ispitivani su relativna masa bubrega, te serumski nivoi kreatinina i uree. Nije uočen statistički značajan efekat PCB na ove parametre, ali bi potvrđena dozna zavisnost za ureu mogla ukazati na moguće suptilne nefrotoksične efekte PCB. Dokazana nefrotoksičnost PCB može se dovesti u vezu sa toksičnim efektima PCB na štitastu žlezdu koji sutakođe dokazani u ovoj studiji. Utvrđeno je dozno-zavisno smanjenje relativne mase štitaste žlezde kao i smanjenje sadržaja hormona štitaste žlezde, kako vezanih tako i slobodnih oblika T3 i T4. Dramatičan pad nivoa T4 i umereni efekat na nivo T3 po primeni Aroclor 1254 su u skladu sa rezultatima drugih studija (Martin i Klaassen, 2010; Vansell i Klaassen, 2002). Vrlo niske BMD vrednosti izračunate za nivo T4 hormona, kao i niska procenjena NOAEL vrednost ukazuju da PCB remete homeostazu funkcije štitaste žlezde čak i pri vrlo niskim dozama, što imajući

u vidu značaj hormona štitaste žlezde za pravilno funkcionisanje celog organizma potvrđuje izuzetan toksikološki značaj ovih hemikalija.

U disertaciji je takođe ispitan i uticaj PCB na oksidativni status i sadržaj bioelemenata u jetri i bubrezima, kao mogućih mehanizama preko kojih PCB ispoljavaju svoje toksične efekte. Podaci prikupljeni u ovoj studiji potvrdili su prisustvo oksidativnog stresa u jetri izloženih pacova. Uočeni su izraženiji toksični efekti na aktivnost enzimske komponente antioksidativne zaštite – CuZnSOD, nego na GSH kao ispitivanu neenzimsku komponentu zaštite, a svakako da i remećenje homestaze bioelemenata, Zn i Se, ima izvesnu ulogu u uočenom razvoju oksidativnih poremećaja u jetri. Uočeni poremećaj oksidativne ravnoteže u jetri pod uticajem PCB u skladu je sa literaturnim podacima (Banudevi i sar, 2006; Sekaran i sar, 2012). Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije uočava se da je i u bubrezima, kao i u jetri, efekat PCB više izražen na aktivnost enzimske komponente zaštite o čemu nema literaturnih podataka.

Za razliku od brojnih podataka o toksičnosti pojedinačno primenjenih hemikalija prikupljenih iz brojnih eksperimentalnih studija, podaci o toksičnim efektima i mehanizmima toksičnosti smeše Cd i PCB vrlo su retki, dok studije u kojima se porede efekti pojedinačnih supstanci sa efektima njihove smeše, prema našim saznanjima, ne postoje.

Dobijeni rezultati o intenzivnijim efektima smeše Cd i PCB u odnosu na pojedinačne supstance u skladu su sa dokazima dobijeni u studijama u kojima je ispitan efekat smeša drugih hemikalija sličnog mehanizma toksičnosti, a koje su ukazale na mogućnost javljanja toksičnih efekata smeše i pri primeni doza koje se pojedinačno smatraju „sigurnim“ (Kortenkamp i sar, 2007). U ovoj doktorskoj disertaciji dokazana je i uloga oksidativnog stresa u hepatotoksičnosti i nefrotoksičnosti smeše ova dva toksična agensa, pri čemu je u jetri utvrđen aditivni efekat, a u bubrezima sinergistički efekat hemikalija na definisane parametre. Rezultati dela studije koja se odnosila na efekat smeše Cd i PCB na nivoe hormona T3 i T4 u serumu su ukazali da smeše ovih supstanci ispoljavaju izraženije sinergističke efekte na nivoe hormona štitaste žlezde nego pojedinačne supstance. Toksično delovanje metala i perzistentnog organskog zagađivača na nivo tireoidnih hormona uočeno je i u drugim studijama (Curcic i sar, 2012; Wade i sar, 2002; Zhu i sar, 2014). Literaturni podaci ukazuju na jetru kao organ u kojem se

dešavaju različiti procesi koji kontrolišu funkciju štitaste žlezde (Gupta i Kar, 1999), ali rezultati dobijeni u ovoj studiji isključuju jetru kao relevantno mesto interakcija ove dve hemikalije kada je u pitanju funkcija štitaste žlezde. Oslanjajući se na zapažanje ove disertacije, može se pretpostaviti da se sinergističke interakcije ove dve supstance dešavaju na nivou same štitaste žlezde.

## LITERATURA

- Brzoska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Pilat-Marcinkiewicz, B., Sawicki, B., 2003. Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol Alcohol* 38, 2–10.
- Banudevi, S., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Vignesh, C., Aruldas, M.M., Arunakaran, J., 2006. Role of  $\alpha$ -tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCB exposed male albino rats. *Food Chem. Toxicol.* 44, 2040–2046.
- Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C., Landriscina, C., 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 179, 37–50.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, C., 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: The possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 346, 171–179.
- Chaurasia, S.S., Gupta, P., Kar, A., Maiti, P.K., 1996. Free radical mediated membrane perturbation and inhibition of TYPE-I iodothyronine 5'-monodeiodinase activity by lead and cadmium in rat liver homogenate. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 765–770.
- Curcic, M., Jankovic, S., Jacevic, V., Stankovic, S., Vucinic, S., Durgo, K., Bulat, Z., Antonijevic, B., 2012. Combined Effects of Cadmium and Decabrominated Diphenyl Ether on Thyroid Hormones in Rats. *Arh. Za Hig. Rada Toksikol.-Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 63, 255–262.
- Djukić-Ćosić, D., Ninković, M., Maličević, Z., Matović, V., Soldatović, D., 2007. Effect of magnesium pretreatment on reduced glutathione levels in tissues of mice exposed to acute and subacute cadmium intoxication: A time course study. *Magnes. Res.* 20, 177–186.
- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Kedwany, F.S., Baghdadi, H.H., 2004. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: Protective role of vitamin E and  $\beta$ -carotene. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1563–1571.
- Esteban, J., Elabbas, L.E., Borg, D., Herlin, M., Åkesson, A., Barber, X., Hamscher, G., Nau, H., Bowers, W.J., Nakai, J.S., Viluksela, M., Håkansson, H., 2014. Gestational and lactational exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 modulates retinoid homeostasis in rat offspring. *Toxicol. Lett.* 229, 41–51.
- Gupta, P., Kar, A., 1999. Cadmium induced thyroid dysfunction in chicken: Hepatic type I iodothyronine 5'-monodeiodinase activity and role of lipid peroxidation. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 39–44.

- Hammouda, F., Messaoudi, I., El Hani, J., Baati, T., Saïd, K., Kerkeni, A., 2008. Reversal of cadmium-induced thyroid dysfunction by selenium, zinc, or their combination in rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 126, 194–203.
- Kortenkamp, A., Faust, M., Scholze, M., Backhaus, T., 2007. Low-level exposure to multiple chemicals: Reason for human health concerns? *Environ. Health Perspect.* 115, 106–114.
- Kutlu, S., Colakoglu, N., Halifeoglu, I., Sandal, S., Seyran, A.D., Aydin, M., Yilmaz, B., 2007. Comparative evaluation of hepatotoxic and nephrotoxic effects of aroclors 1221 and 1254 in female rats. *Cell Biochem. Funct.* 25, 167–172.
- Lai, I.K., Klaren, W.D., Li, M., Wels, B., Simmons, D.L., Olivier, A.K., Haschek, W.M., Wang, K., Ludewig, G., Robertson, L.W., 2013. Does dietary copper supplementation enhance or diminish PCB126 toxicity in the rodent liver? *Chem. Res. Toxicol.* 26, 634–644.
- Larregle, E.V., Varas, S.M., Oliveros, L.B., Martinez, L.D., Antón, R., Marchevsky, E., Giménez, M.S., 2008. Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1786–1792.
- Martin, L., Klaassen, C.D., 2010. Differential effects of polychlorinated biphenyl congeners on serum thyroid hormone levels in rats. *Toxicol. Sci.* 117, 36–44.
- Matović, V., Buha, A., Bulat, Z., Dukić-Ćosić, D., Miljković, M., Ivanišević, J., Kotur-Stevuljević, J., 2012. Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver. *Food Chem. Toxicol.* 50, 552–557.
- Morales, A.I., Vicente-Sánchez, C., Sandoval, J.M.S., Egido, J., Mayoral, P., Arévalo, M.A., Fernández-Tagarro, M., López-Novoa, J.M., Pérez-Barriocanal, F., 2006. Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food Chem. Toxicol.* 44, 2092–2100.
- Renugadevi, J., Milton Prabu, S., 2010. Quercetin protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cadmium in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 62, 471–481.
- Renugadevi, J., Prabu, S.M., 2009. Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology* 256, 128–134.
- Sekaran, S., Kandaswamy, S., Gunasekaran, K., Perumal, E., Afsar Basha, F.Y., Madhan Mohan, B.J., Jagadeesan, A., 2012. Protective Role of Quercetin on Polychlorinated Biphenyls (Aroclor-1254) Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Liver of Adult Male Rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 26, 522–532.
- Shin, K.-J., Bae, S.S., Hwang, Y.-A., Seo, J.K., Ryu, S.H., Suh, P.-G., 2000. 2,2',4,6,6'-Pentachlorobiphenyl induces apoptosis in human monocytic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169, 1–7.
- Tan, Y., Li, D., Song, R., Lawrence, D., Carpenter, D.O., 2003. Ortho-substituted PCBs kill thymocytes. *Toxicol. Sci.* 76, 328–337.
- Vansell, N.R., Klaassen, C.D., 2002. Increase in rat liver udp-glucuronosyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation. *Drug Metab. Dispos.* 30, 240–246.
- Wade, M.G., Parent, S., Finnson, K.W., Foster, W., Younglai, E., McMahon, A., Cyr, D.G., Hughes, C., 2002. Thyroid toxicity due to subchronic exposure to a complex mixture of 16 organochlorines, lead, and cadmium. *Toxicol. Sci.* 67, 207–218.

- Wang, J., Zhu, H., Liu, X., Liu, Z., 2014. Oxidative Stress and Ca<sup>2+</sup> Signals Involved on Cadmium-Induced Apoptosis in Rat Hepatocyte. *Biol. Trace Elem. Res.* 161, 180–189.
- Yalin, S., Comelekoglu, U., Bagis, S., Sahin, N.O., Ogenler, O., Hatungil, R., 2006. Acute effect of single-dose cadmium treatment on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 140–144.
- Yamano, T., DeCicco, L.A., Rikans, L.E., 2000. Attenuation of cadmium-induced liver injury in senescent male Fischer 344 rats: Role of kupffer cells and inflammatory cytokines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162, 68–75.
- Zhu, B., Wang, Q., Wang, X., Zhou, B., 2014. Impact of co-exposure with lead and decabromodiphenyl ether (BDE-209) on thyroid function in zebrafish larvae. *Aquat. Toxicol.* 157, 186–195.

#### **D. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE TEZE**

Toksični metali i perzistentni organski zagađivači se akumuliraju u životnoj sredini, ulaze u lanac ishrane, te je rizik koje ove hemikalije predstavljaju po zdravlje ljudi značajan globalni problem današnjice. U ovoj doktorskoj tezi su vršena *in vivo* ispitivanja Cd i PCB kao jednih od najznačajnijih predstavnika ove dve grupe hemikalija i to davanih pojedinačno ili u smeši.

Rezultati ove disertacije daju značajan doprinos istraživanju toksikologije Cd, kao i PCB, s obzirom da i pored brojnih istraživanja o toksičnim efektima ovih hemikalija, posebno Cd, nepotpuno je poznavanje efekata koje ove hemikalije ispoljavaju pri niskim dozama, kao i tačnih mehanizama ovih efekata. Primenom šest različitih doza Cd odnosno PCB i praćenjem efekata na krv, jetru, bubrege i funkciju štitaste žlezde preko odgovarajućih parametara uočena je dozna zavisnost za brojne efekte, pri čemu posebno treba istaći da se u određenom broju slučajeva ovi efekti javljaju pri niskim dozama, dozama koje su značajne za izloženost opšte populacije. Uočeni efekti objašnjeni su već ranije predloženim mehanizmima toksičnosti, oksidativnim stresom i interakcijama sa bioelementima, ali je pri tome posmatrana dozna zavisnost efekata i parametara oksidativnog stresa kao najznačajnijeg mehanizma toksičnosti. Uočeni efekti pri niskim dozama Cd/PCB potvrđeni su NOAEL vrednostima procenjenim dobijenih rezultata, kao i izračunatim BMD dozama, koje su niže u odnosu na do sada prihvaćene NOAEL vrednosti, što ukazuje da je dosadašnji rizik od ovih hemikalija možda potcenjenj.

Ova doktorska disertacija je dala poseban doprinos ispitivanju toksikologije smeša koja poslednjih godina dobija sve više na aktuelnosti, budući da je i čovek izložen „koktelu“ hemikalija, te se i nameće potreba da se ispita da li će istovremena izloženost različitim hemikalijama dovesti do efekata koji se po svojoj prirodi i intenzitetu razlikuju od efekata pojedinačno primenjenih supstanci. Podaci o toksičnosti smeše Cd i PCB u literaturi su retki i nedovoljni, te rezultati ove doktorske disertacije svakako predstavljaju originalni naučni doprinos o subakutnim toksičnim efektima ove smeše. Dokazano je da smeše Cd i PCB ispoljavaju veću toksičnost u odnosu na pojedinačno primenjene toksične agense, a u nekim slučajevima su čak ispoljile efekte koji nisu dokazani za pojedinačne supstance. Rezultati ove doktorske disertacije daju još jednu potvrdu da primena koncepta u kome se rizik od hemikalija procenjuje za svaku hemikaliju pojedinačno nosi sa sobom opasnost od potcenjivanja rizika koje hemikalije predstavljaju po zdravlje ljudi i životnu sredinu. Ovakav zaključak otvara ogromno polje daljih istraživanja.

#### **E. Objavljeni rezultati koji čine sastavni deo doktorske teze**

##### **Radovi u međunarodnim časopisima (M20)**

Buha A, Antonijević B, Milovanović V, Janković S, Bulat Z, Matović V. Polychlorinated biphenyls as oxidative stress inducers in liver of subacutely exposed rats: Implication for dose-dependence toxicity and benchmark dose concept. *Environ Res.* 2015, 136: 309-17. (IF=4.373; M21)

Buha A, Antonijević B, Bulat Z, Jačević V, Milovanović V, Matović V. The impact of prolonged cadmium exposure and co-exposure with polychlorinated biphenyls on thyroid function in rats. *Toxicol Lett* 2013, 221: 83-90. (IF=3.262; M21)

##### **Radovi saopšteni u izvodu na međunarodnim naučnim skupovima (M34)**

Buha A, Bulat Z, Antonijević B, Dukic-Cosic D, Jacevic V, Vucinic, S, Matovic, V. Estimation of benchmark dose for thyroid hormone levels in rats exposed to prolonged cadmium intoxication. *Toxicol Lett*, 221, 2013, S222.

Matović V, Buha A, Antonijević B, Milovanović V. Estimation of Benchmark Dose for Relative Thyroid Gland Weight in Rats Subacutely Exposed to Polychlorinated

Biphenyls. The XIII International Congress of Toxicology, June 30-July 4, 2013, Coex, Seoul, Korea, Abstract Book:173.

Buha A, Milovanović V, Janković S, Bulat Z, Antonijević B, Matović V. BMD Approach as Alternative to Traditionally Used NOAEL in Assessing the Hepatotoxicity Risk from PCBs. 11<sup>th</sup> Serbian Congress of Toxicology »New Frontiers and Challenges in Toxicology« Abstract Book, ISBN 978-86-917867-0-0, 2014, 155-156.

Buha A, Milovanović V, Antonijević B, Bulat Z, Vukomanović P, Matović V. Subacute toxicity of PCBs in rats: Is hepatic oxidative stress induction dose dependent? Toxicol Lett, 2014, 229, S54.

Matović V, Buha A. Prolonged Cd and PCBs co-exposure and thyroid function in rats: Is the liver relevant point of their interactions? International Cadmium Symposium 2015, Sassari, June 25-27, 2015. Congress Proceedings, 27. (*usmeno saopštenje*)

Buha A, Milovanović V, Antonijević B, Ćurčić M, Lukić V, Matović V. Prolonged PCBs and Cd co-exposure and hepatic GSH levels in liver of rats: Is the combined effect additive, synergistic or antagonistic? Toxicol Lett, 2015, 238, S353.

Buha A, Milovanović V, Nikolić D, Đukić-Ćosić D, Vukomanović P, Matović V. Dose dependence of Cd effects of antioxidant defense system in liver of subacutely exposed rats. Toxicol Lett, 2015, 238, S123.

#### **Saopštenja sa nacionalnih skupova štampana u izvodu (M64)**

Buha A, Ćurčić M, Milovanović V, Antunović M, Džoković M, Jačević V, Vučinić S, Bulat Z, Antonijević B, Matović V. Lipidna peroksidacija u jetri: efekti izloženosti perzistentnim polihalogenovanim zagađivačima. Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Zbornik sažetaka. 424-5.

## **F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE**

Rezultati ove doktorske teze pružaju originalan i značajan naučni doprinos u oblasti ispitivanja toksičnosti kadmijuma i polihlorovanih bifenila, kao i toksičnosti njihove smeše. Kandidat je uspešno ostvario postavljene ciljeve i deo rezultata objavio u dva naučna rada štampana u vrhunskim međunarodnim časopisima. Predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj izveštaj i odobri kandidatu Aleksandri Buha javnu odbranu doktorske teze pod nazivom „**Toksični efekti produžene izloženosti kadmijumu i/ili polihlorovanim bifenilima u pacova**“.

Beograd, 12.11.2015.

### **Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:**

Prof. dr Vesna Matović, mentor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Biljana Antonijević

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Milena Kataranovski

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet