

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ – ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА

КОМИСИЈИ ЗА ПОСЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Наставно-научно веће Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду, на седници одржаној 19.05.2022. године именовало је Комисију за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата магистра фармације Драгане Јаворац, под насловом:

Токсични ефекти ниских доза олова на моделу субакутне изложености пацова

Комисија у саставу:

1. Др сц. Биљана Антонијевић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет, председник
2. Др сц. Петар Булат, редовни професор, Универзитет у Београду, Медицински факултет
3. Др сц. Александра Буха Ђорђевић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

прегледала је приложену дисертацију и подноси Наставно-научном већу Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. ОСНОВНИ ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Маг. фарм. Драгана Јаворац је рођена 22. августа 1992. године у Прибоју, Република Србија, где је завршила основну школу „Десанка Максимовић“ као носилац „Вукове дипломе“. Средњу медицинску школу завршила је у Београду са одличним успехом. Интегрисане академске студије на Универзитету у Београду – Фармацеутском факултету, студијски програм Фармација, уписала је школске 2011/2012. године а завршила 13. јула 2016. године са просечном оценом 9,53 и оценом 10 на одбрањеном завршном раду на Катедри за токсикологију „Академик Данило Солдатовић“. Током студија била је стипендиста

Задужбине Драгољуба Маринковића, од 2012. до 2016. године. Докторске академске студије на Универзитету у Београду – Фармацеутском факултету, модул Токсикологија, уписала је школске 2017/2018. године. Положила је све испите на докторским студијама са просечном оценом 9,80. Добитник је Годишње награде најбољим студентима завршне године докторских академских студија за школску 2019/2020. која се додељује поводом годишњице оснивања Фармацеутског факултета у Београду. Добитница је награда за изузетне резултате за научноистраживачки рад и објављивање рада у часопису категорије M21a за школску 2020/2021. годину, као и награде Задужбине Ђоке Влајковића за најбољи научни рад младих научних радника Универзитета у Београду за 2021. годину. Школске 2019/2020. уписала је специјалистичке академске студије Токсиколошка процена ризика на Универзитету у Београду – Фармацеутском факултету, а завршила септембра 2020. године са просечном оценом 9,88. Тренутно је запослена као истраживач-приправник на националним и међународним пројектима Фармацеутског факултета у Београду. Драгана Јаворац је аутор једног поглавља у књизи водећег међународног значаја (M14). Објавила је преко 43 библиографске јединице (радова и саопштења) од којих 16 радова у часописима категорије M20 (9 радова у међународним часописима изузетних вредности-M21a, 4 рада у врхунским међународним часописима-M21 и 3 рада у истакнутим међународним часописима-M22).

V. ОСНОВНИ ПОДАЦИ О ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација кандидата Драгане Јаворац под насловом „**Токсични ефекти ниских доза олова на моделу субакутне изложености пацова**“, написана је јасним и прегледним стилем на 105 страница (од увода до литературе), формата A4, фонтом *Times New Roman*, величине 12 и једноструким проредом. У склопу дисертације приказано је укупно 46 табела, 23 слика и 260 литературних навода. Дисертација садржи следећа поглавља: 1. Увод, 2. Основне хипотезе и циљеви истраживања, 3. Материјал и методе, 4. Резултати, 5. Дискусија, 6. Закључци и 7. Литература. На почетку дисертације представљен је Сажетак рада на српском и енглеском језику, затим скраћенице и акроними, док се на крају дисертације налазе прилози: Прилог 1. Свеобухватан приказ резултата добијених *Benchmark* моделовањем и Прилог 2. Резултати истраживања из докторске дисертације публиковани и штампани у целини у часописима категорије M20, кратка биографија кандидата, и потписане

изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије и изјава о коришћењу докторске дисертације.

С. ПРЕДМЕТ И ЦИЉ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Подаци о токсичним механизмима и ефектима олова (Pb) из досадашњих анималних и хуманих студија се углавном заснивају на изложености високим дозама, те стога постоји потреба да се испитају механизми токсичног дејства и да се утврде токсични ефекти у условима продужене изложености ниским дозама Pb. Имајући наведено у виду, предмет дисертације био је да се на моделу субакутне изложености пацова испита утицај ниских доза Pb на различите органе и системе органа. Предмет дисертације је оригиналан и значајан за развој науке и примену у регулаторне сврхе при процени ризика по здравље људи при изложености Pb. Специфични циљеви дисертације били су:

1. Испитати утицај шест ниских растућих доза Pb на прираст телесне масе и прираст масе органа.
2. Испитати утицај шест ниских растућих доза Pb на хематолошке параметре у крви и биохемијске параметре у серуму.
3. Испитати утицај шест ниских растућих доза Pb на нивое тироидних хормона и тестостерона у серуму код изложених пацова.
4. Одредити нивое Pb у пуној крви и органима пацова након субакутне изложености ниским растућим дозама Pb.
5. Испитати утицај шест ниских растућих доза Pb на нивое биоелемената: бакра, цинка, мангана и гвожђа у пуној крви и органима изложених пацова.
6. Одредити параметре оксидативног статуса и антиоксидативне заштите у серуму и органима пацова након субакутне изложености ниским растућим дозама Pb.
7. Испитати утицај шест ниских растућих доза Pb на активност ацетилхолинестеразе у мозгу изложених пацова.
8. Испитати патохистолошке промене у ткивима пацова након изложености ниским растућим дозама Pb.
9. Одредити *Benchmark* дозе (*BMD*) Pb за испитиване ефекте у крви и органима.
10. Проценити *BMD* студије и критични токсични ефекат.

D. ОСНОВНЕ ХИПОТЕЗЕ

Имајући у виду да је у данашње време општа популација хронично изложена ниским нивоима Pb различитим путевима, а да се подаци о токсичности из досадашњих студија углавном базирају на изложености високим дозама, постоји потреба да се испитају механизми токсичног дејства Pb у условима продужене изложености ниским дозама. На основу досадашњих научних сазнања претпостављено је да ће примена Pb на моделу пацова у шест ниских растућих доза у опсегу 0,1-15 mg Pb/kg телесне масе (т.м.) током периода од 28 дана резултовати концентрацијама Pb у крви које одговарају концентрацијама измереним код опште популације како би се симулирала реална изложеност. Ова хипотеза је и потврђена у експерименту. Додатно, претпостављено је да ће резултати добијене студије омогућити добијање података о токсичним механизмима и ефектима ниских доза Pb у различитим органима као и израчунавање *BMD* за испитиване токсичне ефекте што би допринело процени референтне дозе Pb у процесу токсиколошке процене ризика по здравље људи и идентификацији критичног токсичног ефекта студије. Наведене хипотезе су научно потврђене у резултатима дисертације.

E. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Садржај докторске дисертације дат је на две странице, након скраћеница и акронима. **Уводно** поглавље састоји се из два дела: (1) Олово и (2) *Benchmark* моделовање односа доза-одговор. У првом делу увода дати су најзначајнији подаци о Pb, његове физичко-хемијске особине, начини изложености Pb, токсикокинетика, механизми токсичности, токсични ефекти, доступни подаци биомониторинга, процена експозиције Pb и терапија тровања Pb. У другом делу Уводног поглавља приказано је моделовање односа доза-одговор, историјски осврт, приказ примера моделовања, софтвера, доступних математичких модела и параметара који се користе за моделовање односа доза-одговор. Основне **хипотезе и циљеви** су јасно дефинисани. У поглављу **Материјал и методе** наведене су коришћене хемикалије, описан је експериментални дизајн студије, методолошки поступци обраде и припреме узорака крви и органа, методе за анализу испитиваних параметара, статистичка анализа података као и *Benchmark* моделовање односа доза-одговор. У делу

експериментални дизајн описана је анимална студија. Студија је спроведена на мужјацима албино пацова (*Rattus Norvegicus*), *Wistar* соја, старости шест недеља који су преузети из Центра ветеринарске службе Војномедицинске академије у Београду. Након допремања, 42 пацова су рандомизована по шест у групи и расподељена у седам пластичних кавеза са металним поклопцима у виду решетака. Групе животиња су свако јутро током 28 дана, оралном гаважом помоћу сонде, примале Pb-ацетат у облику воденог раствора у дозама: 0,1; 0,5; 1; 3; 7 и 15 mg Pb/kg т.м/дан, означене као групе Pb0.1, Pb0.5, Pb1, Pb3, Pb7 и Pb15. Контролна група животиња добијала је дестиловану воду. Дозе Pb су одабране са циљем симулирања изложености ниским дозама. Испитиване дозе представљају распон доза, од оних које су ниже од до сада публикованих *NOAEL*, (енгл. *No observed adverse effects level*, *NOAEL*) (1) доза Pb које не изазивају штетан ефекат, до доз(1)(1)а за коју се сматра да ће довести до токсичних ефеката (2). Додатно, дозе су одабране са циљем да се код експерименталних животиња након 28 дана добију концентрације Pb у крви које одговарају публикованим вредностима Pb у крви измерених код опште популације (3–5) како би се на анималном моделу симулирала ниска изложеност Pb. Двадесет четири часа од последње дозе (29. дан), животиње су жртвоване на хуман начин. Све процедуре у вези третмана животиња које су спровођене током експеримента су у складу са протоколом одобреним од стране Етичког комитета Фармацеутског факултета у Београду (број етичке дозволе: 323-07-11822/2018-05). У овом поглављу описане су процедуре анализирања хематолошких и биохемијских параметара, поступци припреме узорака у микроталасној пећници, а затим одређивања концентрације Pb, бакра (Cu), цинка (Zn), мангана (Mn) и гвожђа (Fe) у крви и ткивима атомском апсорпционом спектрофотометријом, анализа оксидативног статуса спектрофотометријским и имунохемијским методама, патохисолошка анализа, као и одређивање активности ензима ацетилхолинестеразе. У делу Статистичка анализа података, наведене су статистичке методе које су биле коришћене, подаци су тестирани на нормалност расподеле и хомогеност варијансе. Ако су подаци пратили нормалну расподелу и хомогеност варијансе је потврђена, даље је у раду за поређење средњих вредности између група коришћена једнофакторска анализа варијансе праћена одговарајућим пост-хок тестом (*Fisher's LSD* или *Bonferroni* тестом). Ови подаци су представљени као средња вредност и стандардна девијација. У супротном, уколико подаци нису пратили нормалну

расподелу и/или хомогеност варијансе није била иста у групама, коришћен је *Kruskal Wallis* тест праћен *Mann-Whitney* тестом и подаци су представљени као медијана и опсег (минимум-максимум). За статистичку обраду података коришћени су софтвери: *SPSS® 18.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL)* и *GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA)*. У поглављу **Резултати** приказани су оригинални резултати добијени у истраживању. Дат је детаљан опис резултата који су приказани табеларно и графички. У поглављу **Дискусија** приказана је детаљна анализа добијених резултата ове дисертације, у контексту доступних литературних података. У поглављу **Закључци** изнети су релевантни закључци који проистичу из резултата спроведеног истраживања и њихове анализе. У поглављу **Литература** наведене су референце које су коришћене током израде ове докторске дисертације. На крају дисертације налазе се прилози, кратка биографија кандидата, и изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије и изјава о коришћењу докторске дисертације.

F. ОСТВАРЕНИ РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

У поглављу **Резултати** дат је приказ оригиналних резултата представљених табеларно или графички. Третман Pb није довео до статистички значајне промене у прирасту телесне масе и релативној маси органа. Статистички значајно више вредности Pb у крви (енгл. *Blood lead level, BLL*) у односу на контролу, запажане су код пацова третираних дозом већом од $0,5 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан. Највиша вредност *BLL* добијена је код пацова третираних највишом дозом и износила је $16,1 \pm 3,8 \text{ } \mu\text{g/dL}$. Са растом примењених доза примећен је пораст акумулације Pb у органима. У групама Pb7 и Pb15 статистички значајно повећање концентрације запажено је у свим испитиваним органима. Што се тиче ефеката на **крв** највиша доза Pb је довела до смањења броја еритроцита и смањења нивоа хемоглобина за више од 10% у односу на вредности добијене у контролној групи. У свим групама третираним Pb дошло је до смањења нивоа хематокрита, које је било најизраженије у Pb15 групи. У групама третираним са 1 и 3 mg Pb/kg т.м./дан дошло је до смањења просечног волумена еритроцита у односу на контролну групу. Од биохемијских параметара може се истаћи да је третман Pb довео до дисбаланса липидног профила: холестерола, триглицерида и *LDL* (енгл. *Low-density lipoprotein, LDL*) холестерола. Што се тиче параметара оксидативног статуса у серуму у свим

групама третираним Pb дошло је до инхибиције активности ензима супероксид дисмутазе (*SOD*). У свим групама је запажен нижи ниво Cu у крви у односу на контролу. Са порастом дозе запажен је тренд раста нивоа Zn у крви. Смањење нивоа Fe у крви је запажено у свим третираним групама, при чему статистички значајно у групама третираним са 7 и 15 *mg Pb/kg* т.м./дан. Третман Pb довео је до значајног снижења нивоа тестостерона у серуму пацова у групама третираним дозама вишим од 0,1 *mg Pb/kg* т.м./дан. Запажен је тренд пораста нивоа тироидних хормона, пре свега T4 и *fT4* (енгл. *free T4*, *fT4*), који су били статистички значајно виши у групама Pb1 и Pb15. При моделовању екстерне дозе са одговором, дозна зависност је добијена за следеће параметре: хемоглобин, холестерол, HDL (енгл. *high-density lipoprotein*, *HDL*) холестерол, креатинин, мокраћна киселина, супероксид анјон радикала ($O_2^{\bullet-}$) и *SOD* у серуму, као и за Fe, Zn, Cu у крви, док је у случају моделовања интерних доза, које представљају *BLL*, са одговором, дозна зависност добијена за хемоглобин, холестерол, *HDL* холестерол, креатинин, уреу, узнапредовале продукте оксидације протеина (енгл. *Adverse outcome protein products*, *AOPP*) у серуму и Fe у крви. Од ефеката на **јетру** у групама пацова које су третиране Pb запажен је пораст нивоа *AOPP*. У третираним групама запажа се индукција активности ензима *SOD*, са највишим порастом у групи третираном највишом дозом (15 *mg/kg* т.м./дан). Ниво малондиалдехида (*MDA*) је био нижи у групама Pb 0.1 и Pb 0.7 у односу на контролу. Након анализе биоелемената у јетри, може се запазити тренд пада нивоа Cu са најнижом вредношћу у највишој дозној групи. Моделовањем односа доза-одговор уочена је дозна зависност за *AOPP* (екстерна доза-одговор) и Cu (екстерна и интерна доза-одговор). При испитивању ефеката третмана Pb на **бубреге**, издваја се инхибиције активности ензима *SOD* у бубрезима, док промене у нивоу биоелемената нису запажене. Моделовањем односа екстерних доза-одговор за ефекте Pb у бубрезима добијена је дозна зависност за активност *SOD*. Анализом испитиваних параметара у **мозгу**, запажено је статистички значајно смањење активности ензима ацетилхолинестеразе у односу на контролу је запажено код група третираних дозама Pb нижим од 7 *mg Pb/kg* т.м./дан, док код доза 7 и 15 *mg Pb/kg* т.м./дан, није дошло до промене у активности ензима. Уочено је значајно повећање нивоа $O_2^{\bullet-}$ у мозгу код пацова третираних са 3, 7 и 15 *mg Pb/kg* т.м./дан у поређењу са вредношћу у контроли. Највиши ниво $O_2^{\bullet-}$ измерен је у мозгу пацова третираним највишом дозом, који се статистички

значајно разликовао у односу на све остале групе. Активност *SOD* значајно је смањена у свим третираним групама у односу на контролу. Од есенцијалних елемената забележен је пад нивоа Fe и повећање нивоа Zn у мозгу. Хистолошки преглед мозданог ткива показао је патолошке промене код пацова третираних највишом дозом (15 mg Pb/kg т.м./дан), где се уочава дисторзија облика Пуркињеових ћелија (скупљање и деформација једра). Може се видети блага до умерена кондензација хроматина и појава перинуклеарног „халоа“. Распоред Пуркињеових ћелија је такође измењен и може се приметити велики размак између суседних Пуркињеових ћелија. Моделовањем односа екстерних доза Pb са одређеним одговором добијена је дозна зависност за *AOPP*, тотални оксидативни статус (*TOS*), $\text{O}_2^{\bullet-}$ и Zn при чему је тренд промене био позитиван. Моделовањем односа интерних доза Pb (*BLL*, $\mu\text{g/dL}$) са одговором, добијена је дозна зависност само за $\text{O}_2^{\bullet-}$, при чему је тренд био позитиван. У **срцу** у свим третираним групама нивои $\text{O}_2^{\bullet-}$ су били повишени у поређењу са вредношћу у контролној групи, с тим да је статистички значајно повећање забележено само у групи пацова третираних највишом дозом 15 mg Pb/kg т.м./дан. У групи Pb15 забележен је статистички значајно виши ниво MDA у односу на контролу. Виши нивои Mn су откривени у срцу у групама животиња третираних са 1 и 7 mg Pb/kg т.м./дан у поређењу са контролном групом, док у нивоима Cu, Fe и Mn није било промена. Приликом моделовања односа екстерна доза-одговор показана је дозна зависност за вредности MDA у срцу. Моделовање односа интерних доза (*BLL*)-одговор показана је дозна зависност за MDA и ниво Cu у срцу. У другом случају, кад је као интерна доза посматран ниво Pb у срцу, моделовање односа интерна доза-одговор је показало дозну зависност за ниво сулфхидрилних група (*SHG*). У **тестисима** у групама третираним дозама вишим од $0,5 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан запажају се виши нивои Zn у односу на контролну вредност. Статистички значајно повећање Cu и смањења Mn примећено је у свим третираним групама у поређењу са контролном групом. Моделовањем односа доза-одговор у тестисима добијена је дозна зависност екстерно примењених доза Pb и нивоа Zn при чему је тренд ефекта био позитиван. Анализом резултата добијених мерењем биоелемената показано је да третман Pb није довео до разлике у нивоима Cu, Zn, Mn и Fe у **слезини** пацова након 28 дана излагања. У **фемуру** у свим групама третираним Pb је примећено статистички значајно повећање нивоа Cu. У случају Zn, Mn и Fe, третман Pb није довео до промена у нивоима. Моделовањем

односа екстерне дозе и одговора, добијена је дозна зависност за нивое Cu и Fe. Моделовањем интерне дозе (BLL)-одговор добијена је дозна зависност за Cu. У групама третираним дозама вишим од 1 mg Pb/kg т.м./дан примећен је тренд раста нивоа Zn у **панкреасу**. Моделовањем односа екстерних доза Pb и одговора добијена је дозна зависност за ниво Zn у панкреасу. Третман Pb у свим групама је довео до снижења нивоа у **тимусу**. Са друге стране није било статистички значајне разлике у нивоима Cu и Zn. Нивои Mn су били испод лимита квантификације те се нису могли квантификовати примењеном методом анализирања метала.

Највећи научни допринос ове докторске дисертације је испитивање зависности доза-одговор за сваки испитивани параметар, као и одређивање *BMD*, која ће даље допринети сигурнијој процени ризика по здравље људи при изложености ниским дозама Pb. Најнижа доза која је изазвала ефекат на крв је смањење нивоа Cu. За ендокрини систем то је снижење нивоа тестостерона, за јетру смањење нивоа Cu, у бубрезима инхибиција *SOD*, у срцу повећање вредности *MDA*, у мозгу повећање вредности *TOS*, у тестисима и панкреасу повећање нивоа Zn и у фемуру повишени нивои Cu. Најнижа вредност *BMD* добијена у студији је за ефекат смањења нивоа тестостерона у серуму пацова. Следећи најосетљивији ефекти јесу индукција *SOD* у бубрезима, повећање нивоа Cu у фемуру и снижење Cu у крви. Затим, повећање *TOS* у мозгу и повећање Zn у панкреасу и снижење Cu у јетри. Наведене дозе су биле реда величине $e-06 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан. У случају моделовања интерних доза Pb (BLL)-одговор, најнижа добијена *BMD* је за ефекат Pb на повећање концентрације Cu у фемуру. Параметри који су у оба случаја дали однос доза-одговор при моделовању екстерних и интерних доза су Cu у јетри са трендом смањења и Cu у фемуру са трендом повећања нивоа.

G. УПОРЕДНА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА КАНДИДАТА СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

У епидемиолошким студијама, приликом процене експозиције Pb, предност се даје оним проценама које су засноване на мерењима Pb у крви, при чему концентрација у крви одражава скорашњу изложеност Pb. Процена изложености Pb могућа је и на бази резултата мерења Pb у костима, при чему добијена вредност одражава телесно оптерећење Pb (6). У

овој студији, изложеност Pb током 28 дана наведеним дозама, довела је до пораста нивоа Pb у крви и ткивима. Највиша вредност Pb је забележена у крви пацова третираних највишом дозом ($16,1 \pm 3,8 \mu\text{g/dL}$), док су остале вредности биле ниже и износиле су код најниже дозне групе ($1,38 \pm 2,24 \mu\text{g/dL}$). Добијени опсег вредности *BLL* код третираних пацова одговара вредностима *BLL* у крви опште популације измереним у епидемиолошким студијама (3,7–11).

У овом раду, субакутна изложеност испитиваним дозама Pb, довела је до промена у хематолошким параметрима где је уочено снижење нивоа хематокрита, хемоглобина и средњег волумена еритроцита које је најизраженије у највишој дозној групи. Моделовањем односа доза-одговор добијена је дозна зависност за ниво хемоглобина где је *BMD* износила $6,41 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан. Уочене промене су очекиване и могу бити поткрепљене бројним студијама о штетним ефектима Pb на хематолошки систем (7,9,12,13). Добијени резултати су у складу са студијом коју су спровели *Dewanjee* и сар. (2013) где је уочено смањење броја црвених крвних зрнаца код пацова *Wistar* соја при ниском нивоу изложености ($5 \text{ mg Pb-ацетата/kg}$ т.м./дан) током 40 дана - периода оралног излагања (14). У крви, инхибиција дехидратазе делтааминолевуленске киселине од стране Pb доводи до инхибиције синтезе хемоглобина и производње слободних радикала: $\text{O}_2^{\bullet-}$, хидроксил радикала и водоник пероксида (15,16). Добијени резултати су показали инхибицију *SOD* у свим третираним групама што се може објаснити директном инхибицијом овог ензима од стране Pb али и способношћу Pb да замени метале који имају улогу кофактора ензима (15–17). Моделовањем односа доза-одговор добијена доза *BMD* је била веома ниска ($0,5 \mu\text{g/kg}$ т.м./дан) што указује да промена активности *SOD* у крви може бити осетљив индикатор изложености Pb. Супероксид дисмутаза је ензим антиоксидативне заштите чија физиолошка функција зависи од Cu и Zn (18). Интеракција између Pb и есенцијалних катјона је још један важан механизам токсичности Pb (19,20). Добијени резултати су показали да третман Pb доводи до снижења нивоа Cu у крви чак и у групи пацова третираних најнижом дозом. Слично запажање добијено је у студији коју су спровели *Ademuyiwa* и сар. (2010) (1) где је излагање дози од 200 ppm Pb (низак ниво) путем воде за пиће током 12 недеља довело до нижих нивоа Cu у крви код пацова у поређењу са контролом. Овај ефекат се може објаснити

могућом прерасподелом Cu у друга ткива. Смањење нивоа Cu је зависило од дозе и процењена BMD је била веома ниска ($1,4 \text{ ng Pb/kg}$ т.м.) показујући нивое Cu у крви као могући осетљиви параметар токсичности Pb . Нивои Zn , есенцијалног катјона који има бројне физиолошке улоге, такође је био предмет истраживања у овој студији. Моделовање односа доза-одговор, показано је да је промена Zn дозно-зависна са израчунатом $BMD 0,002 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан. Повишени нивои Zn у свим групама које су примале дозе веће од 1 mg Pb/kg т.м./дан може бити последица замене Zn Pb у протеинима који везују Zn , те се вишак ослобођеног Zn прерасподељује у крв (21,22). За разлику од резултата добијених у овој студији где су испитиване ниске дозе Pb , у другим студијама при експозицији вишим дозама утврђено је смањење нивоа Zn у крви (20,23). Услед компетитивне конкуренције Cu и Zn за цревне и ћелијске транспортере у овој студији уочени су супротни трендови нивоа Cu и Zn који се могу објаснити компетитивном конкуренцијом за апсорпцију и транспорт кроз биолошке мембране (24).

Промене у активностима ензима јетре забележене су у бројним студијама на експерименталним животињама, али са примењеним знатно већим дозама Pb него што су испитиване у овом експерименту. У студији коју су спровели *Alva* и сар. (2015) хронична изложеност Pb (50 mg/L , путем воде) довела је до повишене вредности аланин аминотрансферазе као и аспартат аминотрансферазе у серуму женки пацова након периода излагања од 40 дана (25). Друга студија на женкама пацова изложених хронично дозама Pb од 30 и 100 mg Pb/kg т.м. током 10, 20, 30, 40, 50 и 60 дана, такође је показала повећање нивоа ензима јетре (26). У овој дисертацији резултати указују на смањење активности аланин аминотрансферазе при највишој дози, вероватно због широког опсега физиолошких вредности и високих стандардних девијација (27,28). Поред тога, није промењена ни активност других ензима јетре аспартат трансаминазе и алкалне фосфатазе, те се може закључити да при наведеним дозама и периоду изложености Pb није довело до статистички значајних и дозно-зависних промена ензима јетре. Повишене вредности триглицерида су забележене у групи третираној са 1 mg Pb/kg т.м./дан. Ово запажање се може објаснити способношћу Pb да модификује функцију ензима укључених у метаболизам липида у јетри водећи ка поремећају биосинтезе жучних киселина, која је неопходна за елиминацију

холестерола из организма (29). Тренд смањења нивоа укупног холестерола и *HDL* холестерола примећен је у свим третираним групама. Слични резултати вредности холестерола су добијени у студији на пацовима изложеним 35 mg Pb/kg телесне масе недељно (30). Моделовање односа доза-одговор је показало да је *BMD* за укупни холестерол био $0,004 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан, а за *HDL*, *BMD* вредност је износила $0,094 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан. У епидемиолошким студијама код популација изложених *Pb* на радном месту, повишене вредности *BLL* доводе се у везу са повишеним али и са сниженим вредностима нивоа *HDL* холестерола (31,32). У студији коју су спровели *Lu* и сар. (2020) *BLL* код деце изложене *Pb* повезан је са смањењем нивоа *HDL* и вишим систолним крвним притиском (33). Имајући у виду да *HDL* холестерол има заштитно дејство у процесу атеросклерозе, те да има значајну улогу у регулацији кардиоваскуларног притиска (34), промена у вредностима *HDL* може бити један од механизма који доприноси настанку високог крвног притиска изазваног *Pb* и повећаног ризика од кардиоваскуларних болести повезаних са изложеношћу *Pb* (32,35).

Добијени резултати су показали индукцију *SOD* ензима и повећање нивоа *AOPP* у јетри које је зависно од дозе, при чему је добијена *BMD* износила $0,00025 \text{ mg/kg}$ т.м./дан. Индукција јетриног *SOD* ензима у приказаној студији може бити заштитни механизам активиран као одговор на индукцију оксидативног стреса, имајући у виду да производња слободних радикала може стимулисати активност антиоксидативних ензима (36). Слично резултатима ове студије, *Berrahal* и сар. (2007) су у свом експерименту на пацовима (40 дана, $10,39 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан) показали да третман *Pb* индукује повећање активности *SOD* у јетри и смањење активности *SOD* у бубрезима (37). У студијама где су коришћене више дозе *Pb*, документована је инхибиција ензима *SOD*, каталазе и глутатион пероксидазе. На пример, у студији на *Wistar* пацовима где је *Pb* примењивано интраперитонеално у дози од 20 mg/kg т.м./дан током 5 дана дошло је до инхибиције ензима *SOD* у јетри (38). Друга студија на пацовима *Wistar* соја третираних *Pb* (100 mg/kg т.м./дан, пер орално, 60 дана) такође је резултирала инхибицијом активности ензима *SOD*, каталазе и глутатион пероксидазе, док су нивои *MDA* били повишени у јетри, у поређењу са нетретираном групом (39).

У овој студији третман са 7 mg Pb/kg т.м.дан је резултирао значајно повишеним нивоима мокраћне киселине, урее, Na и K што може указивати на оштећење функције бубрега. У бројним хуманим и анималним студијама излагање Pb је повезано са повишеним маркерима нефротоксичности у серуму и са развојем хроничне бубрежне инсуфицијенције (8,40–43). У овој студији, нижи нивои Fe у бубрезима су утврђени у неким групама, што би могло бити повезано са Pb-индукованом анемијом. Показало се да Pb изазива микроцитну, хипохромну анемију након продужене изложеност експерименталним животињама са трендом снижавања нивоа црвених крвних зрнаца, хемоглобина и Fe (44). У овој студији је показано дозно-зависно смањење активности *SOD* бубрега код животиња третираних Pb, са добијеним *BMD*: $1,3\text{e-}06 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан. Слично добијеним резултатима, у студији на мужјацима *Wistar* пацова, Pb-ацетат (20 mg/kg т.м., интраперитонеално 7 дана) је изазвао инхибицију активности реналних антиоксидативних ензима (*SOD*, каталазе и глутатион пероксидазе) (42). Инхибиција реналне *SOD* је примећена у студији на *Wistar* пацовима који су третирани са $22,5 \text{ mg/kg}$ т.м. Pb-нитрата, током 28 дана (45).

У приказаној студији, четири ниже дозе Pb ($0,1$, $0,5,1$ и 3 mg Pb/kg т.м./дан) су изазвале инхибицију активности ензима ацетилхолинестеразе у мозгу која је била најизраженија у групи Pb3, за више од 40% у поређењу са контролом, док у случају примене виших доза није дошло до промене активности ацетилхолинестеразе. Уочени резултати у овој студији могу бити последица афинитета Pb за функционалне групе (амино, сулфхидрилна и карбоксилна) ензима (46,47) што води ка инхибицији каталитичке функције (23,48–50). У више различитих студија на експерименталним животињама је запажено да Pb доводи до оштећења учења и памћења код експерименталних животиња повезаних са дисфункцијом холинергичког система (51,52). Поред инхибиције ензима ацетилхолинестеразе, олово је инхибирало и активност *SOD*. Слично добијеним резултатима, инхибиција активности *SOD* у мозгу је примећена у студији коју је спровела *Baronowska* и сар. (2012) на пацовима изложеним пре и пост-натално Pb-ацетату путем воде за пиће у концентрацији 0,1% (53). У студији коју су спровели *Abdulmajeed* и сар. (2015), излагање 0,2% Pb током 28 дана довело је до повећања локомоторне и истраживачке активности *Wistar* пацова и оштећења памћења која су била праћена смањењем активности *SOD* и повишеним нивоима *MDA* у

мозгу (54). Супероксид дисмутаза је металоензим (зависан од Cu и Zn) који катализује реакцију дизмутације $O_2^{\bullet-}$ у кисеоник и водоник-пероксид, те се инхибиција овог ензима може објаснити директном интеракцијом са Pb (55), а следствено томе се очекује и повећање концентрације $O_2^{\bullet-}$. Још један неуротоксични механизам Pb уочен у овој студији био је поремећај хомеостазе есенцијалних елемената који се огледа у дозно-зависном повећању нивоа Zn са *BMD* вредношћу од $6,3e-06 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан. Прихваћено је мишљење да сличности између Pb и двовалентних катјона доводе до интеракција и поремећаја нивоа есенцијалних елемената у мозгу, као и у другим ткивима (20,56). Дисбаланс нивоа металних јона и оксидативни стрес повезани су са хиперактивним понашањем како у хуманим тако и у студијама на експерименталним животињама (1,52,57,58).

У приказаној студији Pb доводи до повећања нивоа Cu у срцу, зависно од *BLL* (*BMD*: $0,4 \mu\text{g Pb/dL}$). Бакар је важан есенцијални елемент који учествује у процесу регенерације срчаног ткива и неопходан је за активацију ангиогенезе. Показано је да при исхемији миокарда ниво Cu у срцу опада (59), а да адекватна доступност бакра доводи до стимулације ангиогенезе и последично регенерације срца (60). Предложени механизам активације ангиогенезе бакром је реактивација фактора 1 изазваног услед настанка хипоксије (61). Резултати ове студије сугеришу да субакутна изложеност Pb у испитиваним дозама доводи до повећања нивоа $O_2^{\bullet-}$ у срчаном ткиву пацова. Чак и најнижа доза коришћена у експерименту ($0,1 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан) изазвала је повећање нивоа $O_2^{\bullet-}$ и *MDA* у поређењу са контролом. Индукција продукције реактивних кисеоничних врста, укључујући $O_2^{\bullet-}$, може бити изазвана услед инхибиције биосинтезе хема и активацијом никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидазе (62). У токсичним ефектима изазваним Pb на кардио-васкуларни систем, утицај на ниво азот-моноксида (NO) и поремећај у функцији вазодилатације такође могу играти важну улогу (63). Истраживања су показала да повећање кисеоничних слободних радикала инактивира NO и инхибира његову физиолошку функцију у вазодилатацији васкуларних мишића. Производ реакције између $O_2^{\bullet-}$ и NO је високо реактивни пероксинитрит анјон ($ONOO^-$) који поседује висок потенцијал за интеракцију са протеинима и дезоксирибонуклеинском киселином, што последично резултује оштећењима ћелије услед

нитрозативног стреса (64). Индукција стварања $O_2^{\bullet-}$ може довести до интеракције са липидним мембранама што води пероксидацији липида и повећања нивоа *MDA* (56,65,66). Виши нивои *MDA* су примећени и у групи третираној првом дозом *Pb* коришћеном у експерименту ($0,1 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан), те би се могло претпоставити да је *NOAEL* још нижи и не може се одредити на основу добијених података. Слично као у овој студији, високи нивои *MDA* у срцу такође су утврђени у студији спроведеној на пацовима, који су, у поређењу са овим истраживањем, били изложени вишој дози *Pb* (интраперитонеално, 20 mg Pb/kg т.м.) 5 дана недељно, током 8 недеља (67).

У складу са добијеним резултатима ове студије, смањење нивоа тестостерона је забележено и у студији спроведеној на пацовима који су били изложени *Pb* током 35 дана (150 mg/kg т.м./дан), што је праћено индукцијом оксидативног стреса (повећавањем нивоа *MDA*) у тестисима и са абнормалностима у квалитету сперме. У истом раду изложеност *Pb* је довела и до хистолошких промена герминалног епитела и смањења концентрације Лајдигових ћелија (68). Друга студија на пацовима показала је да изложеност *Pb* током 65 дана које даје *BLL* вредности око $30 \mu\text{g/dL}$ (69) доводи до смањења нивоа тестостерона (70). Иако су друге студије показале хистолошке промене код пацова изложених већим дозама *Pb* (71,72), у овој студији, која симулира ниску изложеност *Pb*, није било хистолошких разлика између третираних група и контролне, као ни између третираних група, што имплицира да су у случају изложености ниским дозама *Pb* укључени неки други механизми репродуктивне токсичности. У овој студији запажено је благо повишење нивоа *Zn* у групама које су третиране дозама већим од $0,1 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан. Однос екстерна доза-одговор је добијен за нивое *Zn* са *BMD* вредношћу $0,004 \text{ mg Pb/kg}$ т.м./дан. У студији спроведеној на пацовима показано је да *Pb* у већим дозама (60 mg/kg т.м./дан током шест недеља) доводи до смањења садржаја *Zn* у тестисима (73). Третман *Pb* није утицао на нивое *Fe*, док су нивои *Cu* били виши, а нивои *Mn* нижи у односу на контролу, чак и у групи третираној најнижом дозом. Слично добијеним резултатима ове студије, повећање нивоа *Cu* и *Zn* у тестисима је утврђено у експерименту који је изведен на пацовима *Wistar* соја третираним 1000 ppm Pb у храни током три месеца (74). Штавише, *Tvrda* и сар. (2013) су показали да физиолошке концентрације *Mn*, *Cu*, *Fe* и других есенцијалних елемената у тестисима имају позитивну

корелацију са антиоксидативним маркерима и негативну са *MDA*, што указује на заштитну улогу ових есенцијалних елемената у оксидативном оштећењу ткива тестиса (75).

У овој студији, резултати су показали више вредности *T4* и *fT4* након третмана *Pb*. Ограничен број студија указује да ниске дозе *Pb* могу интерферирати са тироидним хормонима. *Pb* може интерферирати са хипофизном регулацијом рада штитасте жлезде те више вредности тироидних хормона могу бити последица недостатка значајног одговора *TSH* на нивое *T4* и *T3* у серуму са једне стране (изостанак негативне спреге хипофизе од стране хормона тироиде), али и директне стимулације синтезе хормона везивањем за *TSH* рецепторе, с обзиром на улогу *Pb* као металохормона, са друге стране (76,77). Насупрот добијеним резултатима у овој студији, примена виших доза *Pb* довела је до смањења вредности *T3* и *T4*, а разлика у резултатима се може приписати различитим условима у експериментима, пре свега дозним нивоима и дужином изложености (78).

У овој студији *Pb* је довело до анемије и снижених нивоа *Fe* у крви те последично и смањеног допремања ка органима, чиме се могу објаснити снижене вредности *Fe* у фемуру. У акутној студији спроведеној на мишевима, растуће дозе *Pb* су довеле до дозно зависног снижења нивоа *Fe* у костима мишева (19). У наведеној студији интеракција са биоелементима у фемуру се такође може објаснити на основу хемијских особина *Pb* које му омогућавају да компетитивно истискује двовалентне катјоне из различитих комплекса у физиолошким процесима (79).

У наведеној студији добијена је дозна зависност за повећање нивоа *Zn* у панкреасу (*BMD*: $3,84 \times 10^{-6}$ *mg Pb/kg* т.м./дан). *Zn* поседује многобројне кључне улоге у функционисању панкреаса. *Zn* активира антиоксидативне протеине и смањује инфламацију у ћелијама. Поред тога *Zn* такође може активирати *GPR39* рецептор на површинама ћелија који модулирају сигнализацију калцијума (*Ca*) и може утицати лучење инсулина. Пошто се *GPR39* такође налази у многим другим ткивима, његова активација може утицати на друге важне ћелијске одговоре као што је антиинфламаторни одговор макрофага. Недостатак *Zn* може повећати ризик од развоја акутног панкреатитиса. Стога, повишене вредности *Zn* у

панкреасу, у овој студији, могу бити адаптивни, тј. протективни механизам организма активиран као одбрана од штетних ефеката Pb.

У овој студији показано је да третман Pb у свим групама доводи до снижења нивоа Fe у тимусу које није било дозно зависно. Мало је доступних података који указују на потенцијалну интерференцу Pb са биоелементима у тимусу. Интеракције Pb са Fe су описане у многобројним студијама, што је и раније разматрано у овој студији. Истраживања на PC12 ћелијској култури су показала дозно-зависно смањење експресије протеина ефлукса Fe под дејством Pb. Pb може заменити Fe при везивању за Fe хелатазу у митохондријама (80) одговоран за хелирање Fe протопорфирином (19). У овој студији Pb је довело до анемије и снижених нивоа Fe у крви те последично и смањеног допремања ка органима, чиме се потенцијално могу објаснити снижене вредности Fe у тимусу.

Имајући у виду да Pb може изазвати токсичне ефекте чак и при ниским вредностима *BLL*, Центар за контролу и превенцију болести предлаже снижавање референтне вредности Pb *BLL* са 5 на 3,5 $\mu\text{g}/\text{dL}$, за децу као вулнерабилну групу (81,82). И друга регулаторна тела предузимају мере, па је и Европска агенција за безбедност хране 2013. године одлучила да повуче раније прихваћену вредност толеришућег недељног уноса (ТНУ) Pb који је износио 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ т.м. јер је био повезан са порастом систолног крвног притиска код одраслих и снижењем интелигенције код деце. На основу до сада расположивих података закључено је да успостављање нове вредности ТНУ за Pb која би се могла сматрати безбедном још увек није могуће (83).

У овој студији испитани су токсични ефекти ниских доза Pb са циљем достизања *BLL* вредности сличних онима које су утврђене код неизложене опште популације. Шест дозних група, омогућило је идеалне статистичке услове за утврђивање *BMD*. Одређивање *BMD* се користи као регулаторно прихваћен метод за утврђивање референтне тачке, односно полазне тачке, у процени ризика по здравље људи (84–87). Добија се статистичким моделовањем, и представља напреднији метод у поређењу са традиционалним приступом *NOAEL* (88). У овој студији је утврђено да изложеност Pb при ниским дозама

утиче на скоро све виталне органе, мењајући њихову физиолошку функцију. Моделовањем односа доза одговор добијена је дозна зависност за укупно 25 параметара од који је 13 испитивано у крви/серуму, 4 у мозгу, по 2 у јетри и фемуру и по 1 у бубрезима, срцу, тестисима и панкреасу. Од параметара оксидативног статуса дозно-зависно повећање су дали *AOPP* у јетри и мозгу, *MDA* у срцу, $O_2^{\bullet-}$ у мозгу, док је у бубрезима примећена дозно-зависна инхибиција активности *SOD* ензима. У случају биоелемената *Cu* је показано дозно-зависно снижење у крви и јетри а дозно-зависно повећање у фемуру. У случају *Zn* дозно-зависно повећање је запажено у крви, мозгу и панкреасу.

Поређењем *BMD* вредности за добијене односе доза-одговор, дошло се до најнижих вредности доза за ефекте у појединачним органима/системима који могу послужити за процену критичног токсичног ефекта. Најнижа *BMD* вредност добијена у студији је за ефекат смањења нивоа тестостерона у серуму пацова. Генерално посматрајући дозно зависни ефекти ниских доза *Pb* добијени су у погледу поремећаја хомеостазе *Zn* и *Cu*, као и везано за индукцију оксидативног стреса. Наведени резултати указују да би се даља истраживања могла усмерити на испитивање односа доза-одговор при још нижим дозним нивоима *Pb* који би обухватили вредности доза нижих од $0,1 \text{ mg Pb/kg т.м./дан}$.

Литература:

1. Ademuyiwa O, Agarwal R, Chandra R, Raj Behari J. Effects of sub-chronic low-level lead exposure on the homeostasis of copper and zinc in rat tissues. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. 2010;24(3):207–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.01.002>
2. Apaydin FG, Bař H, Kalender S, Kalender Y. Subacute effects of low dose lead nitrate and mercury chloride exposure on kidney of rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;41:219–24.
3. Wang T, Tu Y, Wang K, Gong S, Zhang G, Zhang Y, et al. Associations of blood lead levels with multiple genotoxic biomarkers among workers in China: A population-based study. *Environ Pollut*. 2021;273.
4. Chen Z, Huo X, Zhang S, Cheng Z, Huang Y, Xu X. Relations of blood lead levels to echocardiographic left ventricular structure and function in preschool children. *Chemosphere* [Internet]. 2021;268(xxxx):128793. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128793>

5. Chen C, Wang N, Zhai H, Nie X, Sun H, Han B, et al. Associations of blood lead levels with reproductive hormone levels in men and postmenopausal women: Results from the SPECT-China Study. *Sci Rep*. 2016;6(July):2–10.
6. Wright RO, Schwartz J, Wright RJ, Bollati V, Tarantini L, Park SK, et al. Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons. *Environ Health Perspect*. 2010;118(6):790–5.
7. Hsieh NH, Chung SH, Chen SC, Chen WY, Cheng YH, Lin YJ, et al. Anemia risk in relation to lead exposure in lead-related manufacturing. *BMC Public Health* [Internet]. 2017 May 5 [cited 2021 Mar 15];17(1). Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12889-017-4315-7>
8. Alasia DD, Emem-Chioma PC, Wokoma FS. Association of lead exposure, serum uric acid and parameters of renal function in Nigerian lead-exposed workers. *Int J Occup Environ Med*. 2010;1(4):182–90.
9. Shah F, Kazi TG, Afridi HI, Baig JA, Khan S, Kolachi NF, et al. Environmental exposure of lead and iron deficit anemia in children age ranged 1-5years: A cross sectional study. *Sci Total Environ* [Internet]. 2010 [cited 2021 Mar 15];408(22):5325–30. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969710008326?casa_token=3dAluJICPKwAAAAA:fgUI1SHno2Ui9L_XNYBs66cRQ8mmtqm3tdVPf8ySeNjoTqo5ct2oUZcUJYExEGQIJQSOUIgY4xs
10. Mandić-Rajčević S, Bulat Z, Matović V, Popević M, Lepić M, Mandić B, et al. Environmental and take-home lead exposure in children living in the vicinity of a lead battery smelter in Serbia. *Environ Res* [Internet]. 2018;167:725–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.08.031>
11. Zubero MB, Aurrekoetxea JJ, Ibarluzea JM, Arenaza MJ, Rodríguez C, Sáenz JR. Heavy metal levels (Pb, Cd, Cr and Hg) in the adult general population near an urban solid waste incinerator. *Sci Total Environ*. 2010;408(20):4468–74.
12. Jain NB, Laden F, Guller U, Shankar A, Kasani S, Garshick E. Relation between blood lead levels and childhood anemia in India. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2005 [cited 2021 Mar 15];161(10):968–73. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-abstract/161/10/968/104880>

13. Mateo R, Beyer WN, Spann JW, Hoffman DJ, Ramis A. Relationship between oxidative stress, pathology, and behavioral signs of lead poisoning in mallards. *J Toxicol Environ Heal - Part A*. 2003;66(14):1371–89.
14. Dewanjee S, Sahu R, Karmakar S, Gangopadhyay M. Toxic effects of lead exposure in Wistar rats: Involvement of oxidative stress and the beneficial role of edible jute (*Corchorus olitorius*) leaves. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2021 Mar 15];55:78–91. Available from:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512009131?casa_token=kt6w56R_vf0AAAAA:C_b2rAzl_OYnnoq9jHMg1aZOSU7LrvTDt1I1BSBV0auGWQ_GDI6oFp_wCGc6TdDcIOYVmBkwmi0
15. Matović V, Buha A, Dukić-Ćosić D, Bulat Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys [Internet]. Vol. 78, *Food and Chemical Toxicology*. 2015. p. 130–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.011>
16. Flora SJS, Saxena G, Gautam P, Kaur P, Gill KD. Response of lead-induced oxidative stress and alterations in biogenic amines in different rat brain regions to combined administration of DMSA and MiADMSA. *Chem Biol Interact*. 2007;170(3):209–20.
17. Farmand F, Ehdaie A, Roberts CK, Sindhu RK. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ Res*. 2005;98(1):33–9.
18. Mylroie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986;82(3):512–20.
19. Yu Y, Yu L, Zhou X, Qiao N, Qu D, Tian F, et al. Effects of acute oral lead exposure on the levels of essential elements of mice: a metallomics and dose-dependent study. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. 2020;62(June):126624. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126624>
20. Wang L, Zhou X, Yang D, Wang Z. Effects of lead and/or cadmium on the distribution patterns of some essential trace elements in immature female rats. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 2011 Dec 18;30(12):1914–23. Available from:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327111405865>

21. Hartwig A. Metal interaction with redox regulation: An integrating concept in metal carcinogenesis? Vol. 55, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier; 2013. p. 63–72.
22. Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci*. 2013;18(2):144–57.
23. Richetti SK, Rosemberg DB, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, Bonan CD. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology* [Internet]. 2011;32(1):116–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2010.11.001>
24. Bulat Z, Dukić-Ćosić D, Antonijević B, Buha A, Bulat P, Pavlović Z, et al. Can zinc supplementation ameliorate cadmium-induced alterations in the bioelement content in rabbits? *Arh Hig Rada Toksikol*. 2017;68(1):38–45.
25. Alya A, Ines DB, Montassar L, Najoua G, Saloua EF. Oxidative stress, biochemical alterations, and hyperlipidemia in female rats induced by lead chronic toxicity during puberty and post puberty periods. *Iran J Basic Med Sci*. 2015;18(10):1034–43.
26. Todorović T, Dožić I, Vujanović D, Pejovic J, Marjanović M. The influence of chronic lead poisoning on the activity of some serum enzymes in rats. *Acta Vet Brno*. 2005;55(5–6):471–82.
27. Giknis M., Clifford C. Clinical Laboratory Parameters For Crl:WI(Han) Rats. Charles River Lab. 2008;1–14.
28. Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, et al. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem* [Internet]. 2007 Jan 1;388(11):1255–6. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/BC.2007.161/html>
29. Kojima M, Sekikawa K, Nemoto K, Degawa M. Tumor necrosis factor- α -independent downregulation of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice treated with lead nitrate. *Toxicol Sci* [Internet]. 2005 Oct [cited 2021 Mar 15];87(2):537–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16049268/>
30. Skoczyńska A, Smolik R, Jeleń M. Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Arch Toxicol*. 1993;67(3):200–4.
31. Obeng-Gyasi E, Armijos RX, Weigel MM, Filippelli GM, Sayegh MA. Cardiovascular-related outcomes in U.S. adults exposed to lead. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(4).

32. Bener A, Obineche E, Gillett M, Pasha MAH, Bishawi B. Association between blood levels of lead, blood pressure and risk of diabetes and heart disease in workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 2001;74(5):375–8.
33. Lu X, Xu X, Zhang Y, Zhang Y, Wang C, Huo X. Elevated inflammatory Lp-PLA2 and IL-6 link e-waste Pb toxicity to cardiovascular risk factors in preschool children. *Environ Pollut* [Internet]. 2018;234:601–9. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L619541303> %0A<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.094>
34. Balint GS, Iovanescu G, Stanca H, Popoiu CM, Boia E, Popovici RA, et al. The protective effect of HDL-cholesterol in patients with essential hypertension. *Rev Chim*. 2017;68(5):949–52.
35. Ademuyiwa O, Ugbaja RN, Idumebor F, Adebawo O. Plasma lipid profiles and risk of cardiovascular disease in occupational lead exposure in Abeokuta, Nigeria. *Lipids Health Dis*. 2005;4.
36. Jin Y, Liao Y, Lu C, Li G, Yu F, Zhi X, et al. Health effects in children aged 3-6 years induced by environmental lead exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2006;63(2):313–7.
37. Annabi Berrahal A, Nehdi A, Hajjaji N, Gharbi N, El-Fazâa S. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comptes Rendus - Biol*. 2007;330(8):581–8.
38. Abdel Moneim AE. *Indigofera oblongifolia* prevents lead acetate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, fibrosis and apoptosis in rats. *PLoS One*. 2016;11(7):1–18.
39. Elrasoul ASA, Mousa AA, Orabi SH, Mohamed MAEG, Gad-allah SM, Almeer R, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects of *azolla pinnata* ethanolic extract against lead-induced hepatotoxicity in rats. *Antioxidants*. 2020;9(10):1–19.
40. Satarug S, Gobe GC, Ujjiin P, Vesey DA. A Comparison of the Nephrotoxicity of Low Doses of Cadmium and Lead. *Toxics* [Internet]. 2020 Mar 2 [cited 2021 Mar 15];8(1):18. Available from: www.mdpi.com/journal/toxics
41. Gargouri M, Soussi A, Akrouti A, Magné C, El Feki A. Ameliorative effects of *spirulina platensis* against lead-induced nephrotoxicity in newborn rats: Modulation of oxidative stress and histopathological changes. *EXCLI J* [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 15];17:215–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5938537/>
42. Albarakati AJA, Baty RS, Aljoudi AM, Habotta OA, Elmahallawy EK, Kassab RB, et al. Luteolin

- protects against lead acetate-induced nephrotoxicity through antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 15];47(4):2591–603. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05346-1>
43. Satarug S, C. Gobe G, A. Vesey D, Phelps KR. Cadmium and Lead Exposure, Nephrotoxicity, and Mortality. *Toxics* [Internet]. 2020 Oct 13 [cited 2021 Mar 15];8(4):86. Available from: www.mdpi.com/journal/toxics
 44. Andjelkovic M, Djordjevic AB, Antonijevic E, Antonijevic B, Stanic M, Kotur-Stevuljevic J, et al. Toxic effect of acute cadmium and lead exposure in rat blood, liver, and kidney. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(2).
 45. Bař H, Kalender Y. Nephrotoxic effects of lead nitrate exposure in diabetic and nondiabetic rats: Involvement of oxidative stress and the protective role of sodium selenite. *Environ Toxicol* [Internet]. 2016 Oct;31(10):1229–40. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.22130>
 46. Bressler JP, Goldstein GW. Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 1991;41(4):479–84.
 47. Reddy GR, Devi BC, Chetty CS. Developmental lead neurotoxicity: Alterations in brain cholinergic system. Vol. 28, *NeuroToxicology*. 2007. p. 402–7.
 48. Antonio MT, Corredor L, Leret ML. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicol Lett*. 2003;143(3):331–40.
 49. Ferlemi AV, Avgoustatos D, Kokkosis AG, Protonotarios V, Constantinou C, Margarity M. Lead-induced effects on learning/memory and fear/anxiety are correlated with disturbances in specific cholinesterase isoform activity and redox imbalance in adult brain. *Physiol Behav* [Internet]. 2014;131:115–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.04.033>
 50. Hossain S, Bhowmick S, Jahan S, Rozario L, Sarkar M, Islam S, et al. Maternal lead exposure decreases the levels of brain development and cognition-related proteins with concomitant upsurges of oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in the offspring rats. *Neurotoxicology* [Internet]. 2016;56:150–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.07.013>
 51. Voorhees JR, Rohlman DS, Lein PJ, Pieper AA. Neurotoxicity in preclinical models of

- occupational exposure to organophosphorus compounds. *Front Neurosci.* 2017;10(JAN).
52. Bali YA, Kaikai N eddine, Ba-M'hamed S, Bennis M. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology.* 2019;415:18–25.
 53. Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Marchlewicz M, Marchetti C, Kurzawski M, Dziedziejko V, et al. Disrupted pro- and antioxidative balance as a mechanism of neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead. *Brain Res.* 2012;1435:56–71.
 54. Abdulmajeed WI, Sulieman HB, Zubayr MO, Imam A, Amin A, Biliaminu SA, et al. Honey prevents neurobehavioural deficit and oxidative stress induced by lead acetate exposure in male wistar rats- a preliminary study. *Metab Brain Dis.* 2015;31(1):37–44.
 55. Ghareeb DA, Hussien HM, Khalil AA, El-Saadani MA, Ali AN. Toxic effects of lead exposure on the brain of rats: Involvement of oxidative stress, inflammation, acetylcholinesterase, and the beneficial role of flaxseed extract. *Toxicol Environ Chem.* 2010;92(1):187–95.
 56. Javorac D, Đorđević AB, Anđelković M, Tatović S, Baralić K, Antonijević E, et al. Redox and essential metal status in the brain of Wistar rats acutely exposed to a cadmium and lead mixture. *Arch Ind Hyg Toxicol [Internet].* 2020 Sep 1;71(3):197–204. Available from: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/aiht-2020-71-3425>
 57. Chui D, Yang H, Wang H, Ji T, Yu J, Zhang S, et al. The dishomeostasis of metal ions plays an important role for the cognitive impairment. *Mol Neurodegener [Internet].* 2013 Sep 13;8(S1):P13. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71245130%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1186/1750-1326-8-S1-P13%5Cnhttp://resolver.lib.washington.edu/resserv?sid=EMBASE&issn=17501326&id=doi:10.1186/1750-1326-8-S1-P13&atitle=The+dishom>
 58. Karri V, Schuhmacher M, Kumar V. Heavy metals (Pb, Cd, As and MeHg) as risk factors for cognitive dysfunction: A general review of metal mixture mechanism in brain. *Environ Toxicol Pharmacol [Internet].* 2016;48:203–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.016>
 59. Chevion M, Jiang Y, Har-El R, Berenshtein E, Uretzky G, Kitrossky N. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *Proc Natl*

- Acad Sci [Internet]. 1993 Feb 1;90(3):1102–6. Available from:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.90.3.1102>
60. Xiao Y, Wang T, Song X, Yang D, Chu Q, Kang YJ. Copper promotion of myocardial regeneration. *Exp Biol Med*. 2020;245(10):911–21.
 61. Finney L, Vogt S, Fukai T, Glesne D. Copper and angiogenesis: Unravelling a relationship key to cancer progression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(1):88–94.
 62. Fan Y, Zhao X, Yu J, Xie J, Li C, Liu D, et al. Lead-induced oxidative damage in rats/mice: A meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol [Internet]*. 2020;58(December 2019):126443. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.126443>
 63. Chen Z, Huo X, Chen G, Luo X, Xu X. Lead (Pb) exposure and heart failure risk. *Environ Sci Pollut Res*. 2021;28833–47.
 64. Sun J, Cai X, Wang C, Du K, Chen W, Feng F, et al. Cascade Reactions by Nitric Oxide and Hydrogen Radical for Anti-Hypoxia Photodynamic Therapy Using an Activatable Photosensitizer. *J Am Chem Soc*. 2021;143(2):868–78.
 65. Ahamed M, Siddiqui MKJ. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clin Chim Acta*. 2007;383(1–2):57–64.
 66. Guidarelli A, Catalani A, Spina A, Varone E, Fumagalli S, Zito E, et al. Functional organization of the endoplasmic reticulum dictates the susceptibility of target cells to arsenite-induced mitochondrial superoxide formation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Food Chem Toxicol [Internet]*. 2021 Oct;156:112523. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691521005561>
 67. Roshan VD, Assali M, Moghaddam AH, Hosseinzadeh M, Myers J. Exercise training and antioxidants: Effects on rat heart tissue exposed to lead acetate. *Int J Toxicol*. 2011;30(2):190–6.
 68. Ahmed HA, Ali HA, Mutar TF. Protective effects of olive leaf extract against reproductive toxicity of the lead acetate in rats. *Environ Sci Pollut Res [Internet]*. 2021 Nov 3;28(44):63102–10. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11356-021-15240-3>
 69. Patočka J, Kuča K. Lead Exposure and Environmental Health. *Mil Med Sci Lett*. 2016;85(4):147–63.
 70. Reshma Anjum M, Madhu P, Pratap Reddy K, Sreenivasula Reddy P, Anjum MR, Madhu P, et al.

The protective effects of zinc in lead-induced testicular and epididymal toxicity in Wistar rats. *Toxicol Ind Health* [Internet]. 2017 Mar 9;33(3):265–76. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233716637543>

71. SAXENA DK, LAL B, MURTHY RC, CHANDRA SV. Lead induced histochemical changes in the testes of rats. *Ind Health* [Internet]. 1984;22(4):255–60. Available from: http://www.jstage.jst.go.jp/article/indhealth1963/22/4/22_4_255/_article
72. Reshma Anjum M, Madhu P, Pratap Reddy K, Sreenivasula Reddy P. The protective effects of zinc in lead-induced testicular and epididymal toxicity in Wistar rats. *Toxicol Ind Health*. 2017;33(3):265–76.
73. Ayinde OC, Ogunnowo S, Ogedegbe RA. Influence of Vitamin C and Vitamin E on testicular zinc content and testicular toxicity in lead exposed albino rats. *BMC Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2012 Dec 14;13(1):17. Available from: <https://bmcpharmacoltoxcol.biomedcentral.com/articles/10.1186/2050-6511-13-17>
74. Reddy A, Kumar P, Reddy Y, Rao T, Haritha C, Kumar B. Protective role of N-Acetyl L-Cysteine against reproductive toxicity due to interaction of lead and cadmium in male Wistar rats. *J Nat Sci Biol Med* [Internet]. 2013;4(2):414. Available from: <http://www.jnsbm.org/text.asp?2013/4/2/414/117021>
75. Tvrdá E, Lukáč N, Schneidgenová M, Lukáčová J, Szabó C, Goc Z, et al. Impact of Seminal Chemical Elements on the Oxidative Balance in Bovine Seminal Plasma and Spermatozoa. *J Vet Med* [Internet]. 2013 Sep 9;2013:1–8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jvm/2013/125096/>
76. Yousif A, Ahmed A. Effects of cadmium (Cd) and lead (Pb) on the structure and function of thyroid gland. *African J Environ Sci Technol*. 2009;3(3):78–85.
77. ATSDR. Toxicological profile for Lead. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2020.
78. Ibrahim NM, Eweis EA, El-Beltagi HS, Abdel-Mobdy YE. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2012;2(1):41–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60187-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60187-1)
79. Hidiroglou M. Zinc, Copper and Manganese Deficiencies and the Ruminant Skeleton: a Review. *Can J Anim Sci* [Internet]. 1980 Sep 1;60(3):579–90. Available from:

<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.4141/cjas80-068>

80. Zhou F, Chen Y, Fan G, Feng C, Du G, Zhu G, et al. Lead-induced iron overload and attenuated effects of ferroportin 1 overexpression in PC12 cells. *Toxicol Vitro* [Internet]. 2014;28(8):1339–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.07.005>
81. CDC. What do Parents Need To Know to Protect Their Children? Retrieved from http://www.cdc.gov/nceh/lead/ACCLPP/blood_lead_levels.htm. 2017;
82. Rocha A, Trujillo KA. Neurotoxicity of low-level lead exposure: History, mechanisms of action, and behavioral effects in humans and preclinical models. *Neurotoxicology* [Internet]. 2019 Jul;73(March):58–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.02.021>
83. EFSA CONTAM Panel. Scientific opinion on lead in food. *EFSA J* [Internet]. 2010 Apr;8(4):1570 (1-146). Available from: [doi:10.2903/j.efsa.2010.1570](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1570)
84. Antonijevic E, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Andjelkovic M, Djordjevic AB, et al. Comparison of oximes K203 and K027 based on Benchmark dose analysis of rat diaphragmal acetylcholinesterase reactivation. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2019;308:385–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.034>
85. Antonijevic E, Musilek K, Kuca K, Djukic-Cosic D, Curcic M, Miladinovic DC, et al. Dose-response modeling of reactivating potency of oximes K027 and K203 against a direct acetylcholinesterase inhibitor in rat erythrocytes. *Food Chem Toxicol*. 2018;121:224–30.
86. Haber LT, Dourson ML, Allen BC, Hertzberg RC, Parker A, Vincent MJ, et al. Benchmark dose (BMD) modeling: current practice, issues, and challenges. *Crit Rev Toxicol* [Internet]. 2018;48(5):387–415. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1430121>
87. Slob W. Benchmark dose and the three Rs. Part II. Consequences for study design and animal use. *Crit Rev Toxicol* [Internet]. 2014 Aug 7;44(7):568–80. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408444.2014.925424>
88. Barlow S, Chesson A, Collins J, Flynn A, Hardy A, Klaus-Dieter J, et al. Use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA J*. 2009;1150:1–72.

Н. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Радови објављени у научним часописима међународног значаја (M20)

1 . Javorac D, Antonijeвић B, Anđelković M, Repić A, Bulat P, Djordjevic AB, Baralić K, Đukić-Ćosić D, Antoniћ T, Bulat Z. Oxidative stress, metallomics and blood toxicity after subacute low-level lead exposure in Wistar rats: Benchmark dose analyses. Environmental Pollution. 2021 Dec 15;291:118103.

Назив часописа: Environmental Pollution

Фактор утицаја (2020): 8,071

Категорија: M21a

Ранг часописа: Environmental Sciences (23/274)

2. Javorac D, Tatović S, Anđelković M, Repić A, Baralić K, Djordjevic AB, Mihajlović M, Stevuljević JK, Đukić-Ćosić D, Ćurčić M, Antonijeвић B, Bulat Z. Low-lead doses induce oxidative damage in cardiac tissue: Subacute toxicity study in Wistar rats and Benchmark dose modelling. Food and Chemical Toxicology. 2022 Mar 1;161:112825.

Назив часописа: Food and Chemical Toxicology

Фактор утицаја (2020): 6,025

Категорија: M21a

Ранг часописа: Toxicology (9/93)

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

Назив часописа: Chemico-Biological Interactions

Фактор утицаја (2020): 5,194

Категорија: M21

Ранг часописа: Toxicology (15/93)

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34)

1. Javorac D, Jevtić N, Antonijević E, Djordjević AB, Anđelković M, Baralić K, Ćurčić M, Đukić-Ćosić D, Antonijević B, Bulat Z. Brain acetylcholinesterase activity in Wistar rats subcutely exposed to low doses of Pb. Toxicology Letters. September, 2021 1;350: S175

I. ЗАКЉУЧАК СА ОБРАЗЛОЖЕЊЕМ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата магистра фармације Драгане Јаворац је урађена према одобреној пријави теме докторске дисертације. Извршена је провера оригиналности докторске дисертације, а добијена вредност за индекс подударности сматра се прихватљивом. Детаљном анализом приложене докторске дисертације Комисија је констатовала да је дисертација приказана на јасан и прегледан начин и да су сви постављени циљеви реализовани. Експеримент на анималном моделу је спроведен у сагласности са етичким и научним принципима. На крају докторске дисертације приказани су закључци изведени на основу добијених резултата и доступних литературних података. Подаци представљени у дисертацији дају оригинални допринос бољем сагледавању и разумевању токсичних ефеката ниских доза Рb. Свему наведеном иде у прилог и чињеница да су резултати ове докторске дисертације до сада публиковани у оквиру три рада у међународним часописима, категорије М21а и М21.

J. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу свега изложеног, може се закључити да је кандидат испунио постављене циљеве у докторској дисертацији под називом „Токсични ефекти ниских доза олова на моделу субакутне изложености пацова“ те предлажемо Наставно-научном већу Фармацеутског факултета да прихвати Извештај и упути га Већу научних области медицинских наука, ради добијања сагласности за јавну одбрану.

Чланови комисије

Др сц. Биљана Антонијевић, редовни професор, председник
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Петар Булат, редовни професор
Универзитет у Београду, Медицински факултет

Др сц. Александра Буха Ђорђевић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

У Београду,
01. 07. 2022. године