



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Biljana Davidović-Plavšić  
Biljana Kukavica

# ABIOTIČKI STRES I REDOKS HOMEOSTAZA ĆELIJE

Banja Luka, 2023.

**Autori:**

Dr Biljana Davidović-Plavšić, vanredni profesor,  
Prirodno-matematički fakultet,  
Univerzitet u Banjoj Luci

Dr Biljana Kukavica, redovni profesor,  
Prirodno-matematički fakultet,  
Univerzitet u Banjoj Luci

**Recenzenti:**

Dr Aleksandra Nikolić-Kokić, naučni savetnik,  
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",  
Univerzitet u Beogradu

Dr Adisa Parić, redovni profesor,  
Prirodno-matematički fakultet,  
Univerzitet u Sarajevu

Dr Mirjana Žabić, redovni profesor,  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

**Lektor:** Gabrijela Ćurguz

**Izdavač:**

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

**Za Izdavača:**

Dr Goran Trbić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet,  
Univerzitet u Banjoj Luci

**Glavni i odgovorni urednik:**

Dr Duško Jojić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet,  
Univerzitet u Banjoj Luci

**Grafička priprema:** Divna Džombić

**Dizajn korica:** Autori (Created with BioRender.com)

**Štampa:** Vilux d.o.o. - Banja Luka

**Tiraž:** 50

Odlukom Broj: 19/3. 59/23 Naučno-nastavno Vijeća Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci je dalo saglasnost da bude suizdavač monografije "Abiotički stres i redoks homeostaza ćelije" autora prof. dr Biljane Davidović-Plavšić, vanrednog profesora i prof. dr Biljane Kukavice, redovnog profesora.

## PREDGOVOR

Monografija "ABIOTIČKI STRES I REDOKS HOMEOSTAZA ĆELIJE" je nastala kao rezultat dugogodišnjeg rada autora na ispitivanja uticaja abiotičkog stresa na humane/animalne i biljne ćelije. U monografiji je dat naglasak na procese koji dovode do nastanaka oksidativnog stresa kao posljedice izloženosti ćelija različitim vrstama abiotičkog stresa, i važnost održavanja redoks homeostaze. Toksikologiji je posvećena posebna pažnja, sa akcentom na toksičnost pesticida i teških metala i njihovu povezanost sa stvaranjem slobodnih radikalskih vrsta, kao i načinom njihovog uklanjanja.

Monografija sadrži četiri poglavlja: Reaktivne vrste kiseonika i antioksidativni metabolizam, Uticaj toksičnih supstanci na animalne (humane) i biljne ćelije, Uticaj pesticida na ćelije i organizme, Uticaj metala na ćelije i organizme. U prvom poglavlju čitaoci su upoznati sa reaktivnim vrstama kiseonika, mjestima njihovog nastanka, njihovom uticaju na ćelije, kao i komponentama antioksidativnog metabolizma. Drugo poglavlje bavi se definisanjem toksičnog uticaja ksenobiotika na ćelije. U trećem i četvrtom poglavlju dat je osvrt na uticaj pesticida i teških metala na žive organizme kao i njihov odgovor. Rukopis je namijenjen kolegama koji se bave različitim oblastima istraživanja: biohemije, biologije, hemije i srodnih nauka, studentima i svim zaljubljenicima u prirodne nauke.

Autori se posebno zahvaljuju recezentima: dr Aleksandri Nikolić-Kokić, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, dr Adisi Parić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu i dr Mirjani Žabić, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakultetu u Banjoj Luci, na pažljivom čitanju i izuzetno korisnim sugestijama koje su značajno doprinijele kvalitetu ove monografije.

U Banjoj Luci, 2023. god.

Autori

*Biljana Davidović-Plavčić*  
*Biljana Kubarica*



## SADRŽAJ

<b>1. Reaktivne vrste kiseonika i antioksidativni metabolizam.....</b>	<b>13</b>
1.1 Slobodni radikali .....	13
1.2 Reaktivne vrste kiseonika.....	19
1.3 Antioksidativni sistem odbrane.....	25
1.3.1 Enzimski antioksidanti .....	25
1.3.1.1 Superoksid dismutaze.....	25
1.3.1.2 Katalaza.....	27
1.3.1.3 Peroksidaze klase III .....	27
1.3.1.4 Askorbat peroksidaza .....	28
1.3.1.5 Glutation peroksidaze.....	30
1.3.1.6 Glutation reduktaza .....	31
1.3.1.7 Glutation-S-transferaza .....	32
1.3.1.8 Peroksiredoksini.....	32
1.3.1.9 Tioredoksini.....	33
1.3.2 Neenzimski antioksidanti.....	35
1.3.2.1 Fenolna jedinjenja .....	35
1.3.2.2 Askorbat .....	36
1.3.2.3 Glutation.....	39
1.4 Proizvodnja i uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika u animalnoj ćeliji .....	42
1.4.1 Funkcije i mehanizam djelovanja reaktivnih vrsta kiseonika na fiziološkom i patološkom nivou .....	42
1.4.2 Formiranje singletnog kiseonika posredovano leukocitima .....	48
1.4.3 Proizvodnja reaktivnih vrsta kiseonika u mitohondrijama.....	49
1.4.3.1 Druga mitohondrijska mjesta proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika .....	51
1.4.4 Citoplazma.....	52
1.4.5 Endoplazmatični retikulum .....	53
1.4.6 Peroksizomi .....	53
1.4.7 Lizozomi.....	54
1.4.8 Membranski vezana NADPH oksidaza.....	55
1.4.9 Mikrozomalni citohrom P450 (Cyt P450) enzim .....	55
1.5 Proizvodnja i uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika u različitim organelama biljne ćelije.....	56

1.5.1 Hloroplasti.....	57
1.5.2 Mitohondrije .....	57
1.5.3 Peroksizomi .....	58
1.5.4 Apoplast.....	59
<b>2. Uticaj toksičnih supstanci na animalne (humane) i biljne ćelije....</b>	<b>63</b>
2.1 Definicija toksikologije .....	63
2.2 Oblasti toksikologije .....	63
2.3 Toksične supstance.....	65
2.4 Definicija toksičnosti .....	68
2.5 Efekti toksičnih supstanci .....	69
2.6 Interakcije toksičnih supstanci .....	71
2.7 Tolerancija organizma na efekte toksičnih supstanci.....	72
2.8 Karakteristike ekspozicije .....	73
2.9 Putevi i mjesta izloženosti toksičnim supstancama.....	73
2.10 Trajanje i učestalost izlaganja .....	74
2.11 Odnos doza-odgovor .....	75
<b>3. Uticaj pesticida na ćelije i organizme .....</b>	<b>81</b>
3.1 Podjela pesticida .....	82
3.2 Rasprostranjenost upotrebe pesticida .....	84
3.3 Štetna djelovanja pesticida na ljude .....	85
3.4 Herbicidi .....	88
3.5 Terbutilazin.....	89
3.5.1 Fizičko - hemijske osobine terbutilazina.....	90
3.5.2 Primjena terbutilazina.....	92
3.5.3 Toksično djelovanje terbutilazina .....	92
3.6 Sulfoniluree .....	94
3.7 Nikosulfuron.....	94
3.7.1 Toksičnost nikosulfurona .....	97
3.7.2 Detoksikacija pesticida u biljnim ćelijama.....	98
3.8 Modeli ispitivanja toksičnosti pesticida na neciljnim vrstama .....	102
3.9 Eritrociti kao model sistem za <i>in vitro</i> ispitivanja toksičnosti pesticida...102	
3.10 Uticaj herbicida na oksidativne i antioksidativne parametre metabolizma eritrocita .....	104

3.11 Zaštitni efekat sekundarnih metabolita biljaka od toksičnih efekata pesticida .....	113
3.12 Uticaj nikosulfurona na kukuruz.....	118
<b>4. Uticaj metala na ćelije i organizme .....</b>	<b>123</b>
4.1 Atomski i jonski radijusi .....	123
4.2 Osobine teških metala i njihova uloga u živim organizmima.....	126
4.2.1 Izvori teških metala u životnoj sredini .....	128
4.2.2 Biorasploživost i toksičnost teških metala.....	128
4.3 Esencijalni teški metali.....	133
4.3.1 Bakar (Cu) .....	133
4.3.1.1 Izvori Cu .....	133
4.3.1.2 Uloga Cu u živim organizmima .....	134
4.3.1.3 Toksičnost Cu.....	135
4.3.2 Gvožđe (Fe).....	137
4.3.2.1 Izvori Fe .....	137
4.3.2.2 Uloga Fe.....	137
4.3.2.3 Toksičnost Fe.....	141
4.3.2.3.1 Mehanizam toksičnosti Fe.....	141
4.3.3 Cink (Zn).....	144
4.3.3.1 Izvor Zn .....	144
4.3.3.2 Uloga Zn .....	144
4.3.4 Mangan Mn .....	147
4.3.4.1 Izvori Mn.....	147
4.3.4.2 Uloga Mn .....	147
4.4 Toksični teški metali.....	151
4.4.1 Kadmijum (Cd) .....	151
4.4.1.1 Izvori Cd .....	151
4.4.1.2 Potencijalna izloženost ljudi kadmijumu .....	153
4.4.1.3 Uloga Cd.....	155
4.4.1.4 Molekularni mehanizmi toksičnosti i Cd .....	155
4.4.2 Olovo (Pb).....	159
4.4.2.1 Izvori Pb .....	159
4.4.2.2 Distribucija Pb u životnoj sredini .....	161

4.4.2.3 Izloženost ljudi Pb .....	162
4.4.2.4 Molekularni mehanizmi toksičnosti Pb .....	163
4.5 Mehanizmi akutne toksičnosti - neurotoksičnost.....	170
4.5.1 Acetilholin esteraza.....	170
4.6 Uticaj teških metala na animalnu ćeliju.....	171
4.7 Biljke i teški metali .....	176
4.7.1 Izvori i pokretljivost teških metala u zemljištu .....	176
4.7.2 Uticaj teških metala na biljke .....	177
4.7.3 Mehanizmi zaštite biljaka.....	181
4.8 Oksidativni stres i antioksidativna odbrana kod biljaka izloženih teškim metalima .....	184
4.8.1 Odnos biljaka prema teškim metalima.....	189
4.8.1.1 Hiperakumulatori .....	189
4.8.2 Redoks signalizacija u uslovima izloženosti teškim metalima.....	191
<b>Literatura.....</b>	<b>193</b>



## SKRAĆENICE

**ABTS** - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)

**ACh** - acetilholin

**AChE** - acetilholin esteraza

**ADP** - adenzin difosfat

**Agent Orange** - smjesa 2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4-D), 2,4,5-trihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4,5-T), pihloram i kakodilna kiselina

**ALAD** - dehidrogenaza delta levulinske kiseline

**ALT** - alaninaminotransferaza

**AO** - askorbatoksidaza

**AOS** - antioksidativni sistem zaštite

**APX** - askorbat peroksidaza

**AsA** - askorbat

**AST** - aspartat aminotransferaza

**ATP** - adenzin trifosfat

**ATSDR** - Agencija za toksične supstance i registar bolesti (engl. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*)

**BAL** - 2,3-dimercaptopropanol (engl. *British anti-Lewisite*)

**cAPX** - askorbat peroksidaza u citoplazmi

**CAT** - katalaza

**CBLI** - kumulativni krvni Pb indeks (engl. *Cumulative Blood Pb Index*)

**CDC** - Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*)

**CH<sub>3</sub> - Hg<sup>+</sup>** - metil živa

**chlAPX** - askorbat peroksidaza u hloroplastima

**CLK** - ciklus limunske kiseline

**CNS** - centralni nervni sistem

**CO<sub>2</sub>** - ugljen-dioksid

**CP** - ceruloplazmin

**Cu/Zn - SOD, SOD<sub>1</sub>** - bakar-cink SOD

**Cys** - cistein

**CySS** - cistin

**DDT** - dihloro-difenil-trihloretan

**DHA** - dehidroaskorbat  
**DNK** - dezoksiribonukleinska kiselina  
**DPPH** - 2,2 - difenil - 1 - pikrilhidrazilhidrat  
**EDC** - endokrini remetelji (disruptori) (engl. *Endocrine Disruptor Compounds*)  
**EPR spektroskopija** - spektroskopija elektronske paramagnetne rezonancije  
**ER** - endoplazmatični retikulum  
**FAD** - flavin adenin dinukleotid, oksidovani oblik  
**FADH<sub>2</sub>** - flavin adenin dinukleotid, redukovani oblik  
**FAO** - Organizacija za hranu i poljoprivredu (engl. *The Food and Agriculture Organization*)  
**FBA** - fruktozobifosfat aldolaza  
**FeSOD** - gvožđe SOD  
**FH** - fitohelatini  
**FMN** - flavin mononukleotid  
**FSH** - folikulostimulirajući hormon  
**G6PDH** - glukoza-6-fosfat dehidrogenaza  
**G6PDH** - glukoza-6-fosfat dehidrogenaza  
**GH** - hormon rasta (engl. *Growth Hormone*)  
**GHRH** - hormon rasta-oslobađajući hormon (engl. *Growth Hormone-Releasing Hormone*)  
**GnRH** - gonadotropin-oslobađajući hormon (engl. *Gonadotropin-Releasing Hormone*)  
**GPx** - glutation peroksidaza  
**GR** - glutation reduktaza  
**Grx** - glutaredoksin  
**GRX** - glutaredoksin  
**GSH** - glutation, redukovani oblik  
**GSSG** - glutation, oksidovani oblik  
**GST** - glutation - S - transferaza  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - vodonik peroksid  
**Hb** - hemoglobin  
**HD** - Hodgkinova bolest

**HDL** - lipoproteini visoke gustine (engl. *High-Density Lipoproteins*)  
**HF** - heksokinaza  
**HIF** - faktor koji izaziva hipoksiju (engl. *Hypoxia-Inducible Factor*)  
**IARC** - Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*)  
**KE** - kombinovani efekat  
**LD<sub>50</sub>** - letalna doza 50% (engl. *lethal dose, 50%*)  
**LDH** - laktat dehidrogenaza  
**LH** - luteinizirajući hormon  
**LK** - limunska kiselina  
**MAPK** ili **MAP kinaza** - mitogenom aktivirana protein kinaza  
**MDA** - malondialdehid  
**MDHA** - monodehidroaskorbat  
**MDHAR** - monodehidroaskorbat reduktaza  
**Mets** - metabolički sindrom  
**mitAPX** - askorbat peroksidaza u mitohondrijama  
**MnSOD, SOD2** - mangan SOD  
**MPO** - mijeloperoksidaza  
**MT** - metalotioneini  
**NADH** - nikotinamid adenin dinukleotid  
**NADP<sup>+</sup>** - nikotinamid adenin dinukleotidfosfat, oksidovani oblik  
**NADPH + H<sup>+</sup>** - nikotinamid adenin dinukleotidfosfat, redukovani oblik  
**NHANES** - Nacionalno istraživanje zdravlja i ishrane (engl. *National Health and Nutrition Examination Survey*)  
**NHL** - ne-Hodgkinova bolest  
**NiSOD** - nikel SOD  
**P** - piruvat  
**PAO** - poliamino oksidaza  
**pAPX** - askorbat peroksidaza u peroksizomima  
**PbB** - nivo Pb u krvi (engl. *Blood Pb level*)  
**PDI** - protein disulfid izomeraza  
**PFK** - fosfofruktokinaza  
**PhOH** - fenolna jedinjenja

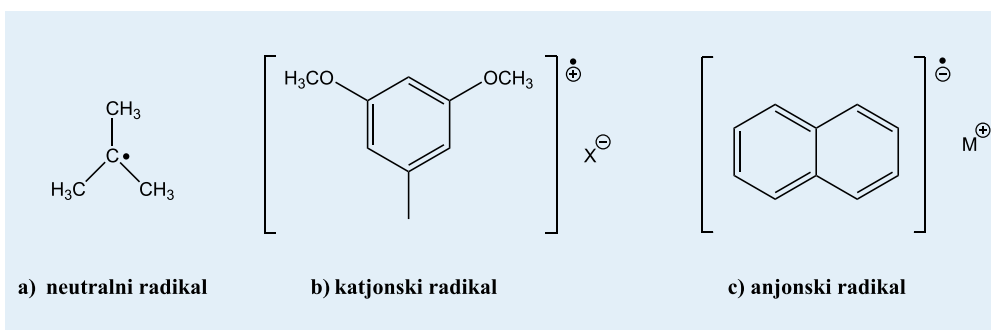
**PI3K** - fosfoinozimid 3-kinaza  
**PK** - piruvat kinaza  
**PK** - piruvat kinaza  
**POX** - peroksidaze klase III  
**Prx** - peroksiredoksin  
**PSI** - fotosistem I  
**PSII** - fotosistem II  
**PTK** - protein-tirozin kinaza  
**PTP** - proteinske tirozin fosfataze  
**ROH** - alkohol  
**ROS** - reaktivne vrste kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*)  
**SDH** - sukcinat dehidrogenaza  
**SDH** - sukcinat dehidrogenaza  
**SOD** - superoksid dismutaza  
**TGR** - (engl. *Thioredoxin Glutathione Reductase*)  
**TM** - teški metali  
**TMX** - (engl. *Transmembrane thioredoxin -related protein*)  
**TRH** - tireotropni oslobađajući hormon (engl. *Thyrotropin-Releasing Hormone*)  
**Trx** - tioredoksin  
**Trx ox** - oksidovani oblik Trx  
Trx red - redukovani oblik Trx  
**TSH** - tireostimulišući hormon  
**US EPA** - Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Environmental Protection Agency*)  
**WHO** - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

# 1. REAKTIVNE VRSTE KISEONIKA I ANTIOKSIDATIVNI METABOLIZAM

## 1.1 Slobodni radikali

Važnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji u živim sistemima imaju slobodni radikali pri niskim koncentracijama, dok su pri visokim koncentracijama toksični.

Slobodni radikali su hemijske vrste (molekuli, atomi, joni) koje mogu nezavisno da postoje, a sadrže jedan ili više nesparenih elektrona (Halliwell i Gutteridge, 2006). Nespareni elektroni zauzimaju atomsku ili molekulsku orbitalu što za posljedicu ima to da su radikali hemijski nestabilni. Zbog težnje za sparivanjem elektrona i postizanjem stabilnog stanja, radikali brzo reaguju sa drugim molekulama. Nakon reakcije slobodnih radikala sa molekulama koje im predaju elektrone, molekule postaju i same slobodni radikali i na taj način dolazi do pokretanja lančane reakcije. Slobodni radikali mogu da imaju pozitivno ili negativno naelektrisanje ili mogu biti nenaelektrisani (Slika 1).

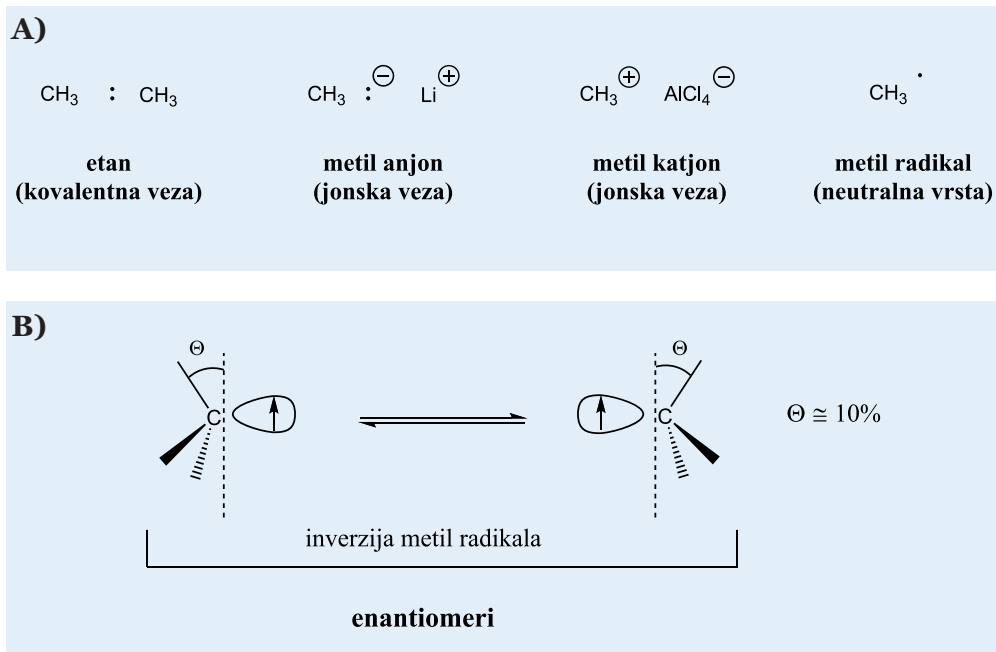


Slika 1. Tipovi slobodnih radikala prema naelektrisanju:  
a) neutralni radikal, b) katjonski radikal i c) anjonski radikal.

*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

Na slici 2A predstavljeni su etan, metil anjon, metil katjon i metil radikal. Etan je izgrađen iz dvije metil grupe povezane kovalentnom vezom i veoma je stabilno jedinjenje. Metil anjon i katjon grade jonske

veze između ugljenika i suprotno naelektrisanog jona i zbog toga nisu nestabilni. Nasuprot njima, metil radikal je jako nestabilan i reaktivan, jer nema popunjen oktet na ugljenikovom atomu. Ugljenikov atom u metil katjonu ima  $sp^2$  hibridizaciju sa strukturom koja je triangularna ( $120^\circ$ ) i planarna. Ugljenikov atom u metil anjonu je  $sp^3$  hibridizovan sa strukturom koja je tetraedarska ( $109,5^\circ$ ). Sa druge strane, ugljenikov atom u metil radikalima ima strukturu između katjona i anjona, i dolazi do brze piramidalne inverzije, čak i na niskoj temperaturi (Slika 2B). Može se reći da su radikali jedinstvene i rijetke hemijske vrste i da su prisutne samo pri posebnim uslovima.



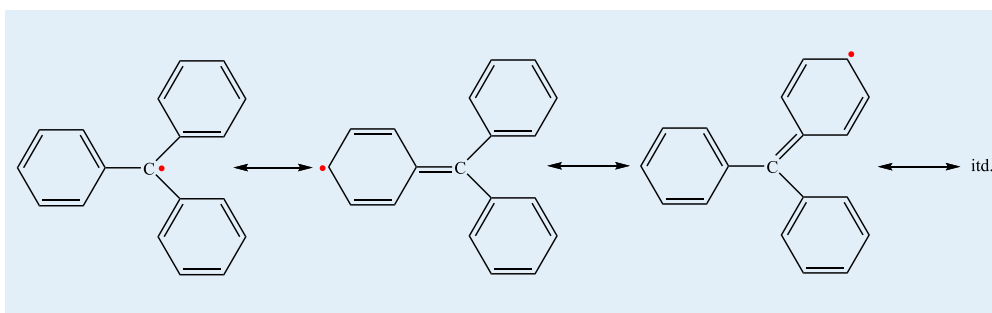
Slika 2. A) Etan, metil anjon, metil katjon i metil radikal;  
B) Inverzija metil radikala.

*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

Stabilnost molekula slobodnih radikala zavisi od sposobnosti ostalog dijela molekula da stabilizuje nesporeni elektron. Stabilizaciji najviše doprinose delokalizacija elektrona i sterni efekti. Stabilnost slobodnih radikala povećava se rezonancijom (dugoživeći, postojani

radikali). Ako izostaju stabilizirajući faktori slobodni radikali su kratkoživeći (nepostojani), zbog čega lako stupaju u monomolekulske i bimolekulske reakcije.

Trifenilmetil radikal je prvi otkriveni organski radikal i najbolje proučen stabilni slobodni radikal. Stabilnost trifenilmetil radikala proizilazi iz njegove strukture, tj. prisustva tri benzenova prstena u molekulu. Benzenovi prstenovi štite C-radikal (delokalizacijom i rezonancionom stabilizacijom) i usporavaju njegove dalje reakcije (Slika 3).



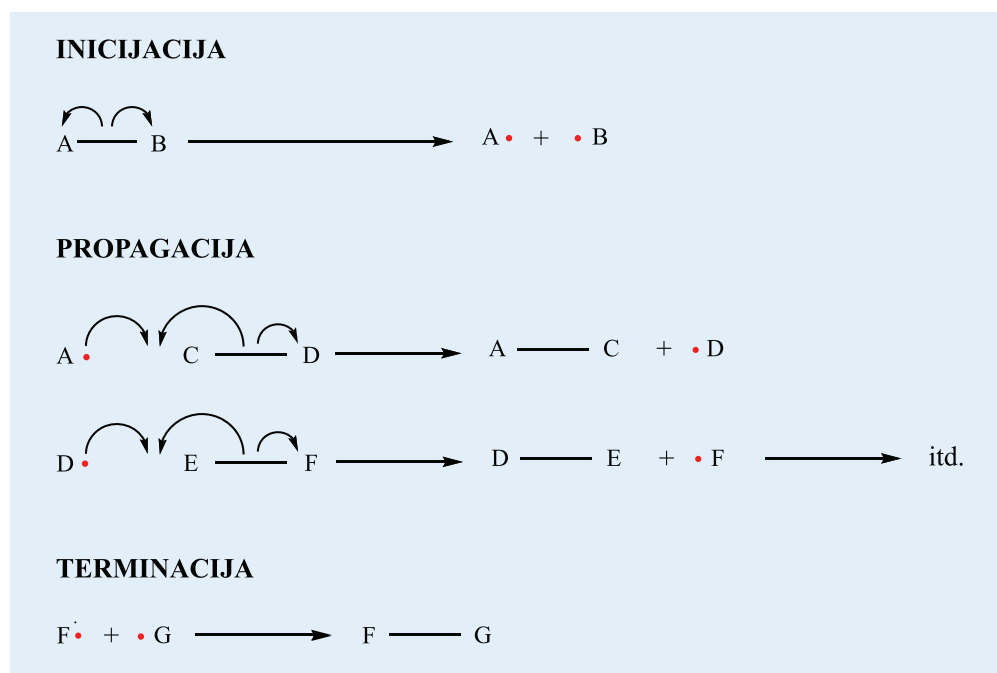
Slika 3. Rezonanciona stabilizacija trifenilmetil radikala.

*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

Slobodni radikali mogu nastati na različitim atomima: kiseoniku, ugljeniku, azotu, sumporu, vodoniku, alkalnim metalima, halogenim elementima, jonima prelaznih metala:

- O-atomu (superoksid anjon radikal, hidroksil radikal, peroksil radikal, hidroperoksil radikal);
- $sp^3$  i  $sp^2$  hibridizovanim C-atomima (alkil radikal, vinil radikal, alil radikal, fenil radikal);
- N-atomu (amino radikal, amido radikal, nitroksil radikal);
- S-atomu (tiol radikali);
- drugim elementima (vodonik, alkalni metali, halogeni) ili jonima prelaznih metala ( $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ).

Slobodni radikali nastaju homolitičkim raskidanjem kovalentnih veza u organskim molekulama, prenosom ili oduzimanjem jednog elektrona molekulu (jonu), oksido-redukcionim procesima (elektrohemijske, fotohemijske i hemijske reakcije) ili dejstvom zračenja visoke energije na molekul. Nastajanje slobodnih radikala je indukovano fotolizom, termolizom, radiolizom, radikalskim međuproizvodima i radikalskim inicijatorima (Halliwell i Gutteridge, 1999). Slobodnoradikalske reakcije započinju hemijski reaktivni inicijatori, koji mogu biti slobodni radikali, joni prelaznih metala, itd., (Slika 4). Prva faza nastajanja slobodnoradikalskih vrsta naziva se *faza inicijacije*. U ovoj fazi nastaje nova slobodnoradikalska vrsta (A· i B·, Slika 4) koja nastavlja lančanu reakciju u *fazi propagacije* (reakcija radikala A sa neradikalnom molekulom C-D). Radikali nastali u fazi propagacije međusobno reaguju pa u *fazi terminacije* nastaju nereaktivni neradikalni proizvodi (F-G). Ova faza označava da je reakcija završena (Slika 4).

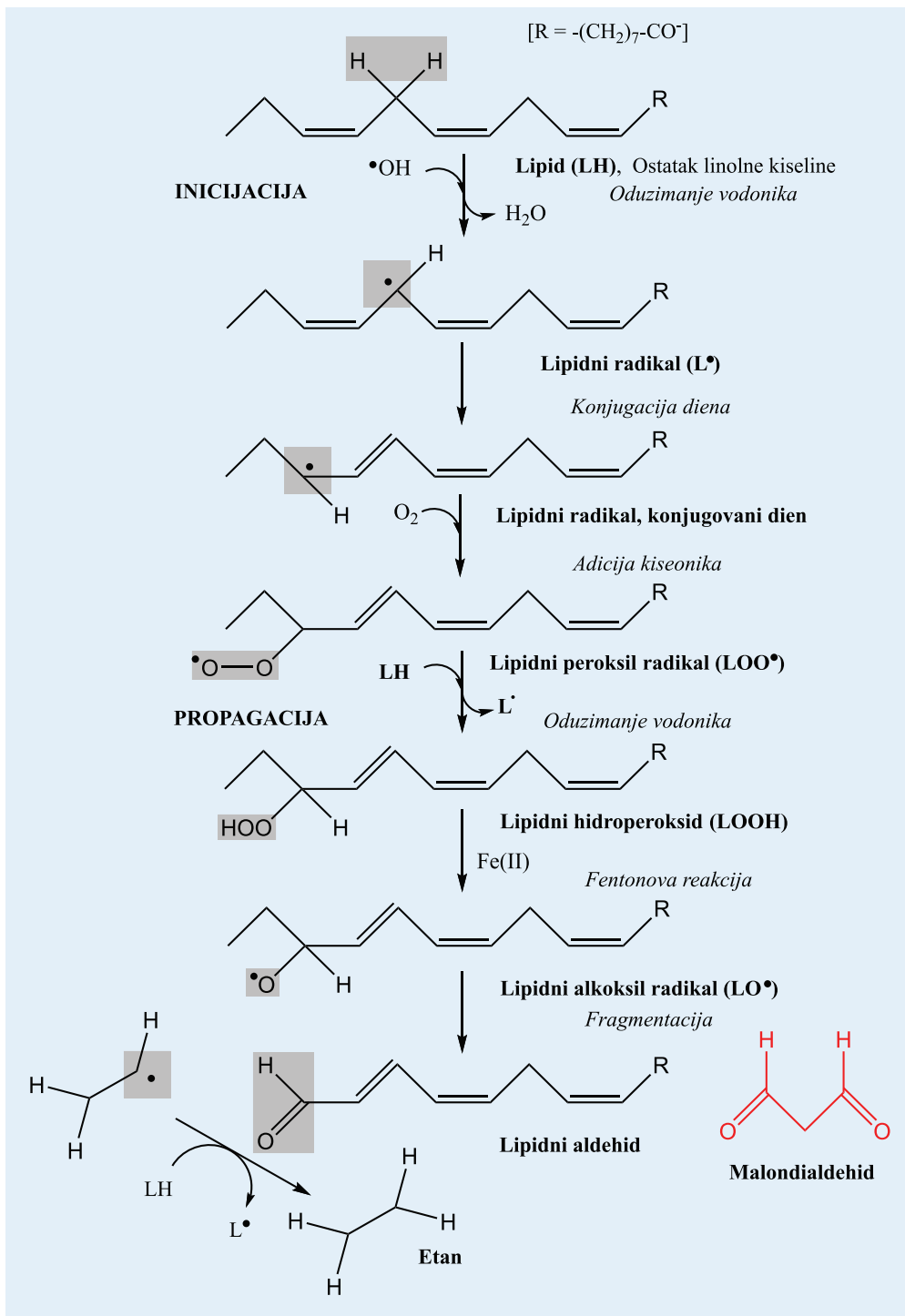


Slika 4. Radikalska lančana reakcija.  
 Kreirano u ChemDraw Professional 15.



Lipidna peroksidacija je jedan od najvažnijih primjera slobodnoradikalskih lančanih reakcija u živim sistemima (Slika 5). Slobodni radikali, trihaloacetatni radikal ( $\text{Cl}_3\text{COO}^\bullet$ ) i hidroksilni radikal ( $\text{HO}^\bullet$ ), reaguju sa polinezasićenim masnim kiselinama i iniciraju peroksidativnu razgradnju lipida (lipidnu peroksidaciju) oduzimanjem vodonika iz nezasićenih masnih kiselina (Recknagel i sar., 1989). Formirani lipidni radikal ( $\text{L}^\bullet$ ) konvertuje se kroz nekoliko koraka u lipidni peroksil radikal ( $\text{LOO}^\bullet$ ) adicijom kiseonika; lipidni hidroperoksid ( $\text{LOOH}$ ) vezivanjem vodonika i lipidni alkoksil radikal ( $\text{LO}^\bullet$ ) u Fentonovoj reakciji katalizovanoj sa  $\text{Fe (II)}$ . Naknadnom fragmentacijom nastaju ugljovodonici, kao što je etan, i reaktivni aldehidi, kao što je malondialdehid (MDA) (Slika 5). Dakle, lipidna peroksidacija ne samo da narušava strukturu lipida u ćelijskim membranama već stvara i endogena toksična jedinjenja i slobodne radikale (npr.  $\text{LOO}^\bullet$ ,  $\text{LO}^\bullet$ ) i elektrofile (npr. 4-oksonon-2-enal, 4-hidroksinon-2-enal). Proizvodi lipidne peroksidacije mogu lako da reaguju sa susjednim molekulama, kao što su membranski proteini ili da difunduju ka udaljenijim molekulama kao što je DNK i izazovu njihove strukturne promjene. Stabilni proizvodi peroksidacije arahidonske kiseline su F2-izoprostani koji su, pored toga što su markeri lipidne peroksidacije, moćni vazokonstriktori pluća i bubrega (Basu, 2004).

Slobodni radikali prirodno nastaju u organizmu čovjeka u metaboličkim procesima. Neki od slobodnih radikala u organizmu obavljaju korisne funkcije, ali je većina potencijalno veoma štetna, jer hemijskim reagovanjem mogu da oštete vitalne gradivne ćelijske komponente, čime se prouzrokuje trajno oštećenje, gubitak funkcije pa i smrt ćelije. Sam organizam je sposoban da, do određenog stepena, vrši neutralizaciju slobodnih radikala, a kapacitet neutralizacije zavisi od mnogih faktora, posebno od starosti (uzrasta), opšteg zdravstvenog stanja i kvaliteta ishrane.



Slika 5. Lipidna peroksidacija inicirana hidroksil radikalom ( $\bullet\text{OH}$ ).

Kreirano u ChemDraw Professional 15.

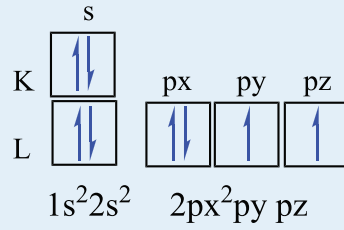
Pored endogenih uzročnika nastanka slobodnih radikala u organizmu, savremeno doba donijelo je i mnogobrojne egzogene uzročnike iz životne sredine ili određenog načina života kao što su: aerozagađenje, zagađenje zemljišta koje se prenosi na hranu i vodu, pesticidi, duvanski dim, različite vrste zračenja, psihički stres, nepravilan režim ishrane, nedovoljna fizička aktivnost, intenzivan mišićni rad i naporno vježbanje, pa čak i neki oblici terapije i neki lijekovi. Ovi faktori iz životne sredine drastično povećavaju proizvodnju slobodnih radikala i iscrpljuju prirodni odbrambeni kapacitet organizma.

Slobodni radikali se smatraju mogućim uzročnicima preranog starenja organizma, nastanka mnogih degenerativnih promjena, akutnih i hroničnih zapaljenskih procesa, neuroloških i kardiovaskularnih poremećaja. U novije vrijeme, posebna pažnja se posvećuje ispitivanjima potencijalne povezanosti djelovanja slobodnih radikala sa reumatoidnim artritismom, vaskulitismom, Alchajmerovom bolešću, Parkinsonovom bolešću, cerebrovaskularnim oštećenjima, mišićnom distrofijom, hipertenzijom i hipertenzivnim bolestima srca, aterosklerozom, fibrozom pluća, kataraktom, malignim bolestima. S druge strane, slobodni radikali imaju i korisnu funkciju u organizmu, jer pri nižim koncentracijama djeluju kao signalni molekuli (Cadenas, 2004; Valko i sar., 2007; Phaniendra i sar., 2015). Slobodni radikali takođe, uništavaju viruse i bakterije i učestvuju u stimulaciji ćelija imunog sistema. Postoje mnoge vrste slobodnih radikala u živim organizmima, od kojih su najvažniji radikali kiseonika i azota.

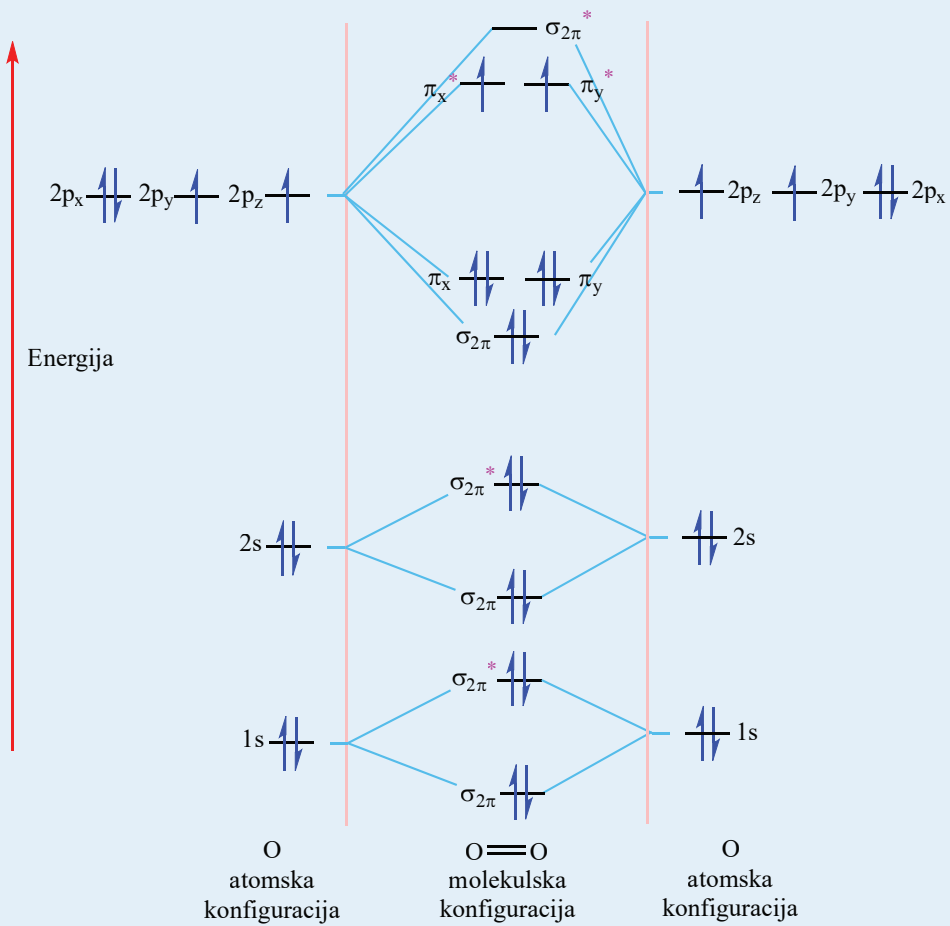
## **1.2 Reaktivne vrste kiseonika**

Kiseonik u osnovnom, tripletnom stanju, ima dva nesparena elektrona paralelnih spinova (bi-radikal, paramagnetik). U periodnom sistemu elemenata kiseonik je na osmom mjestu sa elektronskom konfiguracijom predstavljenom na Slici 6A.

A)



B)

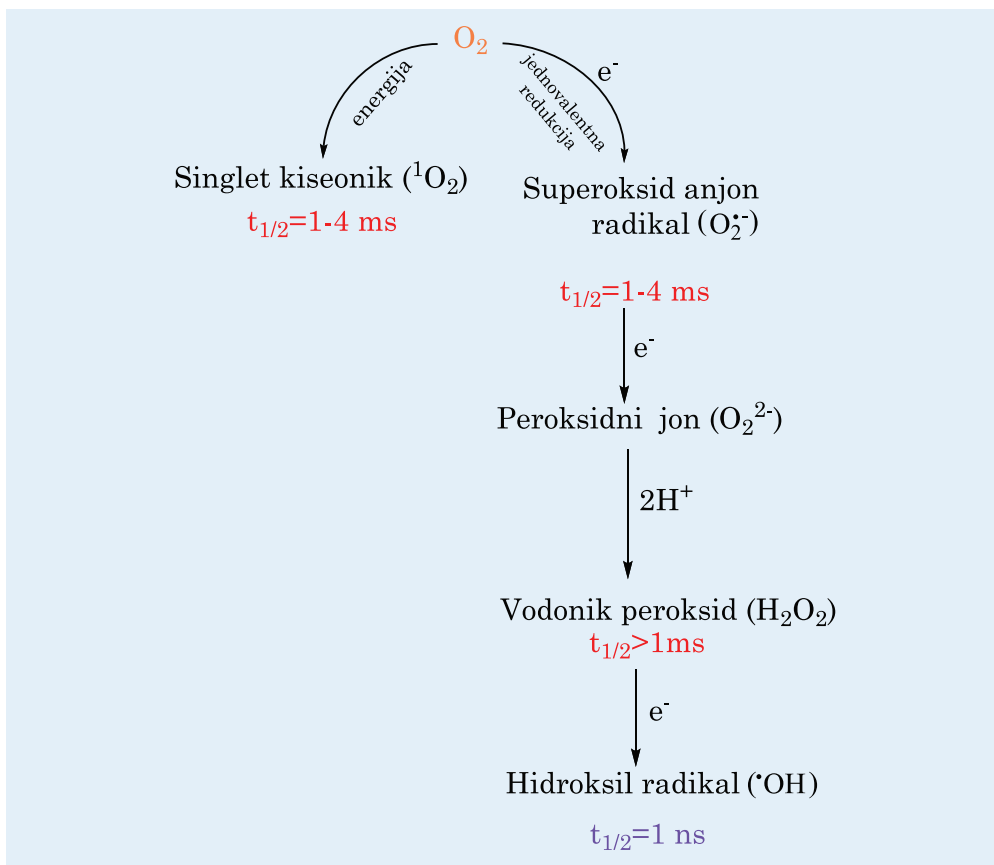


Slika 6. A) Elektronska konfiguracija atoma kiseonika (O),  
 B) Elektronska konfiguracija molekula kiseonika (O<sub>2</sub>).

U vazduhu, kiseonik se nalazi u tripletnom obliku. Kiseonik je jako oksidaciono sredstvo. U osnovnom stanju kiseonik slabo reaguje sa organskim molekulima koji imaju sparene elektrone suprotnog spina. Ako kiseonik „pokuša“ da oksiduje neradikal primanjem para elektrona, oba ova elektrona morala bi imati isti spin da bi se mogli uklopiti u prazno mjesto u  $\pi^*$  orbitali (Slika 6B). Samo atomi ili molekuli čiji elektroni imaju paralelne spinove, ali suprotnog smjera od smjera spina elektrona kiseonika, mogu biti oksidovani kiseonikom. Da bi kiseonik reagovao sa organskim molekulama, potrebna je „aktivacija“ kiseonika, odnosno prevazilaženje spinske restrikcije. Mehanizmi aktivacije kiseonika su jednovalentna redukcija i apsorpcija dovoljne količine energije (Slika 7). Jednovlentna redukcija podrazumijeva postepeni transfer 4 elektrona na molekulski kiseonik, pri čemu kao krajnji proizvod nastaje  $H_2O$ , a međuproizvodi su aktivirani oblici kiseonika: superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikal ( $\cdot OH$ ) (Slika 7). Prvi korak redukcije kiseonika (nastanak superoksid anjon radikala) je endotermni proces, ali su sljedeće redukcije egzotermne i reakcija se odvija u pravcu nastanka  $H_2O$ . Drugi način „aktivacije“ kiseonika je apsorpcija dovoljne količine energije, pri čemu dolazi do promjene spina jednog nesparenog elektrona i nastaje singlet kiseonik ( $^1O_2$ ). Aktivacijom se prevazilazi spinska restrikcija i singlet kiseonik može da učestvuje u reakcijama koje uključuju istovremeni transfer dva elektrona (dvovalentna redukcija). Spareni elektroni su česti kod organskih molekula i singletni kiseonik je reaktivniji sa organskim molekulima u poređenju sa triplet kiseonikom. Vrste kiseonika koje nastaju jednovalentnom redukcijom i apsorpcijom energije su kratkoživeće i reaktivne, pri čemu je najreaktivniji  $\cdot OH$  sa najkraćim vremenom poluživota (Slika 7).

Reaktivne vrste kiseonika (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) su hemijski reaktivne molekule koje sadrže kiseonik sa nesparenim elektronima ili bez njih (radikalne i neradikalne vrste). Pored već

navedenih ROS ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  i  $\cdot OH$ ) (Slika 7), u biološkim sistemima postoje i druge reaktivne vrste kiseonika (Tabela 1).



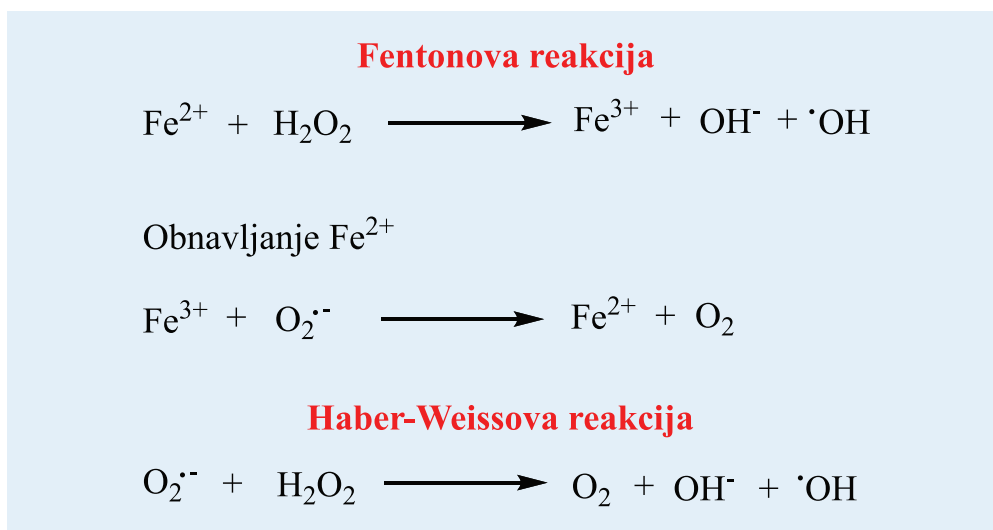
Slika 7. Nastanak reaktivnih vrsta kiseonika jednovalentnom redukcijom i apsorpcijom dovoljne količine energije.

*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

**Tabela 1. Radikalske i neradikalske vrste ROS (Halliwell i Gutteridge, 1999).**

Radikalske vrste		Neradikalske vrste	
$O_2^{\cdot-}$	Superoksid anjon radikal	$H_2O_2$	Vodonik peroksid
$\cdot OH$	Hidroksil	$HOCl$	Hipohlorna kiselina
$RO_2^{\cdot}$	Peroksil	$O_3$	Ozon
$RO^{\cdot}$	Alkoksil	$^1O_2$	Singlet kiseonik
$HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksil		

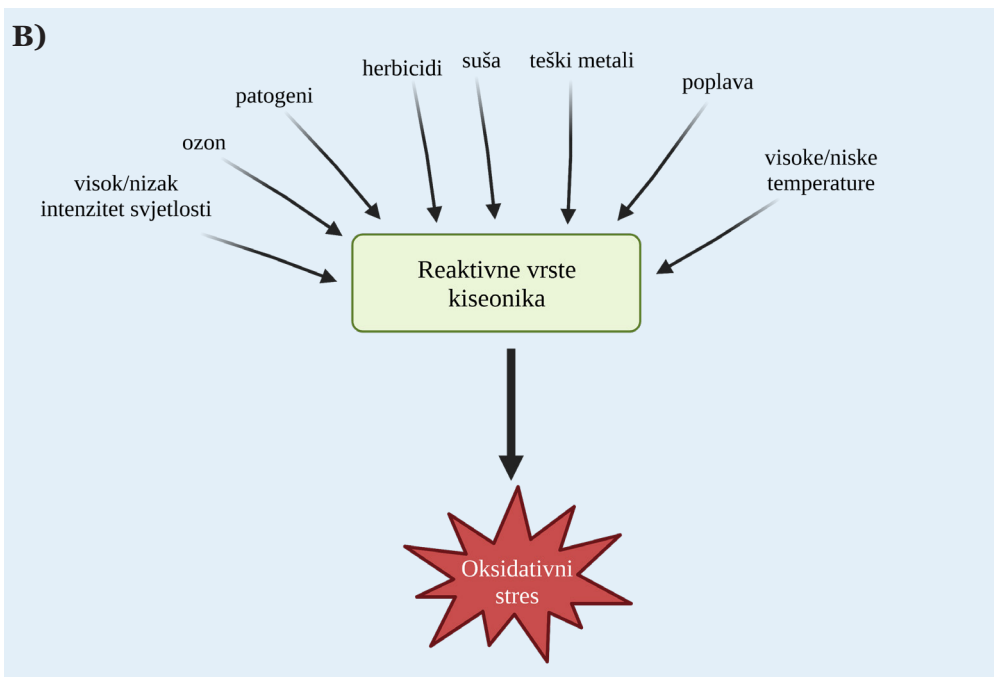
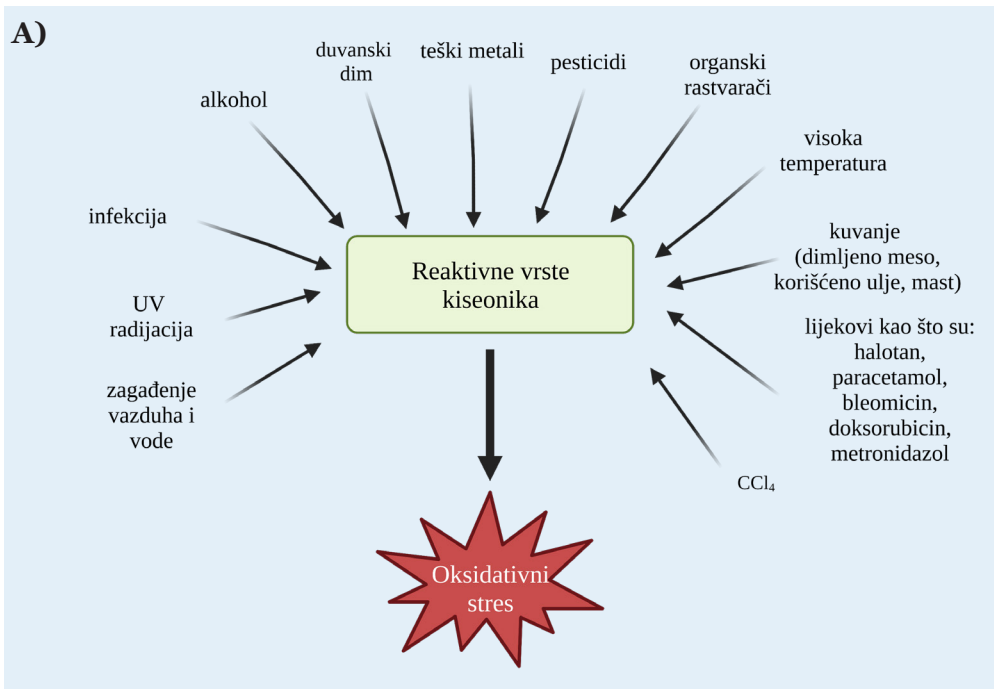
ROS koji sadrže nesparene elektrone, ubrajaju se u slobodno radikalske vrste. Zbog nesparenih elektrona, izuzetno su reaktivni jer lako mogu da prime ili otpuste elektron kako bi postigli stabilno stanje, mada su i neradikalske vrste, takođe, reaktivne. Vodonik peroksid je neradikalska vrsta sa relativno dugim vremenom poluživota, ali može da difunduje kroz ćelijske membrane i da izazove nastanak veoma reaktivnog  $\cdot\text{OH}$  reagujući sa prelaznim metalima (Fe, Cu) u reakciji koja se naziva Fentonova reakcija (Slika 8). Pored toga veoma reaktivni  $\cdot\text{OH}$  radikal može nastati u Haber-Weiss reakciji, kada reaguju  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Slika 8).



Slika 8. Fentonova i Haber-Weissova reakcija.

*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

Reaktivne vrste kiseonika proizvode se i u normalnim fiziološkim uslovima (ćelijsko disanje, fotosinteza kod biljaka). Proizvodnja ROS-a povećana je u uslovima izloženosti organizma različitim vrstama abiotičkog i biotičkog stresa. Oksidativni stres nastaje usljed povećane koncentracije ROS-a u ćeliji ili smanjenog uklanjanja istih, te se često naziva i sekundarni stres jer je posljedica djelovanja različitih vrsta abiotičkog i biotičkog stresa na animalne/humane i biljne ćelije (Slika 9).



Slika 9. Različite vrste stresa koje indukuju oksidativni stres u animalnoj/humanoj A) i biljnoj ćeliji B).

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*



ROS uzrokuju oksidativno oštećenje DNK, lipida i proteina. Postojanje ROS-a u biološkim sistemima otkriveno je 1954. godine (Commoner i sar., 1954) i prvobitno se smatralo da izazivaju isključivo štetne efekte. Međutim, proizvodnja ROS-a je neophodna u svim živim organizmima jer su ROS signalne molekule za osnovne biološke procese i odgovore na stres (Mittler, 2017; Mhamdi i Van Breusegem, 2018).

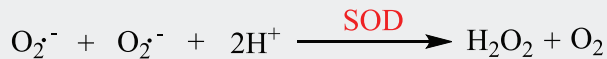
### 1.3 Antioksidativni sistem odbrane

Da bi se zaštitili od povećanih koncentracija ROS-a aerobni organizmi su razvili antioksidativni sistem zaštite (AOS) koji uključuje sintezu enzimskih i neenzimskih antioksidanata. AOS djeluje tako da vrši prevenciju nastanka ROS-a, ili se ROS uklanjaju prije nastanka oštećenja. Halliwell (1990) je definisao antioksidante kao supstance koje, prisutne u niskim koncentracijama, značajno smanjuju ili usporavaju oksidaciju supstrata koji je podložan oksidaciji. Svi organizmi moraju da kontrolišu prisustvo kako oksidanata, tako i antioksidanata. Ravnoteža između oksidanata i antioksidanata, koja se često naziva i *redoks ravnoteža*, specifična je za svaku organelu i ćeliju, a svako odstupanje od ravnoteže može dovesti do oštećenja ćelije. Pomjerenje ravnoteže koje nastaje kao posljedica povećanja koncentracije prooksidanata, a to povećanje prevazilazi kapacitet antioksidanata, definiše se, kao što je već rečeno, kao oksidativni stres. S druge strane, pomjerenje ravnoteže prema povećanju redukujućih kapaciteta ćelija, ili antioksidanata, može, takođe, da uzrokuje oštećenje koje se naziva reduktivni stres.

#### 1.3.1 Enzimski antioksidanti

##### 1.3.1.1 Superoksid dismutaze

Superoksid dismutaze (SOD; EC 1.15.1.1) su enzimi koji katalizuju reakciju dismutacije superoksid anjon radikala do molekuskog kiseonika i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prema jednačini:



Reakcija dismutacije superoksid anjon radikala katalizovana SOD-om 10000 puta je brža nego spontana dismutacija.

Superoxid dismutaze su metaloenzimi koji se nalaze u svim carstvima živog svijeta i prema metalnom kofaktoru u aktivnom mjestu mogu se klasifikovati u četiri grupe: bakar-cink SOD (Cu/ZnSOD), gvožđe SOD (FeSOD), mangan SOD (MnSOD) i nikel SOD (NiSOD) (Younus, 2018). Pošto je riječ o metaloenzimima, aktivnost SOD-a ne zavisi samo od koncentracije supstrata već i od koncentracije metalnih jona u tkivu.

Od navedenih SOD-a, tri izoforme su prisutne kod ljudi, svih ostalih sisara i većine hordata, a to su: citoplazmatična Cu/ZnSOD ili SOD1, mitohondrijalna MnSOD ili SOD2 i ekstracelularna Cu/ZnSOD (EC-SOD) ili SOD3 (Oakley i sar., 2009; Fukai i Ushio-Fukai, 2011; Wang, 2018). SOD1 je najzastupljenija i konstitutivno je prisutna u ćelijama, iako je njena ukupna ekspresija u plućima niža u odnosu na nekoliko drugih organskih sistema. Mutacija gena za SOD1 ili njeno oksidativno oštećenje dovodi do smanjenja SOD1 aktivnosti i može biti uzrok bolesti (amiotrofična lateralna skleroza) (Nikolić-Kokić i sar., 2006). SOD2 je prisutna u mitohondrijama, a dodatno se indukuje oksidativnim stresom, oksigenacijom, zagađivačima iz životne sredine i inflamatornim citokinima (Kinnula i Crapo, 2003). Ekspresija SOD3 je specifična za ćelije i tkivo, a najveća je u plućima i krvnim sudovima (Rahman i Biswas, 2006). Pošto SOD3 predstavlja jedini enzim za uklanjanje  $\text{O}_2^-$  u vanćelijskom prostoru, od velike je važnosti u zaštiti od egzogenog stresa i predstavlja prvu liniju odbrane od udahnutih oksidanasa iz okoline (Nguyen i sar., 2020).

U biljnim ćelijama, FeSOD su lokalizovane u hloroplastima, MnSOD u mitohondrijama i Cu/Zn SOD u citoplazmi, hloroplastima, intermembranskom prostoru mitohondrija, peroksizomima i

mitohondrijama (Sharma i sar., 2012). Pored toga, MnSOD su detektovane u ćelijskom zidu (Kukavica i sar., 2009).

### 1.3.1.2 Katalaza

Katalaza (CAT; EC 1.11.1.6) je homotetramerni protein. Svaka subjedinica katalaze sadrži hem kao prostetičnu grupu. Katalizuje reakciju razgradnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do O<sub>2</sub> prema sljedećoj jednačini:

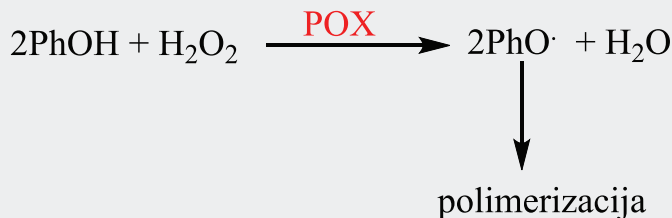


Katalaza uklanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> velikom brzinom, bez utroška ćelijske energije. Enzimska efikasnost (učestalost sudara supstrata i enzima) CAT-a veoma je visoka,  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 4,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Sharma i Ahmad, 2014). Skoro svi aerobni organizmi sadrže CAT-u. Takođe, CAT je prisutna i u nekim anaerobnim mikroorganizmima, kao što je *Methanosarcina barkeri* (Brioukhanov i sar., 2006). Kod velike većine životinjskih organizama, CAT je prisutna u svakom organu, pri čemu su posebno visoke koncentracije CAT-e u jetri sisara (Ilyukha, 2001).

Na ćelijskom nivou, CAT je lokalizovana prvenstveno u peroksizomima i citoplazmi eritrocita (a ponekad i u mitohondrijama) (Bai i Cederbaum, 2001). U biljnoj ćeliji, katalaza ima važnu ulogu u uklanjanju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u peroksizomima, gdje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nastaje kao rezultat β-oksidacije masnih kiselina, fotorespiracije i katabolizma purina (Gill i Tuteja, 2010).

### 1.3.1.3 Peroksidaze klase III

Peroksidaze klase III (POX; EC 1.1.1.7) su glikoproteini sa hem prostetičnom grupom i karakteristične su za biljne ćelije. Peroksidaze klase III su oksidoreduktaze koje katalizuju oksidaciju velikog broja različitih supstrata (uglavnom fenolnih jedinjenja (PhOH)) do fenoksi radikala (PhO<sup>•</sup>) u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao akceptora elektrona (Veljović-Jovanović i sar., 2018) prema jednačini:



Pored uklanjanja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , POX mogu katalizovati i proizvodnju ROS-a u oksidativnom i hidroksilnom ciklusu. U oksidativnom ciklusu dolazi do prenosa jednog elektrona sa redukovanog supstrata (NADH-a ili fenolnog jedinjenja) na  $\text{O}_2$  pri čemu nastaju  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . U hidroksilnom ciklusu POX mogu proizvesti  $\cdot\text{OH}$  iz  $\text{H}_2\text{O}_2$  u prisustvu  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Chen i Schopfer, 1999; Veljović-Jovanović i sar., 2018).

POX koje su lokalizovane u vakuolama čine više od 90% rastvornih peroksidaza lista, dok su preostale POX jonski i kovalentno vezane za ćelijski zid (Veljović-Jovanović i sar., 2018). Endogeni supstrati za POX su fenolna jedinjenja, lokalizovana u vakuolama i apoplastu.

### 1.3.1.4 Askorbat peroksidaza

Askorbat peroksidaze (APX; EC 1.1 1.1.11) su enzimi koji sadrže hem, pripadaju peroksidazama klase I i karakteristične su za biljne ćelije. Kod viših biljaka, izoforme APX su pronađene u citoplazmi (cAPX), hloroplastima (chlAPX), mitohondrijama (mitAPX) i peroksisomima (pAPX). Hloroplastne izoforme dijele se na dva tipa: stromalne i tilakoidno vezane APX (Maruta i Ishikawa, 2018). Izoenzimi APX razlikuju se po molekularnoj masi, optimalnoj pH, stabilnosti i specifičnosti za supstrate. Takođe, izoenzimi APX nestabilni su u odsustvu askorbata i nivo endogenog askorbata je esencijalan za aktivnost APX-a. U odnosu na koncentraciju endogenog askorbata najosjetljivije su hloroplastne APX, dok su najstabilnije citoplazmatične APX.

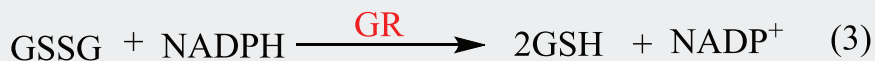
Askorbat peroksidaza odlikuje se visokim afinitetom za  $\text{H}_2\text{O}_2$ , većim u odnosu na katalazu.

APX katalizuje reakciju uklanjanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koristeći askorbat (AsA) kao supstrat pri čemu nastaju monodehidroaskorbat (MDHA) i voda prema jednačini:



Nastali MDHA može se regenerisati do AsA prijemom elektrona iz elektron transportnog lanca ili se neenzimskom dismutacijom prevesti do dehidroaskorbata (DHA). Takođe, MDHA se pomoću monodehidroaskorbat reduktaze (MDHAR), koja koristi NADH ili NADPH, prevodi do DHA (1). Nastali DHA se enzimom dehidroaskorbat reduktazom (DHAR) prevodi do askorbata, pri čemu se glutacion (GSH) oksiduje do glutacion disulfida (GSSG) (2). Regeneracija GSH se odvija uz pomoć NADPH-zavisne glutacion reduktaze (GR) (3).

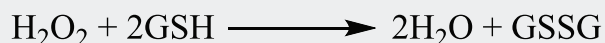
Reakcije regeneracije MDHA:



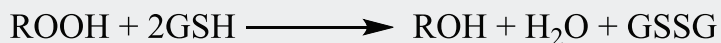
Askorbat peroksidaza, monodehidroaskorbat reduktaza, dehidroaskorbat reduktaza i glutacion reduktaza su enzimi askorbat - glutacion ciklusa koji se, pored hloroplasta, nalaze u citoplazmi i omogućavaju biljnim ćelijama efikasno uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Maruta i Ishikawa, 2018).

### 1.3.1.5 Glutation peroksidaze

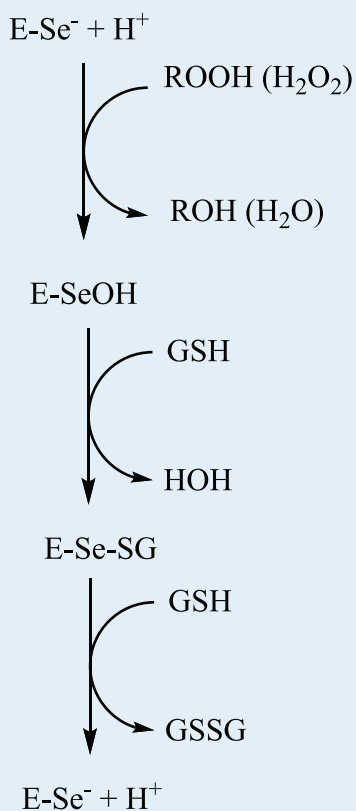
Glutation peroksidaza (GPx; EC 1.11.1.9) prvi put je identifikovana u eritrocitima kao aktivnost koja učestvuje u zaštiti ćelija od H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mills, 1957). Reakcija koju katalizuje je glutacion zavisna redukcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do H<sub>2</sub>O:



GPx otkrivena je i u drugim tkivima, gdje se pokazalo da redukuje organske hidroperside (ROOH) u odgovarajuće alkohole (ROH):



Identifikovani su članovi porodice GPx kod eukariota, od algi do sisara. Glutation peroksidaza za čiju je aktivnost neophodan selen, prvi je identifikovani životinjski selenoprotein. Selen prisutan u aktivnom mjestu GPx-a u obliku je selenocisteina. Osim toga, na osnovu sličnosti sekvence i prisustvom očuvanog redoks mjesta, identifikovani su članovi porodice GPx koji ne sadrže selen, već cistein u aktivnom mjestu enzima. Postoje razlike između enzima u superfamiliji glutacion peroksidaza. Osim pomenutih selenoproteina, i enzima koji sadrže cistein u aktivnom mjestu, postoje i 2-cistein enzimi. Enzimi, 2-cistein GPx koriste tioredoksin umjesto GSH kao redukcionim supstratom. Ovi enzimi su klasifikovani kao članovi porodice glutacion peroksidaza samo zbog sličnosti sekvenci, dok je mehanizam djelovanja isti kao mehanizam djelovanja tioredoksin peroksidaze. Neke izoforme GSH-S-transferaza (GST) pokazuju aktivnost glutacion peroksidaza kojima su supstrati organski hidropersidi. Glutation peroksidaze imaju različite supstrate i mehanizme djelovanja, što otežava utvrđivanje njihovih *in vivo* funkcija (Burk i Hill, 2010 i reference u okviru rada) (Slika 10).



Slika 10.

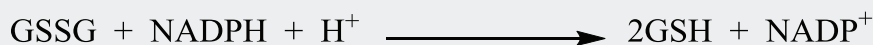
Mehanizam aktivnosti GPx-a koje sadrže selen. Mehanizam ima dvije komponente: oksidaciju enzima i njegovu redukciju i predstavlja ping-pong mehanizam. Redukovani selenoladni oblik enzima ( $E-Se^-H^+$ ) brzo reaguje sa hidroperoksidom ili vodonik peroksidom ( $ROOH / H_2O_2$ ) da bi nastao detoksikovani proizvod alkohol (ili voda u slučaju  $H_2O_2$ ) i selenski oblik enzima ( $E-SeOH$ ). GSH (ili drugi tiol) redukuje enzim u dva koraka nazad do selenolata uz nastanak GSSG. Brzina redukcije varira u zavisnosti od enzima.

*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

### 1.3.1.6 Glutation reduktaza

Glutation reduktaza (GR; EC 1.8.1.7) katalizuje redukciju GSSG do GSH, koji je veoma značajan u odgovoru na oksidativni stres i u održavanju redoks stanja ćelije (Mannervik, 1987; Meister, 1988; Deponte, 2013).

GR kao dimerna disulfid oksidoreduktaza sa flavin adenin dinukleotidom (FAD) kao prostetičnom grupom i nikotinamid adenin dinukleotid-fosfatom (NADPH) katalizuje reakciju prema jednačini:



GR je prisutna u svim carstvima živih organizama. *Drosophila* i tripanosomi nemaju GR i kod ovih organizama redukciju glutaciona katalizuju tioredoksini (Kanzok i sar., 2001; Krauth-Siegel i sar., 2008).

### 1.3.1.7 Glutation-S-transferaza

Glutation-S-transferaza (GST, EC 2.5.1.18) je antioksidativni enzim, a pored toga pripada i enzimima faze II biotransformacije. GST posjeduje sposobnost da katalizuje konjugaciju redukovanog oblika GSH sa ksenobioticima u svrhu detoksikacije. Katalizuje konjugaciju GSH sa veoma različitim elektrofilnim jedinjenjima (citotoksična jedinjenja, mutageni, karcinogeni). Supstrati za konjugaciju GSH mogu se podijeliti u dvije grupe: oni koji su dovoljno elektrofilni da se direktno konjuguju i oni koji se prvo moraju biotransformisati u elektrofilni metabolit prije konjugacije. Glutation-S-transferaza je prisutna kod svih aerobnih organizama u većini tkiva, sa visokim koncentracijama u jetri (najzastupljenija je i predstavlja 5% od ukupnih citoplazmatičnih proteina), crijevima, bubrezima, testisima, nadbubrežnim žlijezdama i plućima. Mogu biti rastvorne (citoplazmatične) i vezane za membranu (mikrozomalne i mitohondrijalne). Osim toga, mogu biti prisutne u jedru i peroksizomima. Pokazuju široku specifičnost za supstrat. Reakcije konjugacije mogu se podijeliti u dva tipa: reakcije premještanja, u kojima GSH zamjenjuje grupu koja povlači elektrone, i reakcije adicije, u kojima se glutacion dodaje aktiviranoj dvostrukoj vezi ili napetom sistemu prstena.

Postojanje GST izoenzima je utvrđeno je 1960. godine. Izoenzimski profili se razlikuju od tkiva do tkiva. Mogu biti homodimeri, heterodimeri, različitih klasa ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$ ,  $\kappa$ ,  $\theta$  i  $\omega$ ). Identičnost sekvenci unutar klase veća je od 50% (ili 70%), dok je između klasa manja od 30%. Dva domena su prisutna, a N-terminal je mjesto vezivanja GSH (Casarett, 2008 i reference unutar knjige).

### 1.3.1.8 Peroksiredoksini

Antioksidativna odbrana je povezana sa redoks signalizacijom. Izmjena tiol (SH) - disulfidna (SS) veza, važan je dio detekcije



stresa i signalizacije u kojoj važnu komponentu predstavljaju peroksiredoksini. Peroksiredoksini (Prxs) su tiol proteini sa više funkcija u antioksidativnoj odbrani i redoks signalizaciji.

Kod životinja i ljudi Prxs su peroksidaze zavisne od tioredoksina (Trx). Izoforme Prx I i Prx II prisutne su u citoplazmi, Prx III lokalizovana je u mitohondrijama, a Prx IV je ekstracelularna. Izoforma Prx V je lokalizovana u mitohondrijama i mikrozomima. Prx VI je jednocisteinski tip. Istraživanja su pokazala da miševi kojima nedostaje izoforma Prx I imaju skraćen životni vijek sa hemolitičkom anemijom i malignitetima (Neumann i sar., 2003). Prx II nokaut mutanti miševa takođe pokazuju anemiju (Lee i sar., 2003).

U biljkama su Prxs lokalizovani u citoplazmi, mitohondrijama, plastidima i jedru. Prxs katalizuju razgradnju peroksida pri čemu prelaze u neaktivan oblik. Ponovno aktiviranje Prxs se odvija uz donore elektrona, kao što su tioredoksini, glutaredoksini, NADPH zavisna tioredoksin reduktaza (Bhatt i Tripathi, 2011. i reference u okviru rada).

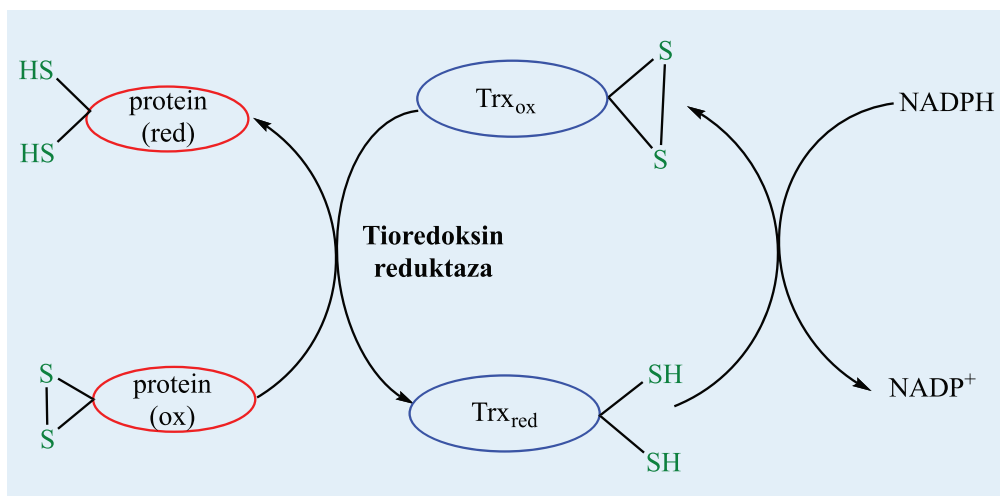
### **1.3.1.9 Tioredoksini**

Tioredoksini (Trx) su proteini sa redoks aktivnim disulfidnim mostom unutar sekvence Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-. U redukovanom obliku vrlo su efikasne protein disulfid oksidoreduktaze i donori su elektrona u različitim redoks reakcijama. Djeluju zajedno sa NADPH i tioredoksin reduktazom kao efikasan sistem redukcije proteinskih disulfida (Izawa i sar., 1999), (Slika 11). To su mali proteini (molekulska masa ~ 12 kDa) koji su prisutni u bakterijskim, biljnim i životinjskim ćelijama (Holmgren; 1989; Nordberg i Arnér, 2001). Dvije vrste tioredoksina pronađene su u bakterijama i životinjskim tkivima, dok biljna tkiva sadrže više oblika: dva u hloroplastima, jedan u citoplazmi i jedan u mitohondrijama. Tioredoksini, iako su slične molekulske mase i, sličnih redoks osobina, ispoljavaju specifičnosti

u odnosu na supstrate. Specifičnost za supstrat je posljedica strukturne komplementarnosti, koja omogućava specifičnu interakciju između različitih tioredoksina i njihovih ciljnih proteina. Pored uloge antioksidanta, Trx i njemu srodni molekuli, igraju ključnu ulogu u redoks regulaciji transdukcije signala.

Citoplazmatični tioredoksin-1 (Trx1) najproučavaniji je kod sisara i ima ključnu ulogu u regulaciji redoks reakcija u prenosu signala i izlučuje se iz ćelija kao odgovor na oksidativni stres (Nakamura, 2004). Nokaut Trx1 gena smrtonosna je za ranu diferencijaciju i morfogenezu mišjeg embriona, što sugerira da je Trx1 esencijalni protein za sisare (Matsui i sar., 1996). Trx2 je član porodice Trxs specifičan za mitohondrije, a također je esencijalan za opstanak ćelija (Tanaka i sar., 2002; Nonn i sar., 2003). Nivoi Trx1 u plazmi/serumu dobri su markeri oksidativnog stresa. Egzogeni Trx1 pokazuje citoprotektivne i antiinflamatorne efekte (Nakamura, 2005). Nakon oksidativnog stresa, Trx se transportuje iz citoplazme u jedro i povećava aktivnost vezivanja nekoliko transkripcionih faktora (Hirota i sar., 1997; Hirota i sar., 1999; Ueno i sar., 1999) za DNK. Glutaredoksin (Grx) je član porodice Trxs koji zavisi od glutationa. Postoje dvije izoforme Grx kod sisara. Dok je klasični Grx1 prisutan u citoplazmi, Grx2 je prisutan u jedru i mitohondrijama (Lundberg i sar., 2001; Fernandes i Holmgren, 2004). Endoplazmatični retikulum ima nekoliko članova porodice Trx, uključujući protein disulfid izomerazu (PDI). Transmembranski protein povezan sa Trx je protein TMX (engl. *transmembrane thioredoxin-related protein*) koji posjeduje anti-ER stresnu aktivnost, pri čemu pokazuje funkciju sličnu PDI za ponovno uvijanje kodirane RNaze (Matsuo i sar., 2001; Matsuo i sar., 2004). Protein 2, sličan Trx (Tx1-2), jedinstveni je član porodice Trx koji se vezuje za mikrotubule (Sadek i sar., 2003). TrxR sisara je selenoprotein koji sadrži pretposljednji selenocistein na C-terminalnom kraju, neophodan za katalitičku aktivnost. Postoje

tri izoforme TrxR sisara: citoplazmatske TrxR1, mitohondrijalne TrxR2 i TGR. (engl. *Thioredoxin Glutathione Reductase*). TGR povezuje dva antioksidativna puta u mnogim organizmima, jedan baziran na tioredoksinu i drugi baziran na glutationu (Prast-Nielsen i sar., 2011). TGR redukuje ne samo Trx, već i oksiduje glutation i postoji uglavnom u testisima (Sun i sar., 2001; Miranda-Vizueti i sar., 2004). U zavisnosti od lokalizacije u biljnoj ćeliji tioredoksini se redukuju različitim sistemima donora elektrona. Tioredoksini u nefotosintetskom tkivu i u citoplazmi fotosintetskih ćelija redukuje se elektronima NADPH putem NADP<sup>+</sup>/tioredoksin sistema (Slika 11), dok se hloroplastni tioredoksini biljaka redukuje putem feredoksin/tioredoksin sistema sa elektronima koji dolaze od fotosintetskog transporta elektrona (Schürmann i Jacquot, 2000).



Slika 11. Redukcija S-S veze proteina uz pomoć tioredoksina.

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

## 1.3.2 Neenzimski antioksidanti

### 1.3.2.1 Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja su biljni sekundarni metaboliti koji se odlikuju velikom strukturnom raznovrsnošću (flavonoidi, fenolne kiseline,

antocijani i dr.). Strukturna karakteristika fenolnih jedinjenja je prisustvo bar jednog aromatičnog prstena, sa jednom slobodnom ili modifikovanom (npr. metilovanom) hidroksilnom grupom. Glavni prekursori za sintezu fenolnih jedinjenja su aromatične amino kiseline fenilalanin i tirozin. Većina flavonoida i fenolnih kiselina su glikolizovani u biljnim ćelijama, što im omogućava bolju rastvorljivost u vodi. Pored toga, glikozilacija štiti reaktivne OH grupe od autooksidacije tokom transporta flavonoida u biljnoj ćeliji. U zavisnosti od strukture i lokalizacije na nivou ćelije i organa, fenolna jedinjenja mogu imati različite fiziološke uloge. Kao sekundarni metaboliti, smatraju se neesencijalnim za biljke. Međutim važni su pri interakciji biljaka sa spoljašnjom sredinom, a utiču i na rast biljaka.

Fenolna jedinjenja imaju važnu ulogu u antioksidativnom odbrambenom sistemu. Nekoliko je načina na koje fenolna jedinjenja ispoljavaju svoja antioksidativna svojstva:

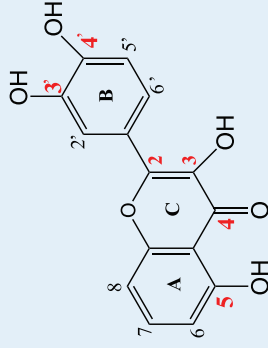
1. u direktnim reakcijama sa ROS-om;
2. kao supstrati enzima (POX);
3. heliranjem prelaznih metala i smanjenjem protoka kroz Fentonovu reakciju.

Među fenolnim jedinjenjima, flavonoidi i fenolne kiseline izdvajaju se svojim izraženim antioksidativnim svojstvima. Strukturne karakteristike flavonoida i fenolnih kiselina koje su osnova za njihova antioksidativna svojstva, predstavljena su na Slici 12.

### **1.3.2.2 Askorbat**

Askorbat (AsA) je prvi put otkriven u nadbubrežnoj žlijezdi (Szent-Györgyi, 1928). Većina sisara je u stanju da sintetise askorbat iz glukoze, što predstavlja prepreku za provjeru njegovog fiziološkog djelovanja.

## Flavonoidi



Strukturne karakteristike

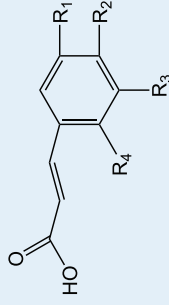
**3', 4'** - dihidroksi supstitucija

**2,3** dvostruka veza i **4-** C=O veza

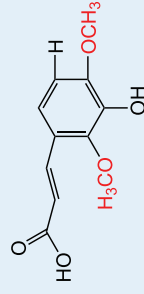
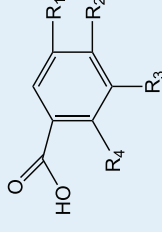
**3**-hidroksi-**4**-keto i/ili **5**-hidroksi-keto

## Fenolne kiseline

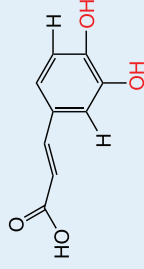
Osnovna struktura  
cinamične kiseline



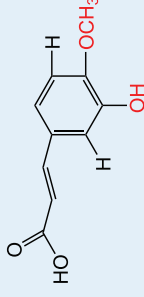
Osnovna struktura  
benzojeve kiseline



Sinapična kiselina



Kafeična kiselina



Ferulična kiselina



povećanje antioksidativne aktivnosti

Slika 12. Strukturne karakteristike flavonoida i fenolnih kiselina koje doprinose antioksidativnim karakteristikama.

Kreirano u ChemDraw Professional 15.

Funkcije AsA u životinjskim/ljudskim ćelijama:

1. djeluje kao donor elektrona u sintezi bioloških jedinjenja, kao što su kolagen (kofaktor prolil i lizil hidrosilaza) i kateholamini (Englard i Seifter, 1986);
2. funkcioniše kao kofaktor za regulaciju ekspresije gena zavisnu od kiseonika preko faktora koji izaziva hipoksiju (HIF)-1 $\alpha$  (Kaelin i Ratcliffe, 2008);
3. uključen je u epigenetsku regulaciju gena koji utiču na status metilacije DNK i histona (Kohli i Zhang, 2013; Mikkelsen i sar., 2021).

Pored navedenih, važna funkcija AsA je antioksidativna uloga (zbog sposobnosti da donira elektrone). Antioksidativna uloga AsA kod sisara uglavnom se ispoljava kroz neenzimske reakcije (Buettner, 1993). Askorbat direktno reaguje sa slobodnim radikalima pri čemu nastaje askorbilni radikal, a zatim dehidroaskorbat. U poređenju sa drugim mikronutrijentima, svakodnevno uzimanje askorbata u znatno većim koncentracijama, potrebno je za održavanje zdravlja kod životinja nesposobnih za sintezu AsA (uključujući i čovjeka). Istraživanja na miševima, koji nemaju sposobnost sinteze, AsA, pokazala su da antioksidativni potencijal AsA ima važnu ulogu u održavanju zdravlja životinja (Njus i sar., 2020). S druge strane, zbog visokog redoks potencijala, AsA može, takođe, da ispoljava prooksidantne efekte u prisustvu jona prelaznih metala kao što je gvožđe (Scarpa i sar., 1983).

Kombinovano djelovanje AsA kao antioksidanta i njegova uloga u regulaciji epigenetskih promjena na DNK (npr. demetilacija), efikasno sprečava razvoj kancera. Pored toga, farmakološke doze AsA i dehidroaskorbata mogu da ispolje tumoricidnu aktivnost putem redoks zavisnih mehanizama (Fuji i sar., 2022).

Askorbat se često naziva i glavnim metabolitom kod biljaka. Velike su koncentracije AsA u biljnim ćelijama. Na primjer, koncentracija askorbata u hloroplastima može da dostigne vrijednosti i preko 20

mM (Smirnoff i Wheeler, 2000). Važna je uloga askorbata u rastu i razvoju biljaka, kao i pri regulaciji ćelijskih mehanizama u odgovoru na uslove stresa u životnoj sredini. Pored toga, AsA je jedan od najvažnijih antioksidanata. Askorbat može direktno uklanjati ROS i u reakcijama katalizovanim sa APX kao supstrat. Takođe, važna je uloga AsA u obnavljanju oksidovanog  $\alpha$ -tokoferola i fenoksi radikala koji nastaju oksidacijom fenolnih jedinjenja (Takahama, 2004). Askorbat reaguje direktno sa ROS-om brže od drugih, u vodi rastvornih antioksidanata, i na taj način štiti makromolekule od oksidativnih oštećenja.

### 1.3.2.3 Glutation

Glutation (GSH) je tripeptid (Glu-Cys-Gly) čija se antioksidativna funkcija ispoljava preko sulfhidrilnih grupa cisteina. Glutation, kao najzastupljeniji neproteinski tiol, nalazi se u bakterijskim, životinjskim, biljnim i ljudskim ćelijama. U ćelijama se glutacion može naći u dva oblika: slobodan ili vezan za druge molekule. Slobodni glutacion postoji u dva reverzibilna stanja koja pomažu u očuvanju redoks homeostaze unutar ćelija. Jedan oblik je monomerni, redukovani sulfhidrilni oblik - GSH, dok je drugi disulfidni dimer - GSSG, koji nastaje nakon oksidacije GSH. U fiziološkim uslovima, GSH je daleko zastupljeniji, pri čemu čini ~ 90% ukupnog glutaciona. Međutim, u slučaju oksidativnog stresa, koncentracija GSSG je veća od koncentracije GSH (Samadi i sar., 2001).

Hemijska struktura GSH određuje njegove potencijalne funkcije, a njegova široka distribucija među svim živim organizmima odražava njegovu važnu biološku ulogu.

Intracelularna koncentracija GSH kod životinja obično je u opsegu od 0,5 do 10 mM, dok su ekstracelularne vrijednosti za jedan do tri reda veličine niže (Halliwell i Gutteridge, 1999; Maher, 2005). Koncentracija GSH u jetri je izuzetno visoka ~5-10 mM (Casarett, 2008). Glutation je obično najzastupljeniji tiol male molekulske mase u životinjskim

ćelijama. Većina mikroorganizama, takođe, posjeduje GSH u visokim koncentracijama, ali postoje neke vrste i održivi mutanti kojima nedostaje GSH (Spector i sar., 2001; Blazhenko i sar., 2006; Lushchak i Lushchak, 2008). Iako se GSH sintetise u citoplazmi, distribuira se u različite intracelularne organele u kojima ima specifične funkcije koje se odnose na njegovu ulogu u regulaciji ćelijskog redoks statusa. Pored citoplazmatičnog bazena, GSH funkcioniše u donekle nezavisnim bazenima u endoplazmatičnom retikulumu (ER), jedru i mitohondrijama. U većini ovih kompartmana, GSH se obično nalazi u visoko redukovanom stanju, ali u ER-u je značajan dio oksidovan i odnos [GSH]/[GSSG] može biti čak 3 : 1, dok je u citoplazmi oksidovani oblik obično reda veličine oko 1% od ukupne količine ili manje (Cooper i sar., 1980; Kumar i sar., 2011). U ER-u, GSSG je glavni oksidans koji omogućava nastanak funkcionalne konformacije novosintetisanih polipeptida formiranjem potrebnih intramolekularnih disulfidnih veza između ostataka cisteina. Pored standardnih antioksidativnih funkcija, GSH u jedru održava odgovarajući redoks status sulfhidrilnih grupa u proteinima uključenim u biosintezu nukleinskih kiselina i popravku DNK. Takođe, u jedru se takođe koristi u redukciji ribonukleotida za proizvodnju deoksiribonukleotida, katalizovanom ribonukleotid reduktazom (Holmgren i Sengupta, 2010). Oko 10-15% ćelijskog GSH nalazi se u mitohondrijama. Pošto mitohondrije imaju veoma malu zapreminu, lokalna koncentracija GSH u ovim organelama (mitohondrijalni GSH bazen) obično je veća od one u citoplazmi. U mnogim slučajevima pokazana je bliska veza između koncentracija GSH u mitohondrijama i preživljavanja ćelija.

GSH se distribuira između različitih organa životinja. Glutathion se može transportovati kroz plazma membranu (Griffith i Meister, 1979; Sies, 1999). Jetra je glavni izvor GSH koji se transportuje u krv (Adams i sar., 1983; Lauterburg i sar., 1984; DeLeve i Kaplowitz 1991; Ookhtens i sar., 1994). Proizvodnja u jetri i transport iz nje povezani



su sa najmanje dvije funkcije GSH. Prva uključuje epitelne ćelije koje su u kontaktu sa spoljašnjom sredinom kao što su crijeva i pluća. Primarna funkcija GSH ovdje je usmjerena na detoksikaciju štetnih spoljašnjih agenasa kako bi se spriječilo oštećenje organizma. Ovo je važna uloga GSH u normalnoj funkciji crijeva. Pluća su izložena visokim nivoima kiseonika, a i udahnutim toksinima. Alveolarni makrofagi obezbjeđuju dodatni izvor ROS-a u ovom tkivu. Dakle, postoji više razloga za održavanje adekvatnog nivoa GSH u plućima. Druga funkcija se odnosi na metabolizam visokog intenziteta baziran na kiseoniku i detoksikaciju u jetri i bubrezima. Portalna vena dovodi krv iz crijeva u jetru i, ako se ne detoksikuju u crijevima, ksenobiotici moraju biti neutralisani hepatocitima (Songi sar., 2000; Fernandez-Checa i Kaplowitz, 2005; Izzet i sar., 2005; Xue i sar., 2008). Pored toga, jetra je važan biosintetički organ u kome se ROS proizvode u značajnim količinama kao sporedni proizvodi sinteze ATP-a (adenozin trifosfat, engl. *Adenosine Triphosphate*) u elektron transportnom lancu mitohondrija ili kao rezultat biosinteza koje uključuju različite oksigenaze. U bubrezima se, takođe, nalazi efikasan GSH sistem koji ima funkciju u odbrani od ROS-a (Griffith i Meister, 1979; Lash, 2009; Benipal i Lash, 2011).

GSH je pronađen u svim ćelijama sisara. Najvažnije funkcije GSH su:

1. zaštita od ROS-a;
2. detoksikacija endogenih i egzogenih toksičnih supstanci elektrofilne prirode;
3. održavanje esencijalnog tiolnog statusa proteina i drugih molekula;
4. skladištenje rezervi cisteina kako u ćeliji tako i za interorganski transfer;
5. redukcija ribonukleotida u dezoksiribonukleotide;
6. formiranje Fe-S proteina;
7. transport bakra i gvožđa i
8. prenošenje signala iz okoline za ćelijsku transkripciju.

Kod biljnih ćelija, GSH je prisutan u većini ćelija i subćelijskih kompartmana. Nivo GSH smanjuje se sa starošću tkiva i varira u odnosu na uslove u okolini - nivo GSH je viši na svjetlosti u odnosu na mrak. Na ćelijskom nivou, koncentracija GSH je najveća u hloroplastima, između 1 i 4 mM, ali se u značajnoj količini GSH akumulira i u citoplazmi (Koffler i sar., 2013). Glutation je, uglavnom, u redukovanoj formi oko 70% u hloroplastima ječma i 90% u hloroplastima graška.

Glutation u biljnoj ćeliji može funkcionisati kao antioksidant na nekoliko načina:

1. direktno reaguje sa singlet kiseonikom, superoksid anjon radikalom i vodonik peroksidom;
2. stabilizuje membranske strukture uklanjajući acil perokside nastale tokom lipidne peroksidacije;
3. omogućava regeneraciju askorbata u reakciji koju katalizuje dehidroaskorbat reduktaza;
4. glutacion može da redukuje DHA preko neenzimskog mehanizma na  $\text{pH} > 7$  i koncentracijama GSH većim od 1 mM, što može biti značajan put za regeneraciju DHA u hloroplastima čija je stromalna pH na svjetlosti oko 8 i koncentracija GSH može biti veća od 5 mM.

## **1.4 Proizvodnja i uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika u animalnoj ćeliji**

### **1.4.1 Funkcije i mehanizam djelovanja reaktivnih vrsta kiseonika na fiziološkom i patološkom nivou**

Svi živi organizmi moraju uravnotežiti proizvodnju i uklanjanje ROS-a. Na fiziološkom nivou, pored uloge u uništavanju patogena u imunološkoj odbrani od spoljašnje povrede ili sintezi ćelijskih struktura kao što su proteinski kompleksi (šaperoni, proteozomi), ROS funkcionišu kao redoks glasnici tj. sekundarni glasnici (Slika

13). Čelije mogu da generišu ROS konstitutivno i u odgovoru na egzogene stimulse, te da ih koriste za intracelularnu signalizaciju i za stimulaciju redoks osjetljivih signalnih puteva da bi modifikovali ćelijski sadržaj citoprotektivnih regulatornih proteina. Dakle, ROS kontrolišu proinflamatornu signalizaciju, profibrotičku signalizaciju, proliferaciju ćelija, apoptozu i niz drugih bioloških procesa bez oštećenja makromolekula. ROS učestvuju i u kontroli krvnog pritiska (Wolin, 2000), posrednici su u biosintezi prostaglandina (Kuehl i Egan, 1980), u embrionalnom razvoju (Saugstad, 2001) i djeluju kao signalni molekuli unutar ćelije i između ćelija tokom njihovog životnog vijeka (Benhar i sar., 2002). ROS su u stanju da indukuju redoks osjetljive signalne kaskade koje dovode do povećanja ekspresije antioksidativnih enzima u svim živim organizmima, od jednostavnih bakterija do složenih sisara. Povećanje efikasnosti antioksidativnog odbrambenog sistema, obezbijeđeno genetskim odgovorom, omogućava ćelijama da prežive izloženost oksidantima koja bi, inače, bila smrtonosna. Kod sisara, transkripcija gena koja određuje opstanak ćelije može biti aktivirana pomoću ROS-a na dva načina:

1. preko faktora transkripcije, koji mogu direktno da interreaguju sa specifičnim DNK motivima na promotorima ciljnih gena i
2. putem mitogen aktiviranih protein kinaza (MAPK ili MAP kinaza), koje, aktivirajući transkripcione faktore, pokreću transkripciju ciljnog gena (Scandalios, 2005). Postoje dva mehanizma kojim ROS inicira ćelijsku signalizaciju, a to su modifikacija ciljnih proteina i promjena intracelularnog redoks stanja (Thannickal i Fanburg, 2000).

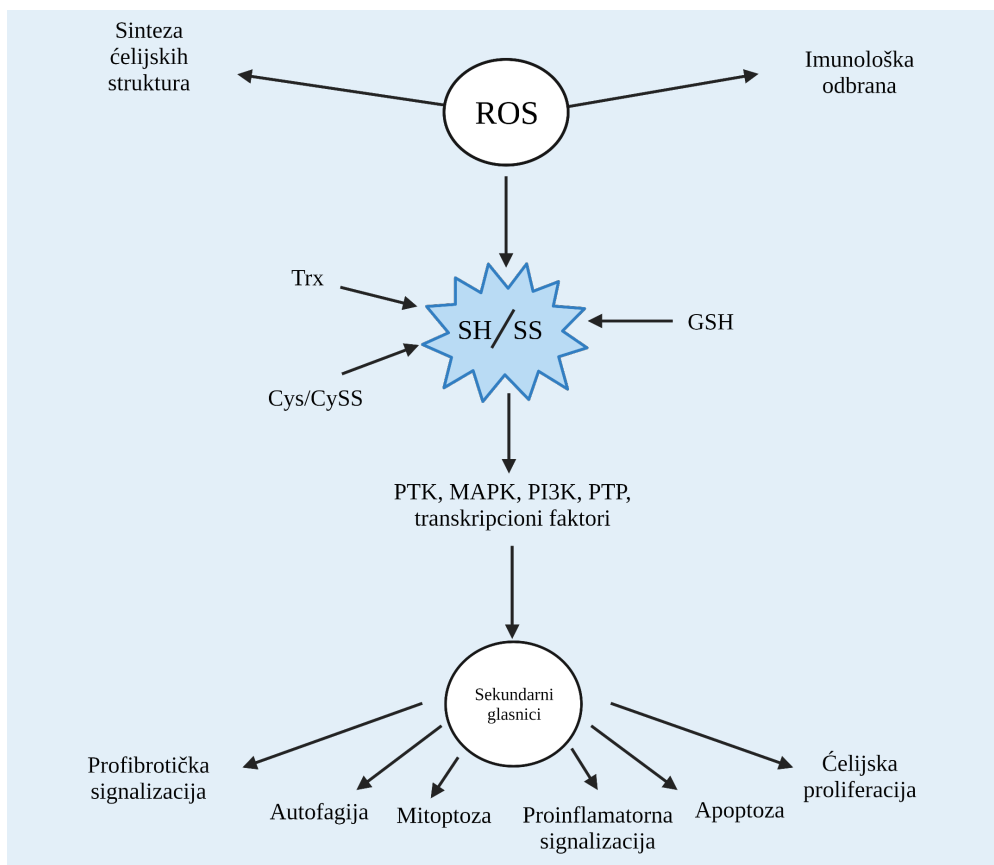
Smatra se da je aktivnost redoks glasnika posredovana ROS-om veća u poređenju sa oštećenjima makromolekula posredovanih ROS-om. Redoks stanje u citoplazmi se obično postiže kapacitetom „redoks pufera“ intracelularnih tiola, kao što su GSH i Trx. To su glavni „redoks čvorovi“ koji kontrolišu fiziološki važne procese. Uključivanje cisteina

(Cys)/cistina (CySS) kao redoks kontrolnog čvora (osim GSH i Trx) značajno proširuje redoks opseg. Odnosi redukovano/oksidovano oblika ova tri centralna para (GSH/GSSG; Trx<sub>red</sub>/Trx<sub>ox</sub>; Cys/CySS) strogo su kontrolisani u ćeliji. Njihova funkcija podrazumijeva kontrolu redoks stanja tiola koji se mogu oksidovati (odnos SH/SS ili „prekidači sumpora“) u proteinima. Visok odnos redukovanih i oksidovanih oblika tiola održava se aktivnošću GSH reduktaze i Trx reduktaze. Odnos SH/SS koristi se za održavanje strukture proteina, transporta proteina i za regulaciju enzimske aktivnosti, ćelijske signalizacije, aktivnosti receptora, faktora transkripcije i transporterata. Većina istraživanja redoks signalizacije fokusirana je, s jedne strane, na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i druge ROS kao oksidanse za signalne proteine. S druge strane, istraživanja su usredsređena na oksidaciju bočnih lanaca cisteina i metionina koji sadrže sumpor sa ROS-om, što može dovesti do viših oksidacionih stanja sumpora. Dok  $\cdot\text{OH}$  može izazvati ireverzibilna oštećenja makromolekula sa niskom specifičnošću, glavne mete blagog oksidansa kao što je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> su tiolne grupe ostataka proteina cisteina. U stvari, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>,  $\cdot\text{OH}$  i <sup>1</sup>O<sub>2</sub> nisu sekundarni glasnici jer nemaju specifičnost u interakciji sa efektorima u signalnim putevima. Vodonik peroksid specifično oksiduje tiole što omogućava njegovo funkcionisanje kao sekundarnog glasnika. Shodno tome, signalni enzimi i proteini koji sadrže ostatke cisteina, predloženi su kao potencijalne mete za djelovanje ROS-a. Sumpor iz cisteina u ovim proteinima može biti reverzibilno ili ireverzibilno oksidovan u sulfensku kiselinu (-SOH), sulfinsku kiselinu (-SO<sub>2</sub>H), disulfidnu vezu (-SSR) ili sulfonsku kiselinu (-SO<sub>3</sub>H), a za njih se u početku smatralo da su markeri oksidativnih oštećenja. Formiranje sulfinske i sulfonske kiseline je nepovratno i stoga nisu uključene u signalnu reakciju. Suprotno tome, disulfidne veze i proteinske sulfenske kiseline lako se mogu redukovati sistemima kao što su Trx i Prx i smatraju se posrednicima redoks signalizacije. Prema tome, ROS formirani

u mitohondrijama i citoplazmi utiču na redoks stanje ostataka cisteina u proteinima. Ovo predstavlja regulatorni mehanizam koji određuje konformaciju i funkciju proteina. ROS su, takođe, kritični za uspostavljanje protein-protein interakcija kao i protein-DNK interakcija koje uključuju mnoge aspekte puteva transdukcije signala.

Kao rezultat izloženosti različitim stimulusima, koncentracija intracelularnih ROS povećava se i može dovesti do oksidacije ostataka cisteina u citoplazmatskim proteinima kao što su kinaze i fosfataze, što na kraju utiče na procese transdukcije signala.  $H_2O_2$  može indukovati fosforilaciju tirozinskih ostataka proteina u zavisnosti od regulacije redoks statusa. Ova regulacija određena je sadržajem tiolnih jedinjenja u ćeliji, prije svega sadržajem GSH. Kroz ovaj mehanizam aktivira se nekoliko proteina, posebno kinaza (npr. PTK, protein-tirozin kinaze). Mehanizmima fosforilacije/defosforilacije svoje signale prenose faktor rasta i citokini. Pored toga, fosforilacija/defosforilacija indukuju nizvodne signalne puteve koji uključuju MAPK i fosfoinozitol 3-kinaze (PI3K). Suprotno tome, inhibicija fosfataza posredovana je oksidacijom reaktivnog cisteinskog ostatka u aktivnom centru i inhibicijom njegove katalitičke aktivnosti (npr. proteinske tirozin fosfataze (PTP) sposobne su da defosforilišu PTK). Dakle, fosfataze se direktno oksiduju pomoću ROS-a što dovodi do njihove inhibicije i na kraju do kontinuirane aktivacije signalnih puteva (Slika 15).

Ovakav način signalizacije ima ključnu ulogu u proliferaciji i preživljavanju ćelija kao odgovor na hormon faktor rasta i stimulaciju citokina. Štaviše, ROS može direktno modifikovati aktivaciju ključnih signalnih molekula kao što su faktori transkripcije. Oni djeluju kao sistemi glavnog prekidača (regulatora odnosa SH/SS) u višim organizmima, značajno određujući profil ekspresije gena i ćelijski odgovor na oksidativni stres (Slika 13).



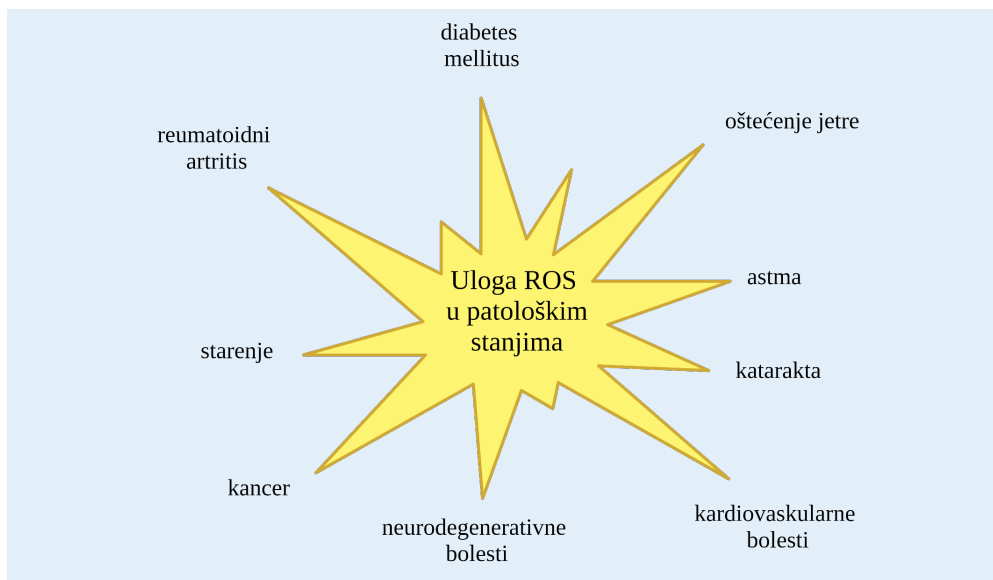
Slika 13. Funkcije ROS-a na fiziološkom nivou (ROS - reaktivne vrste kiseonika; Trx - tioredoksin; Cys/CySS - cistein/cistin; GSH - glutation; PTK - protein tirozin kinaze; MAPK - protein kinaza aktivirana mitogenom; PI3K - fosfoinozimid 3-kinaza; PTP- protein-tirozin fosfataze).  
*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

Druge funkcije ROS-a uključuju učešće u procesima mitoptoze<sup>1</sup> i autofagije. Osim toga, postoji unakrsna signalizacija proizvodnje i uklanjanja ROS-a i na taj način dolazi do pomjeranja redoks ravnoteže iz oksidovanog u redukovano stanje i obrnuto (Checa i Aran, 2020. i reference u okviru rada).

Osim u mitohondrijama i citoplazmi, ROS se, takođe, proizvode u peroksizomima  $\beta$ -oksidacijom masnih kiselina, mikrozomalnim

<sup>1</sup> programirana eliminacija mitohondrija u živim ćelijama i služi za zaštitu ćelija od neispravnog funkcionisanja oštećenih mitohondrija.

citohromom P450 enzimima, metabolizmom ksenobiotika, stimulacijom fagocitoze patogenima ili lipopolisaharidima, metabolizmom arginina i tkivno specifičnim ćelijskim enzimima (Valko i sar., 2007; Phaniendra i sar., 2015). Intracelularna proizvodnja ROS-a i lokalni redoks status važni su za razumijevanje patofiziologije ćelije. Neki subćelijski kompartmani sadrže više oksidovanih oblika (kao što je endoplazmatični retikulum, lizozomi ili peroksizomi), dok drugi (mitohondrije, jedro) sadrže više redukujućih oblika: GSH/GSSG; Trx<sub>red</sub>/Trx<sub>ox</sub>; Cys/CySS. Dakle, nivoi ROS-a mogu da variraju između ćelijskih kompartmana i mogu dovesti do korisnih efekata ili patologije. Povećan nivo ROS-a ima štetne efekte na homeostazu, strukturu i funkciju ćelije i rezultira oksidativnim stresom. Poremećaj ćelijske redoks ravnoteže faktor je rizika za razvoj različitih patoloških stanja, kao što su različite vrste dijabetesa, neurodegenerativne bolesti, kardiovaskularne bolesti, kancer, katarakta, astma, reumatoidni artritis, zapaljenje, opekotine, bolesti crijevnog trakta i ishemijskih i postishemijskih stanja (Slika 14) (Phaniendra i sar., 2015).



Slika 14. Uloga ROS-a u patološkim stanjima u humanoj ćeliji.

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

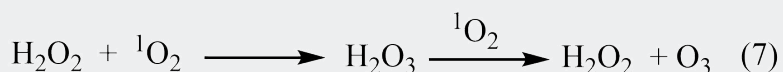
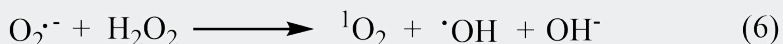
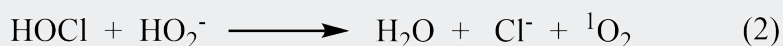
### 1.4.2 Formiranje singletnog kiseonika posredovano leukocitima

Leukociti ili bijela krvna zrnca su krvne ćelije imunog sistema čija je osnovna uloga da štite organizam od mikroorganizama (bakterija, virusa, gljivica i parazita) i stranih tijela koja prolaze kroz prirodne barijere kože i sluzokože. Na osnovu prisustva granula, leukociti se dijele na granulocite i agranulocite. Granule sadrže niz enzima i drugih supstanci sa antimikrobnim dejstvom i imaju ulogu uništavanja i razgradnje mikroorganizama koja bijela krvna zrnca unose u citoplazmu procesom fagocitoze. Postoje tri tipa granulocita: neutrofilni, eozinofilni i bazofilni granulociti. Agranulociti ili mononuklearni leukociti su bijela krvna zrnca koja, pod optičkim mikroskopom, ne sadrže obojene granule u citoplazmi. Ova grupa uključuje limfocite, monocite i makrofage.

Neutrofili, uključujući ljudske neutrofile, proizvode singletni kiseonik koji se koristi za ubijanje bakterija kroz formiranje ozona. Smatra se da proizvodnja singletnog kiseonika od strane neutrofila zavisi od mijeloperoksidaze (MPO) koja katalizuje formiranje hipohlorne kiseline (HOCl) iz  $H_2O_2$  i hloridnih jona (jednačina 1), praćeno reakcijom HOCl sa anjonom vodonik peroksida ( $HO_2^-$ ) (jednačina 2). Međutim, značaj reakcije između  $HO_2^-$  i HOCl u fiziološkim okruženjima kao što je intrafagozomalna sredina, može biti ograničen prisustvom drugih reaktanata za HOCl, odnosno mogu da postoje alternativni putevi generisanja  $^1O_2$  od strane neutrofila, uključujući spontanu dismutaciju  $O_2^-$  (jednačina 3). Utvrđeno je, takođe, da je proizvodnja  $^1O_2$  u posljednjoj reakciji mala (jednačina 3). Peritonealni makrofagi, kojima nedostaje MPO, imaju veću proizvodnju  $^1O_2$  od neutrofila. U fagozomu makrofaga, reakcija između  $NO^*$  i  $O_2^-$  dešava se kontrolisanom brzinom difuzije pri čemu se formira peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) (jednačina 4), koji reaguje sa  $H_2O_2$  i proizvodi  $^1O_2$  (jednačina 5). Reakcija  $NO^*$  sa  $H_2O_2$ , takođe, dovodi do proizvodnje  $^1O_2$  i u sistemu koji generiše  $O_2^-$



(jednačina 6). Eozinofil peroksidaze proizvode  $^1\text{O}_2$  reakcijom između HOBr i  $\text{HO}_2^-$  (jednačina 7) (Onyango, 2016 i reference u okviru rada).

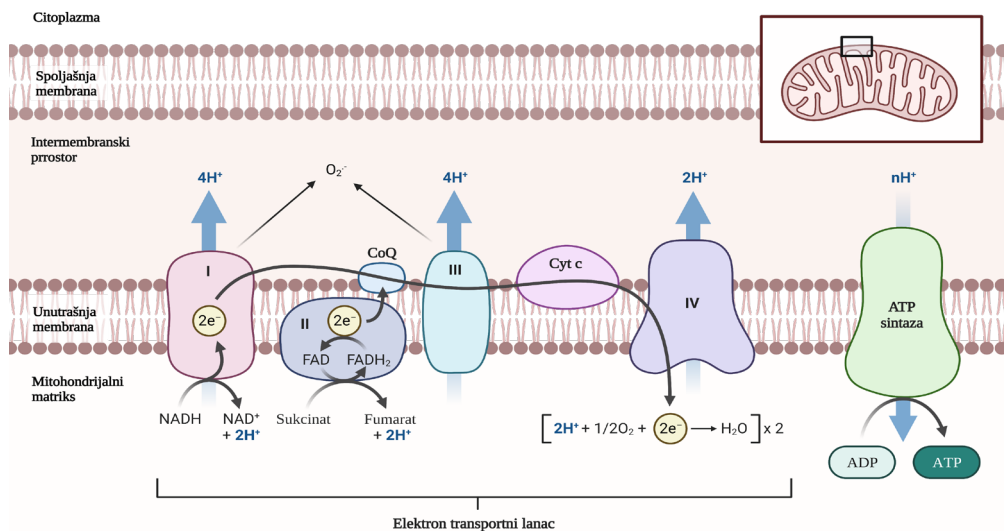


Konzumacija hrane koja je bogata “gasiteljima” (engl. *quencher*s) singletnog kiseonika (karotenoidi, tokoferoli, askorbat) i komponentama s protivupalnim djelovanjem, uključujući probiotike, može dovesti do smanjenja većih koncentracija  $^1\text{O}_2$ .

### 1.4.3 Proizvodnja reaktivnih vrsta kiseonika u mitohondrijama

U aerobnim ćelijama, mitohondrije su neophodne za brojne osnovne funkcije, uključujući disanje i proizvodnju energije, regulaciju intracelularne koncentracije kalcijuma i kontrolu oksidacije masnih kiselina. Dugo vremena, mitohondrije su razmatrane samo zbog svoje uloge u proizvodnji energije. One koriste oko 95%  $\text{O}_2$  ćelije da bi sintetisale energiju oksidacijom hranljivih supstanci i prenosom elektrona na nosače elektrona kao što su  $\text{NAD}^+$ , FMN i FAD. Redukovani oblici  $\text{NAD}^+$ , FMN i FAD, prenose elektrone na komponente respiratornog lanca i konačno na  $\text{O}_2$  kao krajnji akceptor u procesu koji podrazumijeva niz koraka, u kojima se smanjuje potencijalna

energije elektrona i na kraju se oslobađa energija. U proces je uključeno nekoliko redoks centara, velikim dijelom organizovanih u četiri proteinska kompleksa koji su smješteni unutar unutrašnje membrane mitohondrija. Kompleksi I i II prenose elektrone na ubikinon, nosač elektrona rastvorljiv u lipidima i lokalizovan u unutrašnjoj membrani mitohondrija. Sa ubikinona elektroni prolaze kroz Kompleks III, zatim citohrom c (drugi pokretni nosač) i Kompleks IV, do  $O_2$ . Smanjenje potencijalne energije elektrona koristi se za pumpanje protona iz matriksa mitohondrija u intermembranski prostor, čime se uspostavlja protonmotorna sila. Protonmotorna sila vraća protone u matriks kroz ATP sintazu mitohondrija što dovodi do sinteze ATP (Slika 15).



Slika 15. Shema oksidativne fosforilacije na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani animalne/životinjske ćelije sa naznačenim mjestima sinteze ROS-a. Oznake na slici: kompleks I - I, kompleks II - II, kompleks III - III i kompleks IV - IV, CoQ - ubikinon, Cyt c - citohrom c, NADH - redukovani oblik nikotinamid adenin dinukleotida,  $NAD^+$  - oksidovani oblik nikotinamid adenin dinukleotida, FAD - oksidovani oblik flavin adenin dinukleotida,  $FADH_2$  - redukovani oblik flavin adenin dinukleotida, ADP - adenzin difosfat, ATP - adenzin trifosfat.

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

Otkriće da je prenos elektrona u unutrašnjoj membrani mitohondrija povezan sa formiranjem ROS-a sugerisalo je uključenost mitohondrija u degenerativne procese povezane sa mnogim bolestima i starenjem. Primarno generisani ROS u mitohondrijama, jednovalentnom redukcijom su  $O_2^{\cdot-}$  koji se mitohondrijalnom SOD (Mn SOD) prevode u  $H_2O_2$ . Vodonik peroksid može biti detoksikovao pomoću CAT-e ili GPx-e. S druge strane, nastali  $H_2O_2$  može se prevesti u  $\cdot OH$  radikal u Fentonovoj reakciji. Glavna mjesta uključena u proizvodnju ROS-a u mitohondrijama su kompleksi I i III (Quinlan i sar., 2013). Međutim, detektovana je proizvodnja ROS-a koja je zavisna od sukcinata, Kompleksom II iz skeletnih mišića pacova (Quinlan i sar., 2013) i proizvodnja zavisna od glicerol 3-fosfata Kompleksom II iz nekoliko tkiva pacova (Orr i sar., 2012). Do danas, relativni doprinos svakog Kompleksa proizvodnji ROS-a još uvijek je nepoznat, dijelom zbog korišćenja različitih metoda istraživanja, supstrata (Brand, 2010) i izvora mitohondrija (Kwong i Sohal, 1998). Kompleks I i Kompleks III oslobađaju  $O_2^{\cdot-}$  u matriks gdje može da ošteti mitohondrijalnu DNK, dok kompleks III takođe oslobađa  $O_2^{\cdot-}$  ali u intermembranski prostor, gdje nastali  $O_2^{\cdot-}$  lakše može difundovati u citoplazmu (Brand, 2010). Nastali  $O_2^{\cdot-}$  u respiratornom lancu mitohondrija uklanja Mn SOD u mitohondrijalnom matriksu i Cu/Zn SOD u citoplazmi.

#### **1.4.3.1 Druga mitohondrijska mjesta proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika**

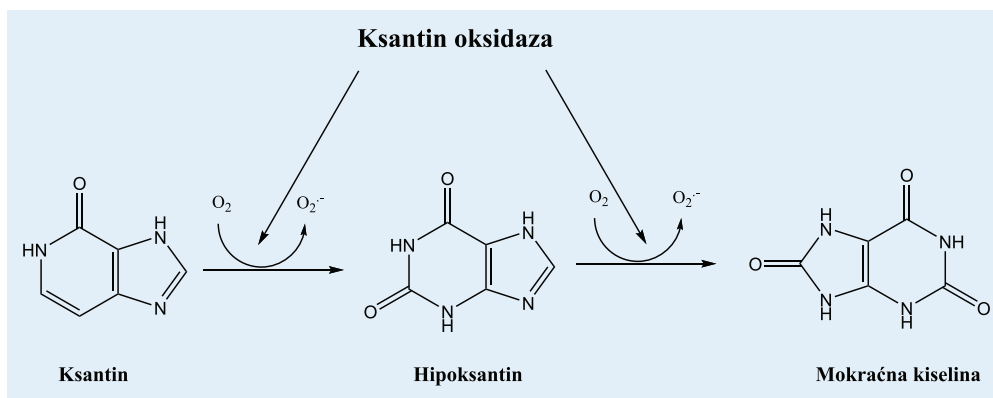
Eksperimenti sa izolovanim enzimima ili mitohondrijama pokazali su da se ROS proizvode od strane nekoliko oksidoreduktaza lokalizovanih u membrani mitohondrija (Andreyev i sar., 2005), čiji je doprinos proizvodnji ROS-a u mitohondrijama još nepoznat. Oksidoreduktaze na membranama mitohondrija su: monoamin oksidaze, koje proizvode  $H_2O_2$  brzinom koja u mitohondrijama mozga može biti veća od onih iz drugih mitohondrijalnih izvora (Hauptmann

i sar., 1996); dihidroorotat dehidrogenaze, koje *in vitro*, u odsustvu koenzima Q, prirodnog akceptora elektrona, mogu da proizvode H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Löffler i sar., 1996);  $\alpha$ -glicerofosfat dehidrogenaze, za koje se navodi da proizvode H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u mitohondrijama miša (Kwong i Sohal, 1998) i pacova (Quinlan i sar., 2013) oksidujući glicerol-3-fosfat; sukcinat dehidrogenaze, koje proizvode ROS kada se izoluju i ugrade u liposome u odsustvu koenzima Q (Zhang i sar., 1998) i kompleks  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaze, za koji je utvrđeno da generiše i O<sub>2</sub><sup>-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u izolovanim mitohondrijama mozga miša (Starkov i sar., 2004).

#### 1.4.4 Citoplazma

Nekoliko ćelijskih komponenti, uključujući tiole, hidrohinoone, kateholamine i flavine, doprinose intracelularnoj proizvodnji O<sub>2</sub><sup>-</sup> jer mogu da učestvuju u redoks reakcijama. Štaviše, nekoliko citoplazmatičnih enzima proizvodi ROS tokom svoje katalitičke aktivnosti. Najviše proučavani enzim koji proizvodi ROS u citoplazmi je ksantin oksidaza (KSO). U zdravim tkivima, ksantin dehidrogenaza (KSDH) je enzim koji katalizuje oksidaciju hipoksantina u ksantin i ksantina u mokraćnu kiselinu pri čemu NADP<sup>+</sup> koristi kao akceptor elektrona. Suprotno tome, u oštećenim tkivima, bilo reverzibilnom oksidacijom ostataka cisteina ili ireverzibilnom Ca<sup>2+</sup>-stimulisanim proteolizom, enzim prelazi iz oblika dehidrogenaze u oblik oksidaze, koji prenosi elektrone na molekularni O<sub>2</sub> proizvodeći O<sub>2</sub><sup>-</sup> tokom oksidacije ksantina ili hipoksantina (McCord, 1988) (Slika 16). Superoksid anjon radikal nastao u citoplazmi uklanja Cu/Zn SOD.

Autooksidacije hemoglobina (Hb) i mioglobina su izvor O<sub>2</sub><sup>-</sup> u fiziološkim uslovima i posebno u stanjima ishemije i reperfuzije (Shikama, 1998; Gunther i sar., 1999; Bonaventura i sar., 2013; Rifkind i sar., 2015). Zbog toga eritrociti sadrže velike količine enzimskih i neenzimskih antioksidanata, pri čemu jednu od najznačajnijih uloga ima Cu/Zn SOD u uklanjanju O<sub>2</sub><sup>-</sup>.



Slika 16. Oksidacija ksantina u hipoksantin i hipoksantina u mokraćnu kiselinu katalizovana hipoksantin oksidazom uz nastanak  $O_2^{\cdot-}$ .

*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

### 1.4.5 Endoplazmatični retikulum

Endoplazmatični retikulum (ER) uključen je u višestruke funkcije, kao što su sinteza, uvijanje i transport proteina do Goldžijevog aparata, lizozoma, transport sekretornih proteina i proteina na ćelijskoj površini, skladištenje kalcijuma, metabolizam lipida i, u nekim tipovima ćelija, detoksikacija lijekova. Glatki ER predstavlja lanac transporta elektrona, koji čine dva sistema posvećena metabolizmu ksenobiotika i uvođenju dvostrukih veza u masne kiseline, koje takođe mogu da proizvode ROS-a (Di Meo i sar., 2016 i reference unutar rada). U uslovima stresa, ER ima ulogu redoks signalizatora čija je ključna uloga u generisanju ROS i regulaciji procesa uvijanja i sekrecije proteina (Zeeshan i sar., 2016). Mikrozomalni citohrom-P450, zavisni sistem monooksigenaze, koji učestvuje u oksidativnom metabolizmu ksenobiotika, jedan je od glavnih proizvođača ROS-a u ćeliji jetre (Cederbaum, 2017).

### 1.4.6 Peroksizomi

Peroksizomi učestvuju u razgradnji  $H_2O_2$  u reakciji katalizovanoj CAT-om. Takođe, u peroksizomima se odvija  $\beta$ - i  $\alpha$ -oksidacija masnih kiselina, metabolizam aminokiselina i glioksalata i sinteza lipidnih jedinjenja. Većina enzima koji katalizuju ove procese, proizvode ROS

tokom svoje aktivnosti. Oko 35%  $H_2O_2$  formiranog u jetri pacova proizvedeno je od strane peroksizomalnih oksidaza (Boveris i sar., 1972). Od ukupne količine vodonik peroksida generisanog unutar peroksizoma, 20–60% lako difunduje kroz peroksizomalnu membranu u okolni medijum. Vodonik peroksid difunduje kroz kanal propustljiv za male rastvorene supstance (Rokka i sar., 2009) iako se  $H_2O_2$  generisan urat oksidazom lokalizovanom u peroksizomima može direktno osloboditi u citoplazmu kroz tubule kristaloidnog jezgra (Fritz i sar., 2007). Uprkos visokom sadržaju katalaze, peroksizomi nisu u stanju da spriječe oslobađanje  $H_2O_2$ . Peroksizomi sadrže ksantin oksidazu (Angermüller i sar., 1987), inducibilni oblik azot oksid sintaze (Stolz i sar., 2002) i enzime koji proizvode  $O_2^{\cdot-}$  i  $NO^{\cdot}$ . Sintetisani  $O_2^{\cdot-}$  i  $NO^{\cdot}$  brzo reaguju formirajući  $ONOO^{\cdot}$  i  $H_2O_2$ , a posljedica može biti generisanje  $^{\cdot}OH$  radikala u Fentonovoj reakciji. Zbog toga peroksizomi predstavljaju i potencijalni izvor visoko reaktivnih kiseoničnih vrsta. Katalaza je glavna oksidoreduktaza odgovorna za metabolizam  $H_2O_2$ . U fiziološkim uslovima, difuzija  $H_2O_2$  iz peroksizoma sprečava se brzom transformacijom  $H_2O_2$  u  $O_2$  u reakciji koju katalizuje CAT. Pošto su, ako se ne kontrolišu, ROS i RNS veoma štetni, peroksizomi, pored katalaze, sadrže i druge antioksidativne enzime kao što su Cu/Zn SOD (SOD1), peroksiredoksin i GST (Fritz i sar., 2007; Fransen i sar., 2012). Međutim, u svjetlu njihove sposobnosti da proizvode reaktivne vrste koje mogu difundovati kroz membrane peroksizoma, kao što su  $H_2O_2$  i  $NO^{\cdot}$ , vrlo je vjerovatno da, u nekim fiziološkim ili patološkim uslovima, peroksizomi mogu djelovati kao izvor  $H_2O_2$  i  $NO^{\cdot}$  u ćelijama (Fritz i sar., 2007; Di Meo, 2016).

#### 1.4.7 Lizozomi

Donedavno su lizozomi smatrani mjestima za terminalnu degradaciju makromolekula. Osim u mitohondrijama, gdje ubikinon ima bioenergetske i patofiziološke funkcije, neobično velika količina

ubikinona detektovana je u lizozomima. Unutrašnjost lizozoma se razlikuje od ostalih organela po niskoj pH vrijednosti koja je važna da bi se obezbijedila optimalna aktivnost hidrolitičkih enzima. Redoks ciklus ubikinona povezan je sa prihvatanjem i oslobađanjem protona, pa se pretpostavlja da je ubikinon dio redoks lanca koji doprinosi jednostranoj distribuciji protona. Lizozomski lanac transporta elektrona, koji učestvuje u regulaciji transporta protona da bi se održao optimalni pH za kisele hidrolaze, učestvuje u stvaranju  $\cdot\text{OH}$  radikala (Nohl i Gille, 2005).

#### **1.4.8 Membranski vezana NADPH oksidaza**

Glavni izvor ROS-a u plazma membranama je NADPH oksidaza vezana za membranu koja proizvodi  $\text{O}_2^{\cdot-}$  koji je odgovoran za ubijanje bakterijskih ćelija (Nohl i Gille, 2005; Rada i Leto, 2008). Proteini NADPH oksidaza jedina su porodica enzima čija je jedina fiziološka funkcija u ćeliji proizvodnja ROS-a (Lambeth i Neish, 2014).

#### **1.4.9 Mikrozomalni citohrom P450 (Cyt P450) enzim**

Glavna uloga mikrozomalnih citohrom P450 monooksigenaznih enzimskih sistema (Cyt P450) je aktivacija molekuskog kiseonika do jedinjenja čija reaktivnost omogućava napad na relativno inertna hemijska mjesta, kao što su neaktivne C-H veze i aromatični prsten. Za razliku od fotosistema II (PSII) koji katalizuje formiranje O-O veze, citohromi P450 (P450), članovi superfamilije hemoproteina, katalizuju cijepanje O-O veze molekula kiseonika, pri čemu unose jedan atom kiseonika u neaktivne ugljovodonike. Katalitički ciklus odvija se u više koraka i podrazumijeva unos dva elektrona sa NADPH-citohrom P450 reduktaze, jedan po jedan, i prenose na  $\text{O}_2$ . Tom prilikom se mogu formirati i osloboditi  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Klaassen i Watkins, 2015). I Cyt P450 i NADPH-citohrom P450 reduktaza su enzimi u membrani mikrozoama (odvojenih od ER-a). ROS se, takođe, proizvode pomoću sistema citohroma P450 koji je uključen u

katabolizam ksenobiotika u endoplazmatičnom retikulumu (Schrader i Fahimi, 2006). Mikrozomalni Cyt P450 jedan je od glavnih proizvođača ROS-a u ćeliji jetre (Stadtman, 1986). Korišćenjem NADPH kao supstrata pokazano je da mikrozomi doprinose proizvodnji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u jetri pacova sa 45% (Boveris i sar., 1972).

## **1.5 Proizvodnja i uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika u različitim organelama biljne ćelije**

Za biljne ćelije, ROS nisu važni samo kao odgovor na spoljašnji stres već je njihova proizvodnja važna i u normalnim fiziološkim uslovima, npr. za izduživanje ćelija, za rast cjevčica polena, rast korijenovih dlačica, polaritet ćelija i formiranje Kasparijevih traka (Castro i sar., 2021). Abiotički i biotički stres dovode do proizvodnje ROS-a u nekoliko različitih subćelijskih kompartmana pri čemu je proizvodnja ROS-a strogo koordinisana i regulisana. Nastajanje ROS-a u različitim organelama može smanjiti štetnu prirodu ROS-a. Akumulacija ROS-a unutar ćelije, uglavnom je posljedica nastanka ROS-a kao nusproizvoda metaboličkih procesa u hloroplastima i mitohondrijama. Biljne eukariotske ćelije razvile su kompleksne mreže signalizacije koje omogućavaju hloroplastima i mitohondrijama da regulišu ekspresiju gena u jedru (retrogradna signalizacija). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz hloroplasta i mitohondrija djeluje kao retrogradni signal tako što interreaguje sa faktorima transkripcije koji utiču na ekspresiju gena u jedru. ROS, koje su nastali u hloroplastima, djeluju kao senzori promjena u okolini jer regulišu ćelijsku komunikaciju i ekspresiju gena. Prijem signala posredovanih ROS-om ne funkcioniše na način receptor-ligand već je prijem signala putem redoks modifikacije, što rezultira promjenom u strukturi proteina, u lokalizaciji, aktivnosti i protein-protein interakcijama. Glavni mehanizam za prenos ROS signala je oksidacija cisteina. Osim cisteina, oksidacija metionina i tirozina može biti način prenošenja signala putem ROS-a (Castro i sar., 2021).



### 1.5.1 Hloroplasti

Proizvodnja ROS-a u hloroplastima je povezana sa procesom fotosinteze. Jedinstvena za hloroplaste je proizvodnja singlet kiseonika,  $^1\text{O}_2$ , visokoreaktivnog neradikalskog ROS-a. Singletno stanje kiseonika nastaje unutar tilakoidnih membrana, uglavnom prenosom energije sa ekscitovanog tripletnog stanja hlorofila ( $^3\text{Chl}^*$ ) u fotosistemu II (PS II) na osnovno stanje molekulskog kiseonika ( $^3\text{O}_2$ ) (Waszczak i sar., 2018). Nema enzimskog sistema za uklanjanje singlet kiseonika. Uklanjanje  $^1\text{O}_2$  odvija se kroz reakcije sa karotenoidima, tokoferolima i membranskim lipidima. Proizvodi razgradnje  $\beta$ -karotena indukovani  $^1\text{O}_2$ , uključeni su u retrogradnu signalizaciju hloroplasta (Waszczak i sar., 2018). Redukcijom kiseonika sa jednim elektronom na fotosistemu I (PSI), dolazi do nastanka umjereno reaktivnog superoksid anjon radikala. Superoksid anjon radikal se dismutacijom prevodi do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na stromalnoj strani tilakoidne membrane, spontano ili enzimski, u reakciji koju katalizuje superoksid dismutaza. U hloroplastima su dvije SOD izoforme, FeSOD i Cu/ZnSOD. U stromi hloroplasta,  $\text{H}_2\text{O}_2$  uklanja se u reakcijama koje katalizuju APX i peroksiredoksini. Peroksiredoksini koriste katalitički mehanizam zasnovan na oksidaciji/redukciji tiola za redukciju  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Regeneracija Prxs može se odvijati pomoću TRX, glutaredoksina (GRX) i tioredoksin reduktaze zavisne od NADPH. Nastanak  $\text{H}_2\text{O}_2$  fotorespiracijom i posljedične promjene u aktivnostima i koncentraciji antioksidanata hloroplasta, prepoznate su kao parametri koji ukazuju na uticaje iz spoljašnje okoline. Ti uticaji dovode do promjena u ekspresiji u jedru usljed retrogradne signalizacije.

### 1.5.2 Mitohondrije

U fotosintetskim tkivima, doprinos mitohondrija ukupnoj ćelijskoj proizvodnji ROS-a relativno je nizak, ali promjene redoks ravnoteže u mitohondrijama mogu biti odraz uticaja spoljašnje sredine na biljke. Proizvodnja ROS-a u mitohondrijama usko je povezana sa

elektron transportnim lancem u unutrašnjoj membrani mitohondrija. Kompleksi I, II i III u mitohondrijama glavni su izvori  $O_2^{\cdot -}$ , pri čemu je doprinos pojedinačnih kompleksa teško procijeniti. Kompleksi I i II proizvode  $O_2^{\cdot -}$  na matriksnoj strani unutrašnje mitohondrijalne membrane. U životinjskim mitohondrijima, Kompleks III proizvodi  $O_2^{\cdot -}$  s obje strane unurašnje membrane mitohondrija pa se zbog sličnosti sa životinjskim Kompleksom III može pretpostaviti da se i kod biljaka proizvodnja  $O_2^{\cdot -}$  odvija sa obje strane unutrašnje membrane mitohondrija. ROS bi u međumembranskom prostoru mogao imati signalnu funkciju kod biljaka sličnu kao kod životinja (Bleier i Dröse, 2013; Waszczak i sar., 2018). Zbog propusnosti spoljašnje membrane mitohondrija, nastali ROS se iz međumembranskog prostora mitohondrija mogu difundovati u citoplazmu i biti uklonjeni djelovanjem antioksidativnog sistema citoplazme. Poslednji korak biosinteze askorbata odvija se u međumembranskom prostoru mitohondrija i nastali  $O_2^{\cdot -}$  može se direktno ukloniti sa AsA. Na taj način, može se promijeniti redoks stanje AsA i tako promijenjeno djelovati kao signal. U matriksu mitohondrija,  $O_2^{\cdot -}$  se dismutira do  $H_2O_2$ , spontano ili u reakciji, koju katalizuje MnSOD.  $H_2O_2$  se uklanja djelovanjem peroksiredoksina, APX-a i preko askorbat-glutation ciklusa.

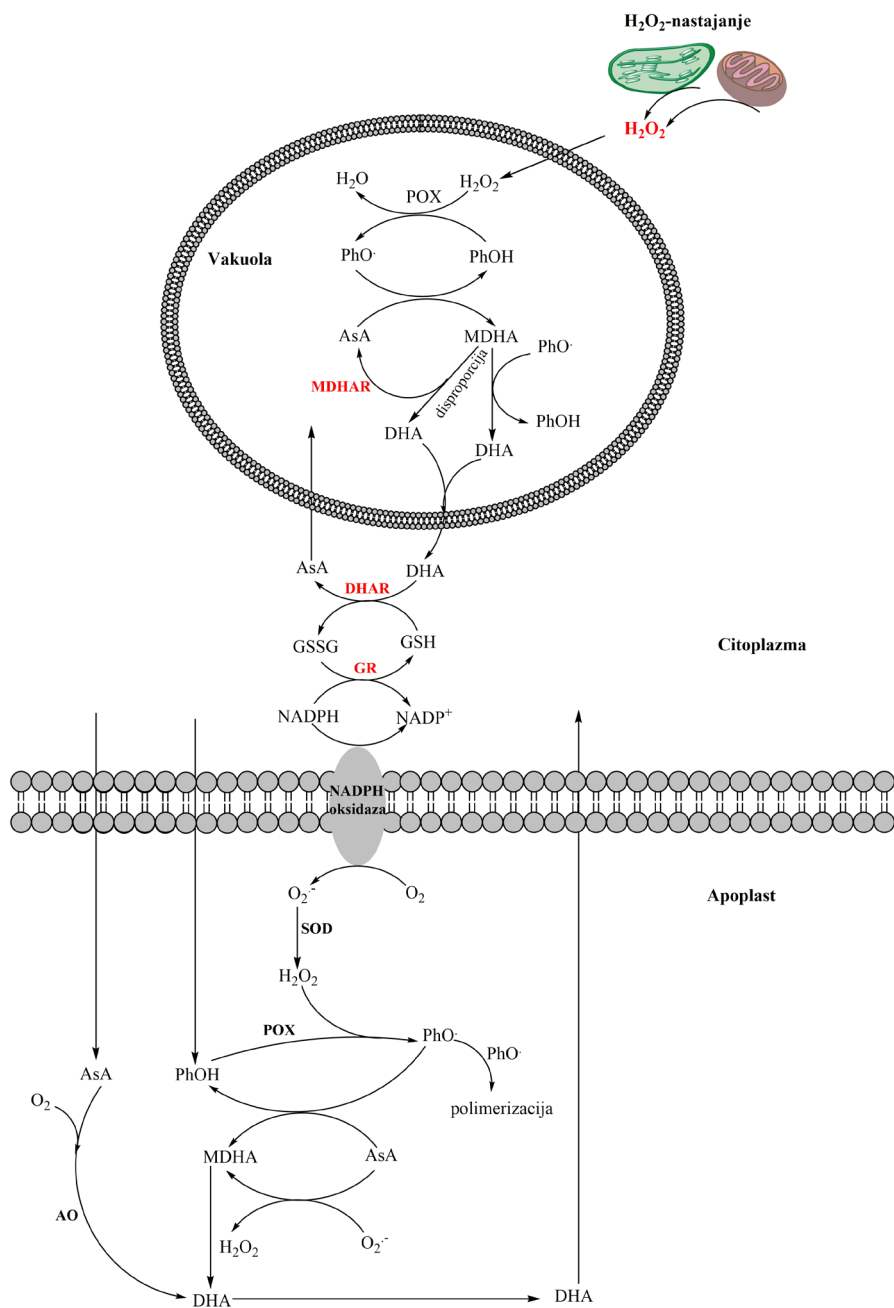
### 1.5.3 Peroksizomi

Pri koncentracijama  $CO_2$  koje su danas u atmosferi, značajna je oksigenazna aktivost Rubisc-a pri kojoj nastaju 2-fosfoglikolat i 3-fosfoglicerat. Nastali 2-fosfoglikolat metabolizira se do glikolata, koji se zatim transportuje do peroksizoma, gdje se u reakciji koju katalizuje glikolat-oksidaza prevodi do glioksalata uz nastanak  $H_2O_2$ . U fotosintetski aktivnim tkivima, proizvodnja ROS-a u peroksizomima je usko povezana sa fotosintezom i odgovorna je za većinu generisanih ROS-a. Međutim, pošto peroksizomi imaju snažan sistem za uklanjanje  $H_2O_2$ , protok kroz proces fotorespiracije ( oksigenazna aktivnost Rubisc-a) ne znači nužno povećanje koncentracije  $H_2O_2$ .

Katalaze su glavne antioksidativne komponente za uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u peroksizomima. Iako CAT ima nizak afinitet za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ona efikasno uklanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nastao u procesu fotorespiracije i na taj način može se zadržati koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ispod 10 μM. Postojanje peroksizomalnih APX i enzima AsA-GSH pokazano je za više biljnih vrsta, ali je njihov doprinos uklanjanju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relativno nizak.

#### 1.5.4 Apoplast

Apoplast je prostor između biljnih ćelija, uključujući i ćelijske zidove, preko kojih se odvija razmjena hranjivih supstanci i signala između biljnih ćelija i spoljašnje sredine. Biljke često reaguju na promjene u spoljašnjoj sredini i na endogene nadražaje povećanjem koncentracije ROS-a u apoplastu. Proizvodnja ROS-a u apoplastu odvija se posredstvom enzima kao što su peroksidaze klase III, poliaminooksidaze (PAO) i NADPH oksidaze lokalizovane na plazma membrani (Waszczak i sar., 2018). PAO katalizuju razgradnju spermidina i spermina uz proizvodnju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji ima ulogu u odgovoru na abiotički i biotički stres, kao i u razvoju biljaka. NADPH oksidaze, najvažnija klasa proizvođača ROS-a u apoplastu, katalizuju prenos elektrona kroz plazma membranu, od citoplazmatičkog NADPH do molekuskog kiseonika, pri čemu nastaje O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. EPR spektroskopijom je pokazano da plazma membrane korijena kukuruza imaju sposobnost proizvodnje superoksid anjon radikala i hidroksil radikala *in vitro* (Mojović i sar., 2004). Takođe, hidroksil radikal proizvodi se u ćelijskom zidu djelovanjem POX-a ili neenzimskom reakcijom između fenolnih jedinjenja i metala (Fe, fenton tip reakcije) (Yim i sar., 1993; Kukavica i sar., 2009; Veljović-Jovanović i sar., 2018). U antioksidativne aktivnosti u apoplastu uključeni su: SOD, POX, enzimi AsA-GSH ciklusa, askorbat, fenolna jedinjenja (Kukavica i sar., 2009; Veljović-Jovanović i sar., 2018; Garcia i sar., 2020). Međusobna „saradnja“ ćelijskih kompartmana biljne ćelije u uklanjanju ROS-a prikazana je na Slici 17.



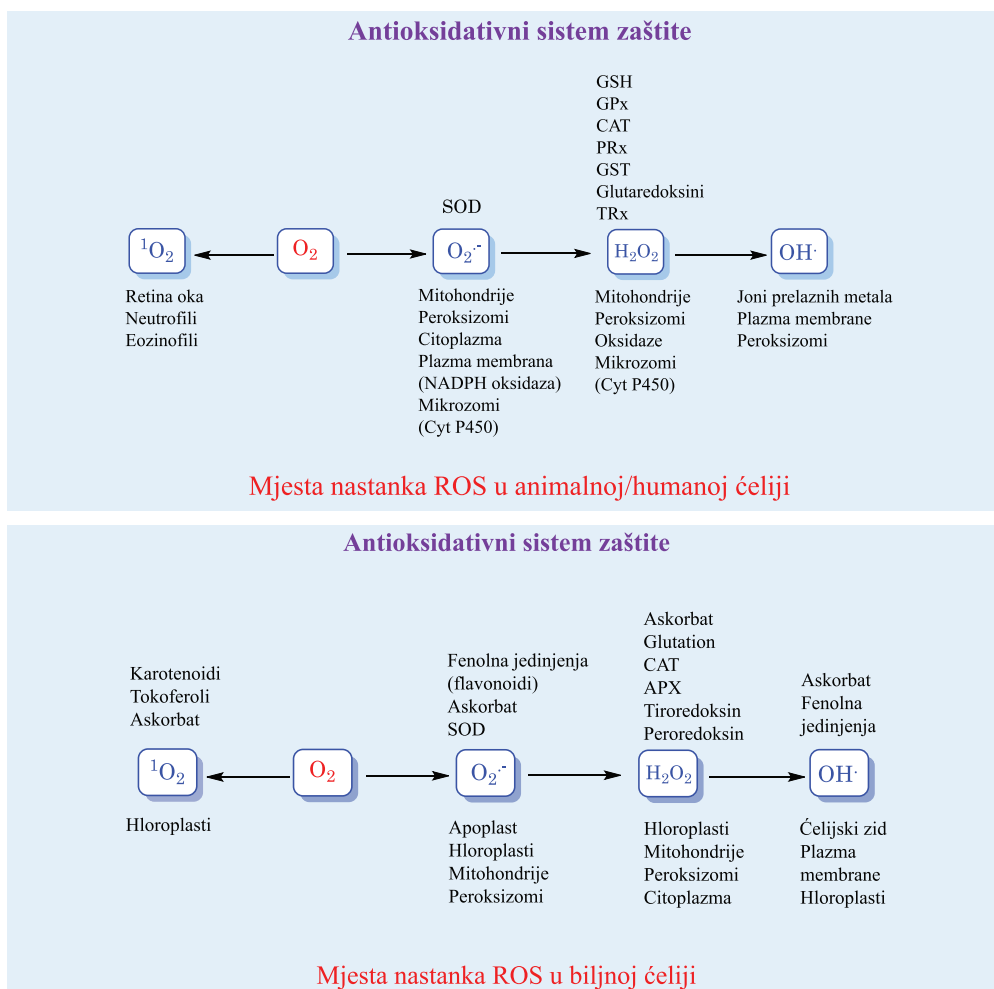
Slika 17. Šematski prikaz mehanizma za uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji uključuje vakuolu i apoplast pomoću POX/PhOH/AsA sistema. Skraćenice: POX - peroksidaze klase III, PhOH - fenolna jedinjenja, DHAR - dehidroaskorbatreduktaza, GR - glutation reduktaza, SOD - superoksid dismutaza, AO - askorbatoksidaza (Veljović-Jovanović i sar., 2018).

Kreirano u ChemDraw Professional 15.

Uklanjanje  $H_2O_2$  nastalog u hloroplastima i mitohondrijama može se odvijati u vakuoli sistemom POX/PhOH/AsA, pri čemu se regeneracija askorbata odvija preko askorbat-glutation ciklusa u citoplazmi (Takahama, 1992; 1993; 2004; Veljović-Jovanović, 2018). U vakuoli, fenoksi radikali nastali u peroksidaznoj reakciji redukuju se uz pomoću AsA i nastaje MDHA (Slika 17). Nastali MDHA se enzimski, uz pomoć MDHAR i/ili neenzimskom disproportcijom, prevodi do DHA. DHA se transportuje u citoplazmu i regeneriše do AsA preko reakcija askorbat-glutation ciklusa. U apoplastu,  $H_2O_2$  nastao djelovanjem SOD-a (na plazma membranama ili u ćelijskom zidu) uklanja se djelovanjem POX-a uz oksidaciju fenolnih jedinjenja do fenoksi radikala. Fenoksi radikali reaguju sa askorbatom, regenerišu se do fenolnih jedinjenja, a askorbat se oksiduje do DHA. Iz apoplasta se DHA transportuje do citoplazme i u askorbat-glutation ciklusu regeneriše do askorbata (Slika 17). Fenolna jedinjenja se transportuju u vakuolu konjugovana sa GSH, esterifikovana malonom ili glikozilovana. Detektovani su specifični transporteri za prenos fenolnih jedinjenja u unutrašnjost vakuole, pri čemu postoji specifičnost prema određenim supstratima. Tako su npr. kamferol, kvercetin i indol alkaloidi detektovani u vakuolama dok je prisustvo ferulične kiseline i koniferil aldehida dokazano u apoplastu. Takođe, pokazan je transport različitim transporterima AsA i DHA kroz ćelijske membrane (Vidović i sar., 2017; Veljović-Jovanović i sar., 2018 i reference u okviru citiranih radova). Lokalizacija AsA u apoplastu i vakuolama, s jedne strane, a sa druge strane odsustvo GSH u apoplastu i vrlo niska koncentracija oksidovanog glutaciona u vakuoli ( $<0,03$  mM;  $<10\%$ ) (Noctor i Foyer 2016; Veljović-Jovanović i sar., 2018), ukazuju na to da je askorbat glavni reduktant uključen u POX/PhOH/AsA sistem koji je predložio Takahama (2004). U vakuolama je AsA, uglavnom, u redukovanom obliku (koncentracija 2 mM) (Ferrerres i sar., 2011). Sa druge strane AsA u apoplastu najčešće

je prisutan u oksidovanom, DHA obliku. U apoplastu, AsA ima važnu ulogu u rastu i razvoju biljaka, odbrani od patogena, različitih vrsta abiotičkog stresa i uključen je u redoks regulaciju antioksidanata (Veljović-Jovanović i sar., 2018).

Iz prethodno navedenog, jasno je da reaktivne vrste kiseonika nastaju u skoro svim kompartmanima biljne i animalne ćelije. Da bi regulisale proizvodnju ROS-a ćelije su razvile efikasan AOS, čije su komponente raspoređene u svim kompartmanima biljne ćelije (Slika 18).



Slika 18. Mjesta nastanka ROS u animalnoj/humanoj i biljnoj ćeliji i antioksidativni sistem zaštite (AOS, enzimske i neenzimske komponente) koje ih uklanjaju.

*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

## 2. UTICAJ TOKSIČNIH SUPSTANCI NA ANIMALNE (HUMANE) I BILJNE ĆELIJE

### 2.1 Definicija toksikologije

Toksikologija je grana biohemije koja se bavi proučavanjem štetnih efekata toksičnih supstanci na žive organizme. U užem smislu toksikologija se bavi ispitivanjem prirode efekata toksičnih supstanci na žive organizme i procjenom vjerovatnoće nastanka štetnih efekata. Takođe, u fokusu toksikologije je karakterizacija odnosa izloženosti (ili doze) toksičnih supstanci i odgovora živih organizama.

### 2.2 Oblasti toksikologije

Iz velike raznovrsnosti i brojnosti toksičnih supstanci proističe ogroman broj i raznolikost potencijalno štetnih efekata, što često zahtijeva specijalizaciju u oblasti toksikologije. Specijalizovane grane toksikologije koje se bave tim potencijalno štetnim efektima su: mehanistička toksikologija, deskriptivna toksikologija, toksikogenomika, regulatorna toksikologija, forenzička toksikologija, klinička toksikologija, toksikologija životne sredine, ekotoksikologija, razvojna toksikologija, teratologija i reproduktivna toksikologija.

**Mehanistička toksikologija** ispituje ćelijske, biohemijske i molekularne mehanizme efekata toksičnih supstanci na žive organizme. Mehanistički podaci mogu se iskoristiti u dizajniranju i proizvodnji hemikalija sa smanjenim toksičnim efektima, kao i u terapiji i liječenju nakon izloženosti toksičnim supstancama. Podaci koje daje mehanistička toksikologija mogu biti veoma korisni u procjeni rizika tj. u dokazivanju da neželjeni efekti pokazani za određenu toksičnu supstancu na laboratorijskim životinjama mogu biti štetni i za ljude.

**Deskriptivna toksikologija** ispituje toksičnost supstanci i osigurava bezbjednosnu procjenu i regulatorne zahtjeve. Testovi

toksičnosti na osnovu kojih se ispituje uticaj različitih supstanci na eksperimentalne životinje, dizajniraju se tako da daju informacije koje se mogu koristiti za procjenu rizičnog uticaja datih supstanci na ljude i životnu sredinu.

**Toksikogenomika** se bavi primjenom genomskih, transkriptomskih, proteomskih i metabolomskih tehnologija za identifikaciju deskriptivnih i mehanističkih informacija o toksičnim supstancama. Podaci dobijeni toksikogenomikom mogu zaštititi pojedince podložne genetskim promjenama, koje mogu biti uzrokovane štetnim djelovanjima iz životne sredine, i omogućiti prilagođavanje terapije lijekovima na osnovu njihovih individualnih genetskih karakteristika. Brojni genetski testovi mogu identifikovati osjetljive osobe prije farmakološkog liječenja.

**Regulatorna toksikologija**, na osnovu podataka koje daju deskriptivna i mehanistička toksikologija, donosi odluke i preporuke da li lijekovi ili druge supstance predstavljaju dovoljno nizak rizik da se mogu koristiti na tržištu ili za navedenu svrhu. Toksikolozi koji se bave regulatornom toksikologijom uključeni su u uspostavljanje standarda i donošenje propisa koji regulišu količine supstanci dozvoljenih u hrani, lijekovima, vazduhu, industrijskoj atmosferi i vodi za piće.

**Forenzička toksikologija** je spoj analitičke hemije i fundamentalnih toksikoloških principa koja se prvenstveno fokusira na medicinsko-pravne aspekte toksičnih efekata supstanci na ljude i životinje. Predmet istraživanja **kliničke toksikologije** su bolesti uzrokovane ili povezane sa toksičnim supstancama.

**Toksikologija životne sredine** bavi se ispitivanjem uticaja hemijskih zagađivača na biološke organizme u životnoj sredini, sa posebnim fokusom na ispitivanje uticaja supstanci na organizme kao što su ribe, ptice, kopnene životinje i biljke.

**Ekotoksikologija** je specijalizovana oblast u okviru toksikologije



životne sredine, koja se bavi ispitivanjem uticaja toksičnih supstanci na dinamiku populacija u ekosistemima.

**Razvojna toksikologija** se bavi ispitivanjem uticaja štetnih efekata na organizam u razvoju. Ti uticaji mogu biti posljedica izlaganja hemijskim ili fizičkim agensima prije začeća (izlaganjem roditelja), tokom prenatalnog razvoja ili postnatalno do vremena puberteta.

**Teratologija** je dio toksikologije koja se bavi ispitivanjima oštećenja izazvanih tokom razvoja organizma u periodu između začeća i rođenja.

**Reproduktivna toksikologija** proučava pojave nastale usljed štetnih uticaja na muški ili ženski reproduktivni sistem, a ti uticaji mogu biti posljedica izlaganja hemijskim ili fizičkim agensima.

## 2.3 Toksične supstance

Toksične supstance mogu se klasifikovati na različite načine u zavisnosti od njihovih ciljnih organa, upotrebe, izvora i efekata. Termin toksin uglavnom se odnosi na toksične supstance koje proizvode biološki sistemi kao što su biljke, životinje, gljive ili bakterije. Termin otrov se koristi kada se govori o toksičnim supstancama koje nastaju ili su nusproizvod ljudskih aktivnosti.

„Sve supstance su otrovi; nema nijedne koja nije otrov. Prava doza razlikuje otrov od lijeka” (Paracelzus, 1493–1541). Toksične supstance su supstance koje kod živih organizama mogu dovesti do štetnih efekata (bolest, disfunkcija organa ili smrt). Mogu biti ksenobiotici - egzogene supstance, strane za organizam, i endogene supstance – toksične u velikim koncentracijama (na primjer, selen). Toksične supstance (otrovi) su supstance koje dovode do reverzibilnih i ireverzibilnih promjena normalnih fizioloških procesa i reakcija (Slika 19).

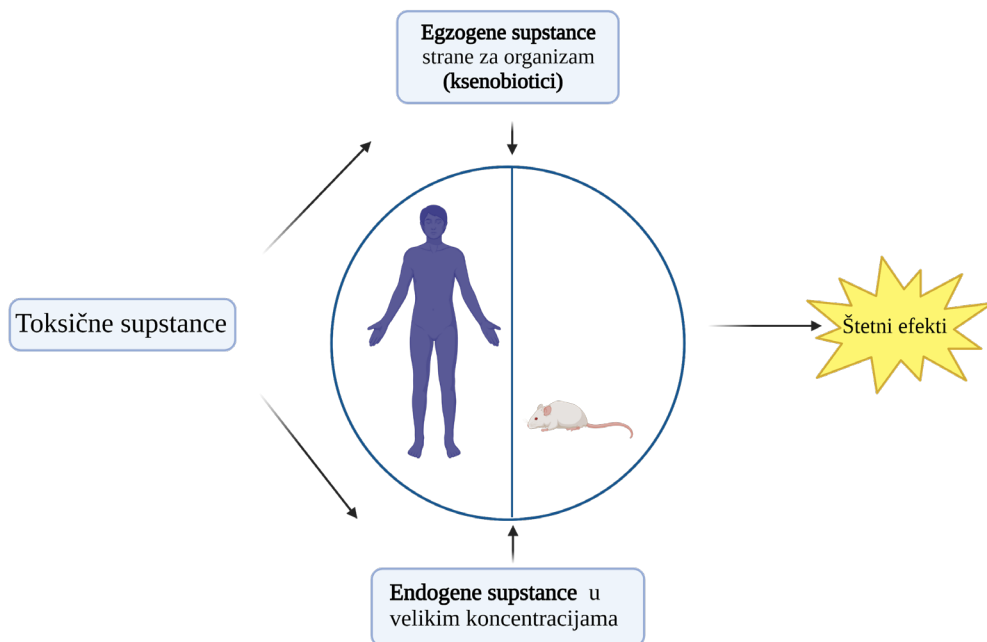
Toksičnost supstance određena je: hemijskom strukturom (struktura utiče na aktivnost toksične supstance) i fizičkim osobinama. Takođe, na toksičnost supstance utiče doza ili koncentracija toksične

supstance koja je određena količinom supstance, putevima ulaska u organizam i trajanjem i frekvencijom ekspozicije. Odgovor „domaćina“ (homeostaza) zavisi od životne dobi, pola, individualnih kao i genetskih razlika. „Osjetljivost pojedinca razlikuje otrov od lijeka. Osnovni princip toksikologije je odgovor pojedinca na dozu” (Gilbert, 2020). Na toksičnost utiču sinergistički efekti toksičnih supstanci kada se kombinuju i zajednički djeluju na organizam. Takođe temperatura utiče na toksičnost jer djeluje na pokretljivost toksičnih supstanci kao i na sam organizam (Slika 20).

Toksične supstance se mogu klasifikovati na različite načine: prema fizičkom stanju, hemijskoj stabilnosti ili reaktivnosti, hemijskoj strukturi ili potencijalu trovanja, prema ciljnom organu, fiziološkom djelovanju (npr. hepatotoksin, neurotoksin, hematotoksin i nefrotoksin) i prema upotrebi (npr. pesticidi, rastvarači, lijekovi). Prema izvoru, toksične supstance se dijele na prirodne (fitotoksini, zootoksini, bakterijski toksini i mikotoksini) i sintetičke, kao i na one sa posebnim efektima (karcinogeni, mutageni). Nijedna klasifikacija nije primjenljiva na sve toksične supstance i stoga je potrebna kombinacija klasifikacija da bi se obezbijedila najbolja karakterizacija toksične supstance.

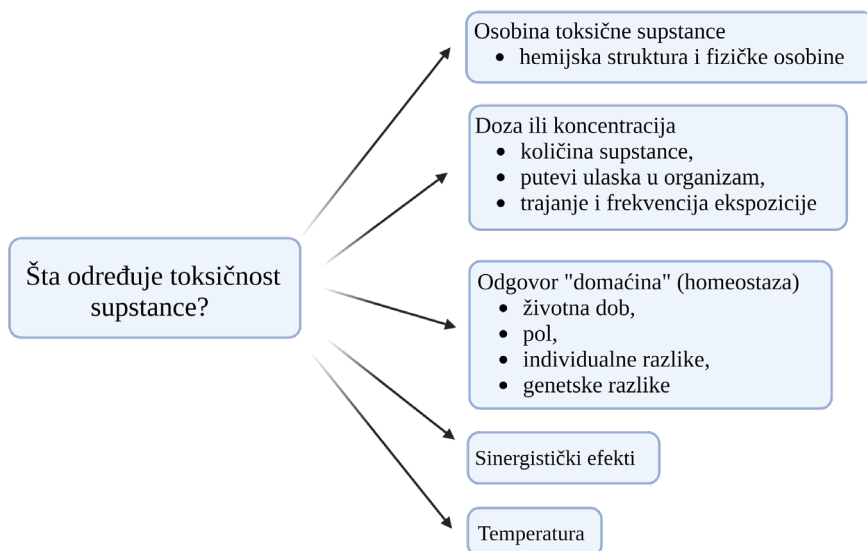
Različite hemijske supstance mogu biti toksične. Toksične supstance se, uzimajući u obzir različite kriterijume za klasifikaciju, mogu podijeliti na:

- metale: Pb, Hg, Cd, Mn, Cr, Zn, Al, Cu;
- organske rastvarače: benzen, toluen, ksilen, stiren, CHCl<sub>3</sub>, CCl<sub>4</sub>, CS<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>OH, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, fenol;
- gasove: CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, HCN, NH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>, N-oksidi;
- pesticide: insekticidi, fungicidi, herbicidi;
- lijekove i
- aditive hrane: konzervansi, antioksidanti, boje, zaslađivači, emulgatori.



Slika 19. Toksični uticaj endogenih i egzogenih supstanci na humane i animalne organizme.

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*



Slika 20. Faktori koji utiču na toksičnost supstanci.

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

## 2.4 Definicija toksičnosti

Svaka supstanca može da izazove povredu ili čak da dovede do smrti ako je prisutna u dovoljnoj količini (koncentraciji, dozi). Doza je količina toksične supstance unijeta u organizam, izražena u mg/kg tjelesne mase. Različite toksične supstance imaju različite LD<sub>50</sub> (smrtonosna doza 50, engl. *lethal dose* LD<sub>50</sub>). U Tabeli 2, navedena je klasifikacija toksičnih supstanci prema LD<sub>50</sub>.

**Tabela 2. Klasifikaciji toksičnih supstanci prema LD<sub>50</sub> (mg/kg)\*.**

Toksičnost	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
praktično netoksični	> 15000
slabo toksični	5000 – 15000
neznatno toksični	500 – 5000
srednje toksični	50 – 500
veoma toksični	5 – 50
ekstremno toksični	< 5

\*LD<sub>50</sub> je doza supstanci (mg/kg tjelesne težine) koja uzrokuje smrt kod 50% izloženih životinja.

Toksične supstance koje izazivaju smrt u mikrogramskim dozama često se smatraju izuzetno otrovnim. Tabela 3 prikazuje širok spektar doza potrebnih za smrt kod 50% tretiranih životinja. Koncentracije toksične supstance koja dovodi do akutne smrtnosti (kao što je LD<sub>50</sub>), nekad ne odražavaju sveukupnu toksičnosti ili opasnost povezanu sa izlaganjem određenoj toksičnoj supstanci. Na primjer, neke toksične supstance sa niskom akutnom toksičnošću mogu imati karcinogene ili teratogene efekte u dozama koje su niže od LD<sub>50</sub>. Za datu toksičnu supstancu, svaki od različitih efekata koji se mogu javiti u datom organizmu, mogu imati svoj odnos doza-odgovor, odnosno, različite koncentracije mogu izazvati različite odgovore.

**Tabela 3. Približna akutna LD50 vrijednost nekih supstanci sveprisutnih u životnoj sredini.**

<b>Supstanca</b>	<b>LD50 (mg/kg)</b>
Etanol	10 000
NaCl	4 000
FeSO <sub>4</sub>	1 500
Morfin sulfat	900
Natrijum fenobarbital	150
Pikrotoksin	5
Strihnin sulfat	2
Nikotin	1
Tubokurarin	0,5
Hemiholinijum-3	0,2
Tetrodotoksin	0,10
Dioksin	0,001
Botulinum toksin	0,00001

## **2.5 Efekti toksičnih supstanci**

Efekti toksičnih supstanci na organizam mogu biti neposredni i odloženi. Neposredni toksični efekti javljaju se ili razvijaju brzo nakon jedne primjene toksične supstance ili izloženosti organizma toksičnoj supstanci, dok odloženi toksični efekti nastaju nakon nekog vremena. Većina toksičnih supstanci u kontaktu sa organizmima dovodi do trenutnih toksičnih efekata. Međutim, karcinogeni efekti toksičnih supstanci obično imaju duge periode latencije. Prije nego što se tumor uoči kod ljudi često prođe 20-30 godina, od inicijalne izloženosti. Toksični efekti na organizam mogu biti reverzibilni ili ireverzibilni. Ako toksična supstanca indukuje patološku povredu tkiva, sposobnost

tog tkiva da se regeneriše, u velikoj mjeri određuje da li je efekat reverzibilan ili ireverzibilan. Tkivo jetre ima visoku sposobnost regeneracije i većina povreda je stoga reverzibilna. Međutim, povrede centralnog nervnog sistema (CNS) uglavnom su ireverzibilne, jer su ćelije CNS-a diferencirane i ne mogu se obnavljati. Karcinogeni i teratogeni efekti toksičnih supstanci, kada se pojave, obično se smatraju ireverzibilnim toksičnim efektima. Toksične supstance mogu se razlikovati i po mjestu djelovanja na organizam. Lokalni efekti se javljaju na mjestu prvog kontakta između toksične supstance i organizma. Nasuprot tome, sistemski efekti toksičnih supstanci podrazumijevaju njenu apsorpciju i distribuciju od mjesta ulaska u organizam do mjesta u organizmu, gdje nastaju štetni efekti. Uglavnom toksične supstance, osim ako nisu visoko reaktivne, u kontaktu sa organizmom indukuju sistemske efekte, dok neke toksične supstance indukuju i lokalni i sistemski odgovor.

Većina toksičnih supstanci koje dovode do sistemske toksičnosti, najveću toksičnost obično ispoljavaju u jednom ili dva organa, koji se nazivaju ciljnim organima toksičnosti. Paradoksalno, ciljni organ toksičnosti često nije mjesto najveće koncentracije toksične supstance u organizmu. Ciljni organi, po redoslijedu učestalosti uključivanja u sistemsku toksičnost su: CNS, kardiovaskularni sistem, krv i hematopoetski sistem, unutrašnji organi kao što su jetra, bubrezi i pluća i koža. Mišići i kosti rijetko su ciljna tkiva za sistemske efekte.

Odgovor organizma na određenu toksičnu supstancu može biti genetski uslovljena. Hemijska specifičnost se odnosi na genetski uslovljenu preosjetljivost/neosjetljivost organizma na određenu toksičnu supstancu. Odgovor na ovakve toksične supstance je obično kvalitativno sličan odgovoru svih organizama, ali može imati oblik ekstremne osjetljivosti na male doze ili ekstremne neosjetljivosti na visoke doze toksičnih supstanci. Hemijska alergija je imunološki

posredovana neželjena reakcija organizma na toksičnu supstancu koja je rezultat prethodne senzibilizacije (preosjetljivosti) na tu ili sličnu supstancu. Kada dođe do senzibilizacije, alergijske reakcije mogu biti rezultat izlaganja relativno malim dozama toksičnih supstanci. Alergijske reakcije su zavisne od doze i ponekad mogu biti veoma ozbiljne i fatalne.

## 2.6 Interakcije toksičnih supstanci

Hemijske interakcije toksičnih supstanci mogu se ostvariti različitim mehanizama kao što su promjene u apsorpciji, vezivanjem za proteine, biotransformacija i izlučivanje jedne ili obje toksične supstance. Pored ovih načina interakcije, odgovor organizma na kombinacije toksičnih supstanci može biti povećan ili smanjen zbog toksikoloških odgovora organizma na mjestu djelovanja toksičnih supstanci. Do aditivnog efekta toksičnih supstanci najčešće dolazi kada se dvije toksične supstance daju zajedno. Aditivni efekat toksičnih supstanci na organizam odnosi se na činjenicu da je kombinovani efekat dvije toksične supstance jednak zbiru efekata svake toksične supstance pojedinačno. Matematički bi se aditivni efekat toksičnih supstanci mogao predstaviti na sljedeći način:  $2 (I) + 3 (II) = 5 (KE)$ , pri čemu je 2 toksični efekat toksične supstance I, 3 toksični efekat supstance II i 5 kombinovani efekat (KE) dvije toksične supstance koji je kod aditivnog efekta jednak zbiru efekata dvije toksične supstance. Sinergistički efekat se javlja kada je kombinovani efekat dvije toksične supstance mnogo veći od zbira efekata dvije toksične supstance (I i II) što se matematički može napisati:  $2 (I) + 2 (II) = 20 (KE)$ . Potenciranje toksičnog efekta dešava se kada jedna toksična supstanca nema toksično dejstvo na određeni organ ili sistem, ali dodata drugoj toksičnoj supstanci čini tu toksičnu supstancu mnogo toksičnijom (na primjer:  $0 (I) + 2 (II) = 10 (KE)$ ). Antagonizam djelovanja javlja se kada dvije toksične supstance koje

se daju zajedno, ometaju djelovanje jedna druge ili jedna ometa djelovanje druge, što se matematički može predstaviti na sljedeće načine:  $4 \text{ (I)} + 6 \text{ (II)} = 8 \text{ (KE)}$ ;  $4 \text{ (I)} + (-4) \text{ (II)} = 0 \text{ (KE)}$ ;  $4 \text{ (I)} + 0 \text{ (II)} = 1 \text{ (KE)}$ . Možemo razlikovati četiri glavna tipa antagonizma u djelovanju toksičnih supstanci: funkcionalni, hemijski, dispozicioni i receptorski. Funkcionalni antagonizam nastaje kada dvije toksične supstance uravnotežuju jedna drugu tako što imaju suprotne efekte na istu fiziološku funkciju. Hemijski antagonizam ili inaktivacija je hemijska reakcija između dvije toksične supstance, a rezultat je manje toksičan proizvod. Dispozicioni antagonizam nastaje kada se apsorpcija, biotransformacija, distribucija ili izlučivanje toksične supstance promijeni na način da su posljedice smanjenje koncentracija i/ili postojanosti toksične supstance u ciljnom organu. Receptorski antagonizam toksičnih supstanci javlja se kada aplikacija dvije toksične supstance, koje se vezuju za isti receptor, indukuje manji toksični efekat u odnosu na efekte koji nastaju kada toksične supstance djeluju pojedinačno, što se matematički može predstaviti na sljedeći način:  $4 \text{ (I)} + 6 \text{ (II)} = 8 \text{ (KE)}$ . Receptorski antagonizam, takođe, može nastati kada jedna toksična supstanca poništava efekat druge toksične supstance, a formula bi glasila:  $0 \text{ (I)} + 4 \text{ (II)} = 1 \text{ (KE)}$ . Antagonisti receptora često se nazivaju blokatori.

## **2.7 Tolerancija organizma na efekte toksičnih supstanci**

Tolerancija je stanje smanjene reakcije organizma na efekte toksične supstance, a ta reakcija je rezultat prethodnog izlaganja datoj toksičnoj supstanci ili strukturno sličnoj toksičnoj supstanci. Za toleranciju organizma odgovorna su dva mehanizma. Prvi mehanizam tolerancije organizma omogućava smanjenje koncentracije toksične supstance koja dopijeva do mjesta gdje se generiše toksični efekat (tolerancija dispozicije). Drugi mehanizam tolerancije je preko smanjenja reakcije tkiva na toksičnu supstancu.



## 2.8 Karakteristike ekspozicije

Toksične supstance će u organizmu dovesti do negativnih efekata u slučaju da toksična supstanca ili njeni proizvodi razgradnje dospiju u odgovarajućoj koncentraciji i/ili dovoljnom vremenskom periodu do ciljnih organa. Da li će doći do toksičnog odgovora organizma zavisi od hemijskih i fizičkih svojstava hemijske supstance, načina izloženosti, načina na koji se toksična supstanca metaboliše u organizmu i ukupne osjetljivosti organizma.

## 2.9 Putevi i mjesta izloženosti toksičnim supstancama

Glavni putevi ulaska toksičnih supstanci u organizam su gastrointestinalni trakt (unošenje), pluća (udisanje), koža (topikalno<sup>2</sup>, perkutano ili dermalno<sup>3</sup>) i drugi parenteralni<sup>4</sup> (osim crijevnog kanala) putevi. Toksične supstance generalno indukuju najveći efekat i najbrži odgovor kada se daju direktno u krvotok (intravenski put). Efikasnost toksičnog efekta, prema putevima unošenja u organizam, opada u nizu: inhalacija > intraperitonealno<sup>5</sup> > subkutano<sup>6</sup> > intramuskularno<sup>7</sup> > intradermalno<sup>8</sup> > oralno<sup>9</sup> > dermalno. „Nosilac“ (materijal u kome je supstanca rastvorena) i druge komponente, npr. formulacije pesticida, mogu značajno da promijene efikasnost apsorpcije. Pored toga, način primjene može uticati na toksičnost supstance. Na primjer, supstance koje djeluju na CNS, ali se efikasno detoksikuju u jetri, manje su toksične kada se uzimaju oralno nego kada se inhaliraju, jer oralni put zahtijeva da skoro sva doza toksične supstance prođe kroz jetru prije nego što stigne u sistemsku cirkulaciju, a zatim i do CNS-a.

<sup>2</sup> primjena na određeno područje kože ili sluznice

<sup>3</sup> unošenje putem kože

<sup>4</sup> unošenje u organizam putem vakcinacije, injekcija, trljanja i sl.

<sup>5</sup> u trbušni prostor

<sup>6</sup> u potkožno masno tkivo

<sup>7</sup> direktno u mišić

<sup>8</sup> u kožu

<sup>9</sup> kroz usnu šupljinu

## 2.10 Trajanje i učestalost izlaganja

Izloženost eksperimentalnih životinja toksičnim supstancama obično se dijeli u četiri kategorije: akutna izloženost, subakutna, subhronična i hronična. Akutna izloženost definiše se kao izlaganje toksičnoj supstanci u vremenu kraćem od 24 časa. Dok se akutna izloženost obično odnosi na jednokratnu primjenu, ponovljena izloženost može biti u roku od 24 časa za neke blage toksične ili praktično netoksične supstance. Akutna izloženost udisanjem odnosi se na kontinuirano izlaganje toksičnoj supstanci manje od 24, a najčešće 4 časa. Ponovljena izloženost toksičnim supstancama može se podijeliti u tri kategorije: subakutna, subhronična i hronična. Subakutna izloženost odnosi se na ponovljeno izlaganje toksičnoj supstanci u trajanju od jednog mjeseca ili manje; subhronično izlaganje je u trajanju od jednog do tri mjeseca i hronično izlaganje toksičnoj supstanci je duže od tri mjeseca. U situacijama izloženosti ljudi toksičnim supstancama, učestalost i trajanje izloženosti obično nisu tako jasno definisani kao u kontrolisanim studijama na životinjama, ali mnogi se termini iz eksperimenata sa životinjama koriste za opisivanje opštih situacija izloženosti. Stoga se izloženost na radnom mjestu ili životnoj sredini može opisati kao akutna (javlja se iz jednog incidenta), subhronična (javlja se više puta tokom nekoliko nedjelja ili mjeseci) ili hronična (javlja se više puta tokom mnogo mjeseci ili godina).

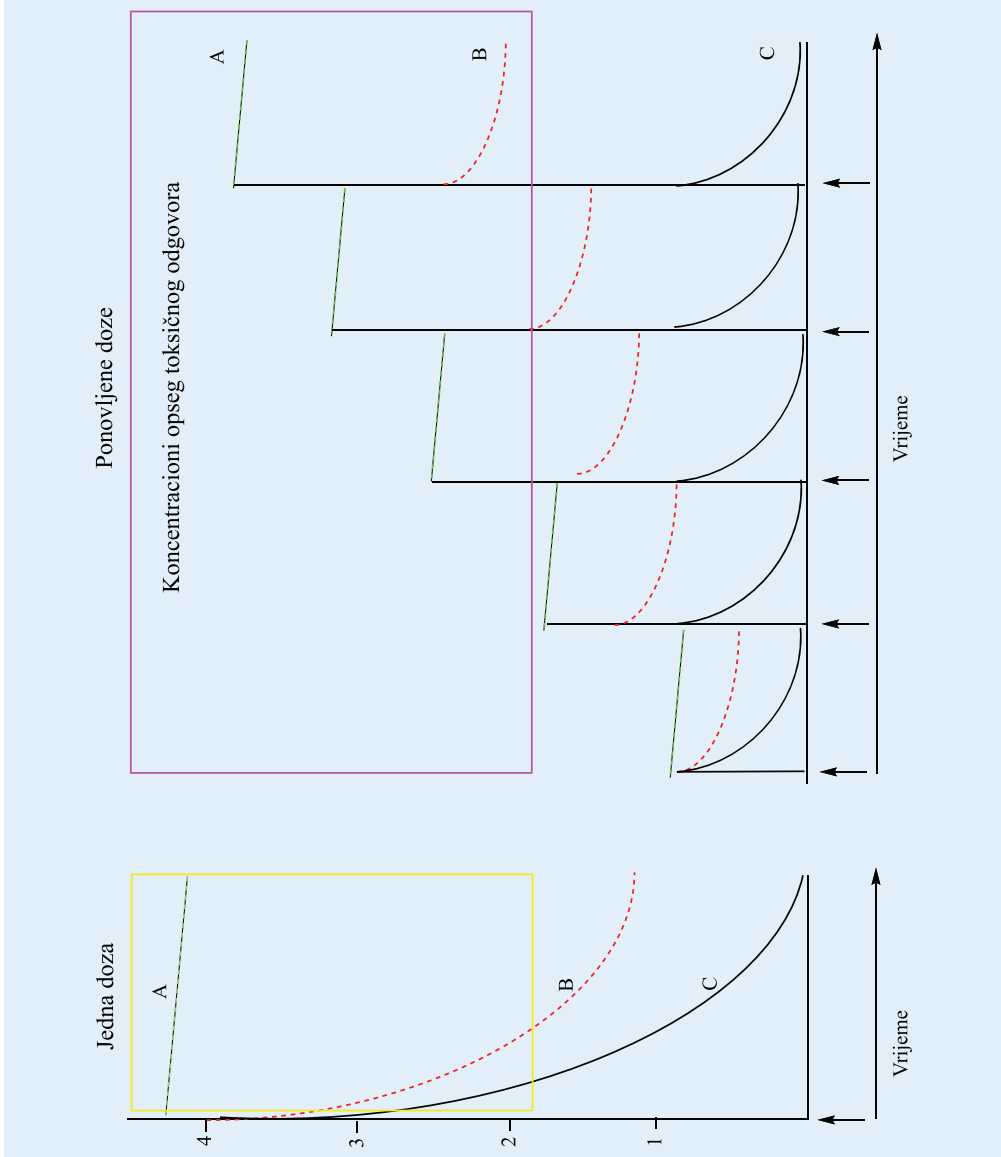
Za mnoge supstance, toksični efekti koji prate jednokratno izlaganje prilično se razlikuju od onih koji nastaju ponovnim izlaganjem. Akutna izloženost toksičnim supstancama koje se brzo apsorbuju, najvjerovatnije će izazvati trenutne toksične efekte, ali takođe može dovesti do odložene toksičnosti. Ta toksičnost može, ali ne mora biti slična toksičnim efektima hronične izloženosti. Suprotno tome, hronična izloženost toksičnim supstancama može izazvati neke trenutne (akutne) efekte nakon svake primjene. Ti efekti javljaju se

paralelno sa dugotrajnim, niskim ili hroničnim efektima toksičnih supstanci. Važnu ulogu u djelovanju toksičnih supstanci ima učestalost izlaganja. Odnos između brzine uklanjanja toksičnih supstanci i učestalosti izlaganja predstavljen je na Slici 21. Toksična supstanca koja indukuje ozbiljne efekte sa jednom dozom možda neće indukovati efekte ako se ista ukupna doza daje u nekoliko intervala. Za toksičnu supstancu prikazanu linijom B na Slici 21, sa vremenom poluživota (vrijeme potrebno da se 50% toksične supstance ukloni iz krvotoka) približno jednakim učestalostima doziranja, teoretska toksična koncentracija od 2 jedinične doze ne postiže se do četvrte doze, dok se ta toksična koncentracija postiže za toksičnu supstancu A koja ima brzinu eliminacije mnogo sporiju od intervala doziranja (vrijeme između svake ponovljene doze). Suprotno tome, za toksičnu supstancu C, sa brzinom eliminacije mnogo kraćom od intervala doziranja, toksična koncentracija na mjestu toksičnog efekta nikada neće biti dostignuta bez obzira na to koliko doza se primjenjuje. Naravno, moguće je da dođe do oštećenja ćelija ili tkiva sa svakom dozom, iako se sama toksična supstanca ne akumulira. Važno je razmotriti, da li je interval između doza toksične supstance dovoljan da omogući ili potpuno popravi oštećenje tkiva. Stoga se mogu javiti hronični toksični efekti ako se toksična supstanca akumulira u organizmu (brzina apsorpcije premašuje brzinu biotransformacije i/ili izlučivanja), ako indukuje nastanak ireverzibilnih toksičnih efekata, ili ako nema dovoljno vremena da se organizam oporavi od toksičnog oštećenja unutar intervala izlaganja.

## 2.11 Odnos doza-odgovor

Da bi se okarakterisao odnos između izloženosti toksičnoj supstanci i kasnijeg razvoja toksičnog efekta u organizmu, neophodno je razumjeti dvije vrste procesa:

Slika 21. Dijagramski odnos između doze i koncentracije na ciljnom mjestu u različitim uvloima učestalosti doze i brzine eliminacije. Linija A: toksična supstanca sa veoma sporom eliminacijom (npr. poluvrijeme 1 godina). Linija B: toksična supstanca čija je brzina eliminacije jednaka učestalosti doziranja (npr. 1 dan). Linija C: toksična supstanca sa brzinom eliminacije većom od učestalosti doziranja (npr. 5 časova). Ljubičasto osjenčeno područje predstavlja opseg koncentracije toksične supstance na ciljnom mjestu neophodan za izazivanje toksičnog efekta. Kreirano u ChemDraw Professional 15.



1. toksikokinetiku – koja opisuje odnos između izloženosti supstanci i krajnje kumulativne doze u tijelu;
2. toksikodinamiku – koja se bavi proučavanjem interakcije toksične supstance (ili metabolita) sa ciljnim molekulima - receptorima (DNA, enzimi, konstituenti membrana). Krajnji rezultat interakcije je toksični efekat.

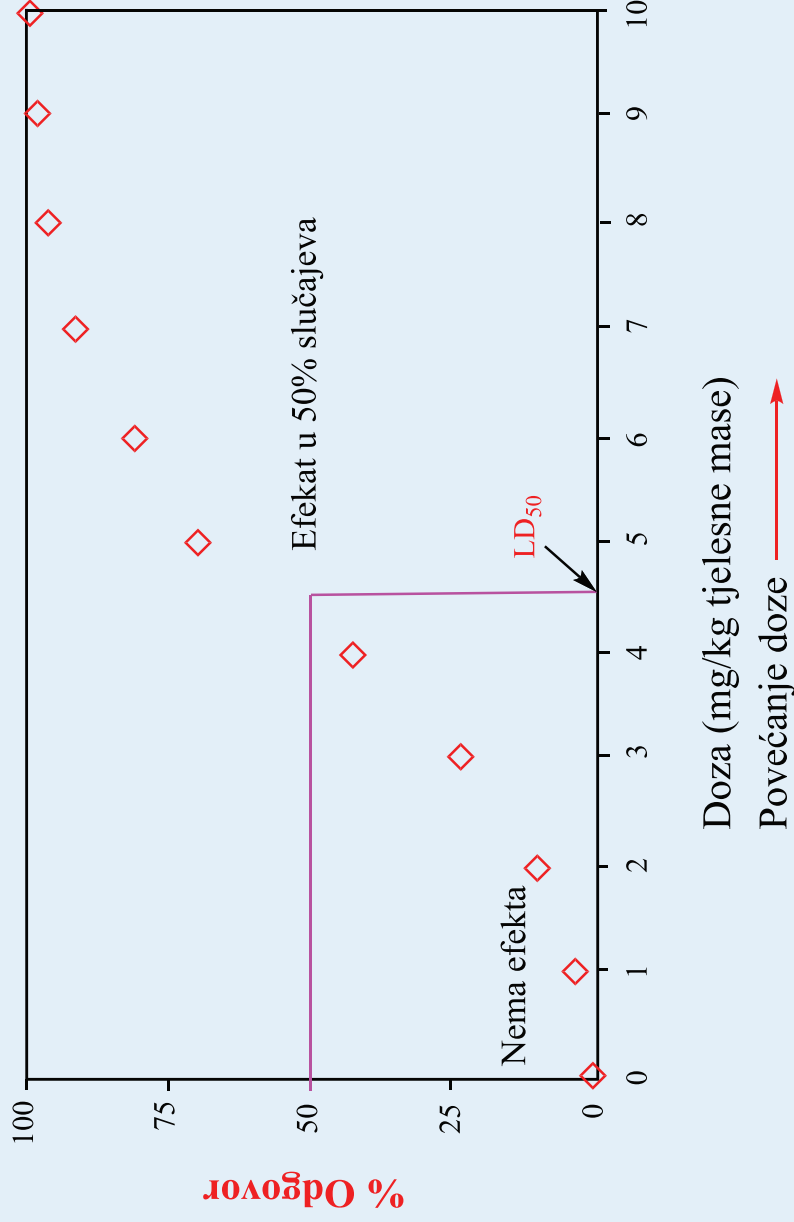
Odgovor organizma na djelovanje toksične supstance, odnosno efekti toksičnih supstanci rezultat su djelovanja dnevne doze i trajanja ekspozicije:

$$\text{Efekti} = \text{dnevna doza} \times \text{trajanje ekspozicije}$$

Toksični efekat zavisi od načina ekspozicije toksične supstance i njene apsorpcije, distribucije, biotransformacije i eliminacije u organizmu. Na krajnji toksični efekat supstanci utiče i individualna osetljivost svakog organizma.

Na Slici 22, predstavljena je zavisnost odgovora organizma od doze toksične supstance. Odnose doza-odgovor organizma karakteriše povećanje odgovora u zavisnosti od doze. Slika 22 prikazuje odnos doza-odgovor za različite doze organofosfatnog insekticida hlorpirifosa u ishrani i stepena inhibicije dva enzima u mozgu i jetri: acetilholinesteraze i karboksilesteraze. U mozgu, stepen inhibicije oba enzima jasno je povezan sa dozom i širokog je raspona, iako je stepen inhibicije po jediničnoj dozi različit za dva enzima. Iz oblika dvije krive doza-odgovor, očigledno da se u mozgu holinesteraza lakše inhibira nego karboksilesteraza. Toksikološki odgovor koji nastaje direktno je povezan sa stepenom inhibicije enzima holinesteraze u mozgu. Treba napomenuti da većina toksičnih supstanci ima više mjesta djelovanja ili mehanizama toksičnosti, od kojih svako ima svoj odnos „doza-odgovor“ i naknadni neželjeni efekat. Kada se ovi podaci o dozi predstave pomoću logaritamske skale ili doze, podaci odgovaraju pravoj liniji (Slika 23).

Efekat kod svih ispitanika

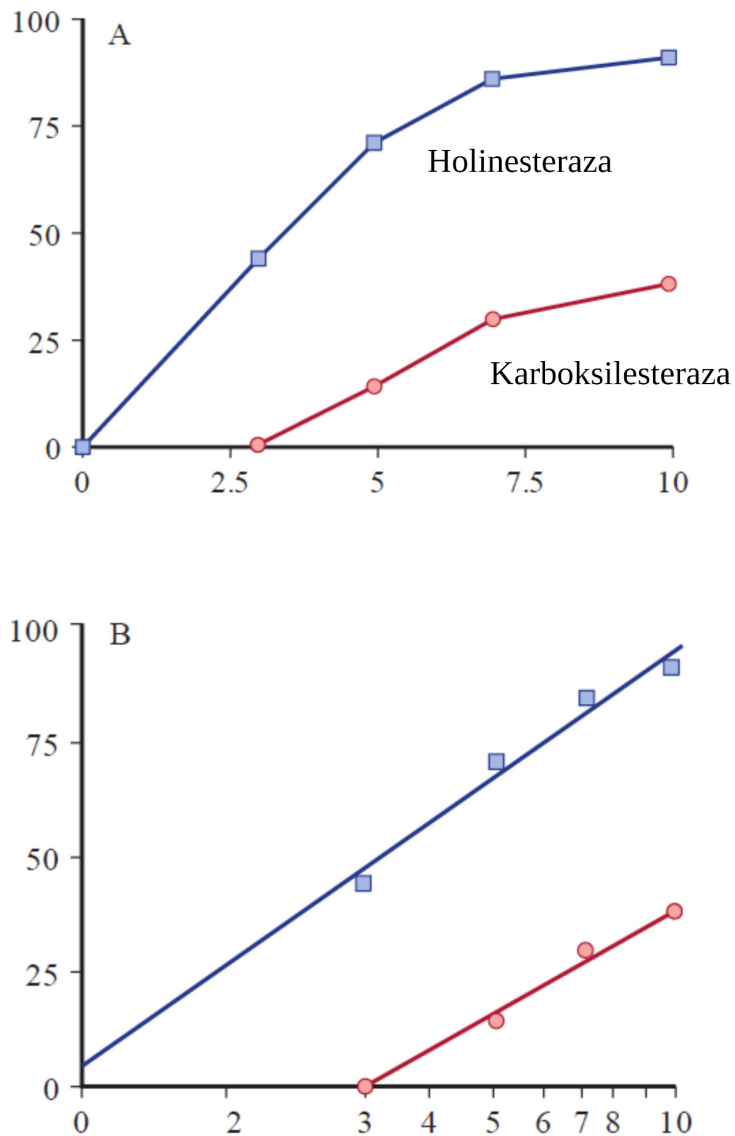


Doza (mg/kg tjelesne mase)

Povećanje doze →

Slika 22. Uticaj doze toksične supstance na odgovor organizma.

Kreirano u ChemDraw Professional 15.



Slika 23. Odnos doza-odgovor između različitih doza organofosfatnog insekticida hlörpirifosa i inhibicije enzima esteraza u mozgu. Plavi kvadrati i plave linije predstavljaju aktivnost acetilholinesteraze, a crveni krugovi i crvene linije predstavljaju aktivnost karboksilesteraze u mozgu gravidnih Long-Evans pacova koji su dobili 5 dnevnih doza hlörpirifosa.

A) Kriva doza-odgovor predstavljena na aritmetičkoj skali, B) Isti podaci predstavljani na semi log skali. (Podaci preuzeti od Casarett, 2008).

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u)*

Poznavanje odnosa doza-odgovor važan je u primjeni lijekova. U terapiji, na primjer, svaki lijek proizvodi određeni broj efekata, ali obično je samo jedan efekat povezan sa primarnim ciljem terapije. Svi ostali efekti smatraju se neželjenim ili nuspojavama. Međutim, neki od ovih neželjenih efekata mogu biti važan pokazatelj za neku drugu terapiju. Neki neželjeni efekti lijekova su uvijek štetni za dobrobit ljudi. Oni se nazivaju neželjeni, štetni ili toksični efekti lijeka.



### 3. UTICAJ PESTICIDA NA ĆELIJE I ORGANIZME

Pesticidi su velika grupa hemijskih jedinjenja ili smjesa jedinjenja namijenjena za sprečavanje, uništavanje i odbijanje štetočina (EPA US, 2018). Uključuju herbicide, insekticide, nematocide, moluscicide, piscicide, avicide, rodenticide, baktericide, repelente insekata, repelente životinja, mikrobicide, fungicide i lampricide (Randall, 2014; Dunlop i sar., 2018).

Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO, engl. *The Food and Agriculture Organization*) dala je proširenu definiciju pesticida koja glasi: pesticidi su svaka supstanca ili mješavina supstanci namijenjenih za sprečavanje, uništavanje ili kontrolu bilo koje štetočine, uključujući vektore bolesti ljudi ili životinja, neželjene vrste biljaka ili životinja koje izazivaju štetu tokom primjene ili na drugi način ometaju proizvodnju, preradu, skladištenje, transport i marketing hrane, poljoprivrednih proizvoda, drveta i proizvoda od drveta, stočne hrane, ili supstanci koje se mogu davati životinjama za kontrolu insekata, paukova ili drugih štetočina u ili na njihovim tijelima. Izraz pesticidi uključuje supstance koji su regulatori rasta biljaka, defolijansi, sredstva za sušenje ili sredstva za prorjeđivanje plodova ili sprečavanje prijevremenog opadanja plodova. Pesticidi se koriste kao supstance koje se primjenjuju na usjeve, prije ili poslije žetve, da bi se usjevi zaštitili od propadanja tokom skladištenja i transporta<sup>10</sup>. Najčešći pesticidi su herbicidi koji čine oko 80% svih pesticida primjenjenih u poljoprivredi (Atwood i sar., 2017). Većina pesticida namijenjena je za zaštitu bilja (poznati kao proizvodi za zaštitu bilja), koji, generalno, štite biljke od korova, gljivica, virusa ili insekata.

Pored pozitivnog djelovanja u zaštiti biljaka, pesticidi imaju i nedostatke jer nisu selektivno toksični, pa svoju toksičnost ujedno

<sup>10</sup> "International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides"  
(<https://www.fao.org/3/y4544e/y4544e.pdf>)

ispoljavaju i na korisne organizme i čovjeka. U današnje doba nijedna grana hemijske industrije ne proizvodi toliko jedinjenja koja mogu izazvati karcinogena oboljenja, oštećenja nasljednog materijala kao i reproduktivnih funkcija, i koja se u najvećoj mjeri direktno koriste u okolini, kao što je to slučaj sa industrijom pesticida (Nicolopoulou-Stamati i sar., 2016). Nauka koja se bavi izučavanjem pesticida sa različitih aspekata naziva se fitofarmacija.

### 3.1 Podjela pesticida

Pesticidi se mogu podijeliti na razne načine. Po hemijskom sastavu to mogu biti različita jedinjenja, organskog, neorganskog, sintetičkog ili biološkog porijekla (biopesticidi - mikrobnii pesticidi i biohemijski pesticidi) (Amdur i sar., 1997; <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/types-pesticide-ingredients>). Među prvim pesticidima bila su neorganska jedinjenja, npr. bakarsulfat - pentahidrat,  $\text{Cu}(\text{SO}_4)\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  kao jedan od najstarijih fungicida.

Po hemijskoj klasifikaciji svi pesticidi mogli bi se podijeliti u šest grupa:

- pesticidi–halogeni derivati ugljovodonika (insekticidi–DDT, dihlordifenil-trihloretnan) i homolozi, cikloheksanska jedinjenja, derivati lindana i dr.),
- homolozi i derivati benzola (insekticidi, fungicidi, baktericidi i herbicidi),
- jedinjenja fosfora (organski insekticidi, akaricidi, nematocidi, fungicidi i dr.),
- karbamidi: fungicidi, insekticidi, herbicidi (sebin, cinet, maneb, ciram, karbam),
- triazinski preparati (terbutilazin, atramet, prometrin, simazin) i
- dipiridili (herbicidi - parakvat, gramokson).

Pesticidi organskog porijekla mogu biti:

- organohlorni pesticidi,
- organofosforni pesticidi,
- triazini,
- derivati fenoksi - karbonatne kiseline,
- piretroidi i slično.

Pored navedenih podjela postoji i podjela prema namjeni, odnosno ciljnom organizmu, koja je prikazana u Tabeli 4.

**Tabela 4. Podjela pesticida prema ciljnom organizmu.**

<b>Vrsta pesticida</b>	<b>Ciljni organizmi</b>
<b>HERBICIDI</b>	Jedinjenja za suzbijanje korova i drugih biljaka koje rastu na neželjenom mjestu.
<b>ZOOCIDI</b>	Jedinjenja koja služe za kontrolu i suzbijanje štetnih organizama iz carstva životinja i mogu biti: insekticidi, akaricidi (grinje i krpelji), nematocidi (nematode - crvi i gliste), moluskocidi (puževi), rodenticidi (glodari) i avicidi (ptice).
<b>FUNGICIDI</b>	Jedinjenja koja služe za suzbijanje i prevenciju fitopatogenih gljiva.
<b>BAKTERICIDI</b>	Jedinjenja za suzbijanje fitopatogenih bakterija.
<b>ANTIBIOTICI</b>	Proizvodi metabolizma živih organizama ili sintetizovane supstance koje djeluju antagonistički na neke mikroorganizme.
<b>REPELENTI I ATRAKTANTI</b>	Repelenti su sredstva za odbijanje insekata, grinja, ptica i glodara, a atraktanti su sredstva za njihovo primamljivanje kako bi se skupljali i tako uspješno suzbijali.
<b>HEMOSTERILIZANTI</b>	Sredstva za izazivanje sterilnosti muških i ženskih jedinki štetnih organizama kako bi se smanjila njihova brojnost.
<b>FIZIOTROPI</b>	Jedinjenja koja u malim dozama usporavaju ili modifikuju pojedine fiziološke procese kod biljaka.

Prema načinu ulaska u organizam i mehanizmu djelovanja, pesticidi se dijele na kontaktne (uništavaju štetočine dodirrom), digestivne (prodiru preko želudačno-crijevnog trakta), sistemske (ne zadržavaju se na površini nego prodiru u unutrašnjost tkiva i ulaze u cirkulaciju) i fiziotropne (stimulansi i inhibitori) (Yadav i sar., 2015).

### **3.2 Rasprostranjenost upotrebe pesticida**

U posljednjih pedeset godina pesticidi su zajedno sa umjetnim (vještačkim) gnojivima postali najtraženiji proizvodi u poljoprivredi. Većinu problema sa kojima se susreću uzgajivači biljaka i životinja rješavaju zahvaljujući hemijskoj industriji, koja danas omogućava kontrolu sveukupne poljoprivredne proizvodnje. Pesticidi se u vrlo malim količinama mogu pronaći gotovo u svim sferama ekosistema. Velika toksičnost koju posjeduju zahtijeva posebnu pažnju prilikom njihove proizvodnje, pakovanja kao i primjene u poljoprivredi i javnom zdravlju. Osim u poljoprivredi i šumarstvu, pesticidi se primjenjuju u mnogim javnim ustanovama, uključujući poslovne zgrade, restorane, škole, parkove, golf terene, te uz ceste, pruge i dalekovode. Veliki broj jedinjenja pesticida pronađen je u vodama, okolini, vazduhu, magli, kiši i zemljištu, na šta ukazuju brojna istraživanja (Aktar i sar., 2009). Štetočine vrlo brzo razvijaju otpornost na pesticide, te prisiljavaju poljoprivrednike da upotrebljavaju nove i otrovnije pesticide (Hawkins i sar., 2019). Cijena koju čovjek plaća u borbi sa štetočinama veoma je visoka. Pesticidi zagađuju okolinu, prije svega površinske i podzemne vodene tokove, i imaju vrlo štetan uticaj na biljni i životinjski svijet. Pesticidi se nalaze u lancu ishrane mnogih divljih, ali i domaćih životinja, kao i čovjeka. Mogu se pronaći i u mikroorganizmima koji su na dnu lanca ishrane, a njima se hrane organizmi koji se nalaze na višem stepenu razvoja i taj se ciklus ponavlja sve do organizama koji se nalaze na vrhu lanca ishrane, gdje se može naći i najveća koncentracija pesticida, a tu je i čovjek (Rajmohan i sar., 2020).

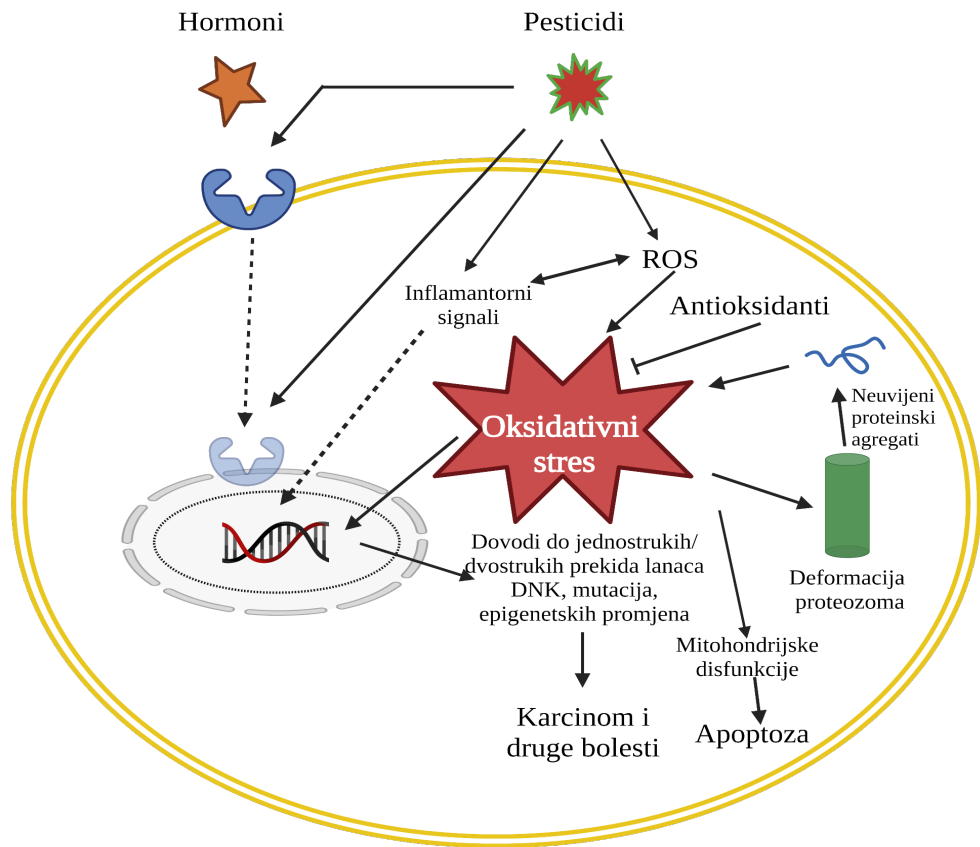
### 3.3 Štetna djelovanja pesticida na ljude

Pesticidi ulaze u organizam u obliku isparenja (čvrstih i tečnih aerosola), u tečnom i čvrstom obliku na tri načina: preko kože (ako je nezaštićena, gdje je najopasnije ukoliko pesticid dođe u kontakt sa sluznicom oka), zatim disanjem (udisanjem gasovitih preparata, odakle oni dalje odlaze u krvotok i ostatak organizma) i najčešće putem probave (obično onečišćenim rukama, hranom i vodom).

Trovanje pesticidima je globalni problem javnog zdravlja i uzrokuje skoro 300000 smrtnih slučajeva širom svijeta svake godine (Gunnell i Eddleston, 2003; Bertolote i sar., 2006). Izlaganje pesticidima je neizbježno. Način izlaganja ljudi pesticidima je važan faktor jer određuje koncentraciju izloženosti pesticidima. Pesticidi se u velikoj mjeri koriste u poljoprivredi i domaćinstvu. Smatra se da ova jedinjenja izazivaju mnoge poremećaje kod ljudi i divljih životinja. Istraživanja rađena posljednjih nekoliko decenija pokušala su da povežu mehanizam djelovanja pesticida sa njihovim štetnim efektima. Na ovaj način se tumače prošla i sadašnja istraživanja u oblasti pesticida i povezanih poremećaja. Najčešće bolesti koje su povezane sa pesticidima su Hodgkinova bolest (HD), ne-Hodgkinov limfom (NHL) (Wiklund i sar., 1987; Luo i sar., 2016), Parkinsonova bolest (Wang i sar., 2014; Brouwer i sar., 2017), endokrini poremećaji (Freire i sar., 2013; Mazur i sar., 2015), respiratorni i reproduktivni poremećaji (Kirkhorn i Schenker, 2002). Smatra se da pesticidi izazivaju rak kod ljudi, npr. glifosat je povezan sa rakom dojke (Thongprakaisang i sar., 2013). Pokazano je da su pesticidi koji sadrže alkil uree i amine povezani sa tumorima mozga (Musicco i sar., 1988). Rizik od raka prostate povećava se kod ljudi koji su bili izloženi Agent Orange-u [smjesa 2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4-D), 2,4,5-trihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4,5-T), pihloram i kakodilna kiselina], koju su SAD intenzivno koristile u ratu u Vijetnamu

(Ansbaugh i sar., 2013). Dieldrin izaziva tumore pluća, jetre, limfoidnog tkiva, materice, štitne žlijezde, mliječne žlijezde kod testiranih životinja u dozama od čak 0,1 ppm (Norman, 1974). Nekoliko pesticida je prepoznato kao supstance koje u organizmu narušavaju hormonsku ravnotežu (endokrini disruptori) (EDC, engl. *Endocrine Disruptor Compounds*) koje je prvi put priznala Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, engl. *World Health Organization*) 2002. godine. To su egzogene supstance, prirodne ili sintetičke, koje dovode do poremećaja funkcionisanja endokrinog sistema i stoga mogu izazvati štetne efekte u fiziološkim procesima uključujući razvoj, rast i reprodukciju kod organizama i/ili u njihovom potomstvu. Transkripciona aktivnost nuklearnih receptora jedna je od glavnih meta EDC-a, a otkriveno je da nekoliko pesticida, uključujući organohlorine, difenil etre, organofosforne pesticide, piretroide, karbamate, amide kiselina i uree, djeluju kao agonisti ovih nuklearnih receptora (Kojima i sar., 2011). Oksidativni stres jedan je od glavnih mehanizama koji je povezan sa mnogim bolestima i starenjem. Ovaj fenomen se intenzivira sa godinama i utiče na vitalne procese u tijelu. Mnogi pesticidi (parakvat, rotenon i maneb) izazivaju oksidativni stres i neurodegenerativne bolesti posredovane ROS-om. Na primjer, na ćelijskom nivou, Parkinsonova bolest je usko povezana sa prekomjernom proizvodnjom ROS-a na kompleksima elektrontransportnog lanca, što izaziva ozbiljna oštećenja mitohondrijalne DNK i drugih makromolekula (Blesa i sar., 2015; Nandipati i Litvan, 2016.). Slično tome, Alchajmerovu bolest, jednu od najčešćih invaliditeta kod starijih ljudi, karakteriše povećano taloženje amiloidnog  $\beta$  ( $A\beta$ ) proteina povezanog sa oksidativnim stresom (Huang i sar., 2016). Dugotrajno izlaganje niskim dozama parakvata, dieldrina, organohlorina i organofosfata indukuje neurotoksičnost posredovanu ROS-om koja je povezana sa Alchajmerovom bolešću (Yan i sar., 2016). Oksidativni stres izazvan pesticidima važan je mehanizam putem koga mnogi pesticidi

ispoljavaju svoje štetne efekte. Poznato je da oksidativni stres uzrokuje oštećenje DNK, što može uzrokovati maligne i druge poremećaje. Pokazalo se da mnogi pesticidi mijenjaju ekspresiju gena na nivou nekodirajućih RNK, histonskih deacetilaza, obrazaca metilacije DNK, što ukazuje na njihovu ulogu u epigenetici (Slika 24) (Sabarwal i sar., 2018). Zbog svega navedenog o uticaju pesticida na neciljne organizme važno je kontinuirano istraživanje mehanizma djelovanja pesticida, posebno pesticida koji se primjenjuju u većim količinama posljednjih nekoliko decenija.



Slika 24. Pesticidi utiču na različite ćelijske i subćelijske aktivnosti koje dovode do genetskih i epigenetskih promjena i uzrokuju različite bolesti ili smrt ćelije. Pesticidi mogu izazvati endokrine poremećaje i djelovati agonistički vezivanjem za hormonske receptore prisutne na ćelijskoj membrani ili jedru, izazivajući poremećaj ćelijske signalizacije.

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

Pesticidi mogu izazvati inflamatorne signale proizvodnjom ROS-a i mogu dovesti do akumulacije neuvijenih proteinskih agregata putem deformacije proteozoma. Takođe, mogu izazvati genetske i epigenetske modifikacije koje dovode do različitih bolesti. Toksičnost pesticida može narušiti ćelijske funkcije izazivanjem abnormalnog funkcionisanja mitohondrija (modifikovano prema Sabarwal i sar., 2018).

### 3.4 Herbicidi

Herbicidi predstavljaju jedinjenja koja se koriste u poljoprivredi za uništavanje korovskih biljaka radi povećanja prinosa (Jokanović, 2001). Kako bi se povećala poljoprivredna proizvodnja, upotreba herbicida u suzbijanju korova postala je uobičajena. Herbicidi su pojedinačne supstance ili mješavine supstanci, čija je funkcija kontrola, uništavanje, odbijanje ili ublažavanje rasta korova u usjevima. Herbicidi mogu da dovedu do inhibicije odvijanja brojnih fiziološko-biohemijjskih procesa biljaka: fotosinteze, sinteze aminokiselina, sinteze masnih kiselina i dr., što na kraju može dovesti do odumiranja biljke. Djelovanje herbicida počinje od kontakta herbicida sa biljkom (apsorpcija listom ili korijenom), zatim distribucijom do svih dijelova biljke i mjesta na koje herbicid djeluje da bi, na kraju, došlo do konačnog efekta (Duke i Dayan, 2011).

Postoji više načina za podjelu herbicida koji se zasnivaju na različitim kriterijumima.

**Prema načinu primjene herbicidi**, se mogu podijeliti u dvije grupe: primjena na zemljište i primjena na listove. Prema Jurado i sar., (2011), herbicidi koji se primjenjuju prije sadnje i prije nicanja biljaka (usjevi, korov ili oboje) klasifikovani su kao herbicidi sa primjenom na zemljište, dok su herbicidi koji se koriste nakon nicanja biljaka klasifikovani sa primjenom na listove.

**Prema mehanizmu djelovanja, herbicide** možemo klasifikovati na (Topolovec, 2008):



- inhibitore rasta biljaka,
- inhibitore fotosinteze,
- inhibitore biosintetičkih procesa i
- herbicide nepoznatog mehanizma djelovanja.

Herbicide možemo podijeliti i prema selektivnosti na: totalne, koji uništavaju sve biljke sa kojima dođu u kontakt i selektivne, koji djeluju na određene biljne vrste. Uticaj herbicida podijeljen je na njihovo primarno (direktno djelovanje herbicida na određeni proces) i sekundarno djelovanje (ometanje drugih procesa u znatno manjoj mjeri). Primjena herbicida u poljoprivredi u stalnom je porastu radi dobijanja sve većih prinosa usjeva. Zbog primjene pesticida, nestašica hrane i glad manje su prisutni u ljudskoj populaciji. Međutim, javlja se problem djelovanja herbicida na okolinu i živi svijet (i na ljude) koji nisu primarna meta djelovanja.

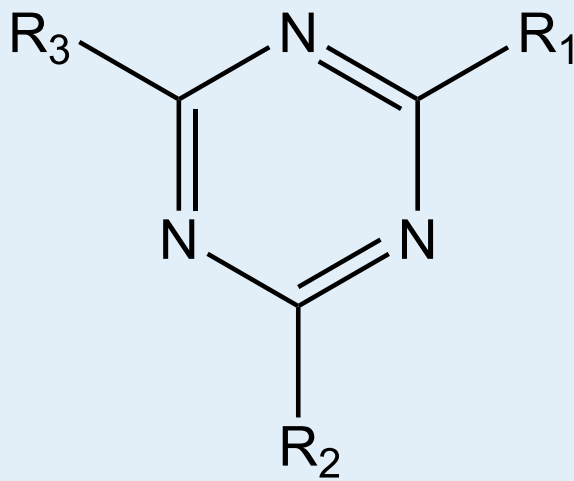
Na našem području često se primjenjuju herbicidi terbutilazin i nikosulfuron na zasadima kukuruza i u voćnjacima.

### 3.5 Terbutilazin

Triazinski herbicidi imaju supstituente na jednom od ugljenikovih atoma (amino grupa, hlor, metiltio ili metoksi grupa). Na tri ugljenikova atoma u šestočlanom aromatičnom prstenu terbutilazina dodane su grupe (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> i R<sub>3</sub>) koje mogu biti različito supstituisane (Slika 25).

Ako je R<sub>3</sub> hlor, tada ta jedinjenja imaju naziv koji se završava na - azin, ako je R<sub>3</sub> metoksi grupa, tada njihov naziv završava na - ton i ako je R<sub>3</sub> grupa metiltio, tada imaju naziv koji se završava na - trin. Prvi triazin je otkriven 1952. u laboratoriji fabrike J.R. Geigi, Ltd. u Švajcarskoj (LeBaron i sar., 2008), a prvi put je registrovan kao herbicid u SAD 1975. godine<sup>11</sup>.

<sup>11</sup> US EPA (Agenciji za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država, engl. *United States Environmental Protection Agency*), 1995 ([https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/reregistration/fs\\_PC-080814\\_1-Jun-95.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-080814_1-Jun-95.pdf))

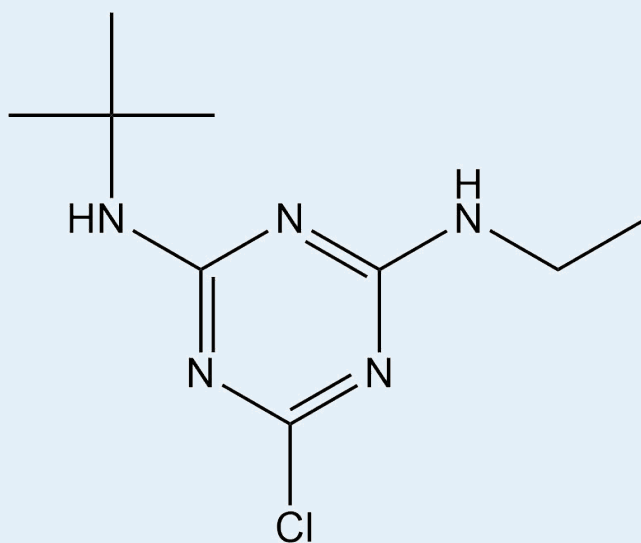


Slika 25. Opšta formula triazinskih herbicida.  
*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

Terbutilazin (N<sub>2</sub>-terc-butil-6-hloro-N<sub>4</sub>-etil-1,3,5-triazin-2,4-diamin) je aktivna supstanca selektivnih triazinskih herbicida. Do kontakta sa triazinskim pesticidima može doći prilikom rukovanja njima i prolivanja po koži, dok je posebna opasnost prisutna prilikom miješanja triazinskih pesticida s vodom ili ostalim jedinjenjima (npr. triketonima i hloracetamidima) jer, u većini slučajeva, pesticidi imaju visok postotak aktivnih materija. Takođe, do kontakta može doći i prilikom primjene neispravne opreme koja je kontaminirana pesticidima i prilikom transporta (Cycoń i Piotrowska-Seget, 2015). Triazinski herbicidi spadaju u kategoriju perzistentnih organskih jedinjenja pošto su otporna na biološko i hemijsko razlaganje (Klementova i Keltnerova, 2015).

### 3.5.1 Fizičko - hemijske osobine terbutilazina

Osnovne fizičko-hemijske osobine terbutilazina date su u Tabeli 5, a strukturna formula na Slici 26.



Slika 26. Strukturna formula terbutilazina.  
*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

**Tabela 5. Osnovne karakteristike terbutilazina<sup>12</sup>**

Naziv	<b>Terbutilazin</b>
Hemijska formula	<b>C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub></b>
IUPAC naziv:	<b>N<sub>2</sub>-terc-butil-6-hloro-N<sub>4</sub>-etil-1,3,5-triazin-2,4-diamin</b>
Relativna molekulska masa (g/mol)	<b>229,7</b>
Tačka topljenja (°C)	<b>178</b>
Hemijska svojstva	<b>bijeli kristalni prah</b>
Konstanta disocijacije	<b>pKa = 2,0; veoma slaba baza</b>
Log Kow	<b>3,40</b>
Rastvorljivost u acetonu (g/L) 25°C	<b>41</b>

<sup>12</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terbuthylazine>

**Tabela 5. (nastavak)**

Rastvorljivost u etanolu (g/L) 25°C	<b>14</b>
Rastvorljivost u etilen glikolu (g/L) 25°C	<b>2,36</b>
Rastvorljivost u toluenu (g/L) 25°C	<b>10,4</b>
Rastvorljivost u vodi (g/L) 20°C	<b>0,0085</b>
Gustina (g/mL) 20°C	<b>1,122</b>

### 3.5.2 Primjena terbutilazina

Terbutilazin se koristi za kontrolu rasta raznih trava i korova na poljima kukuruza. Biljke usvajaju terbutilazin korijenom i transportuju ga u stablo i listove. U korovskim biljkama, terbutilazin dovodi do inhibicije fotosinteze prekidanjem fiksacije CO<sub>2</sub> i proizvodnje ATP i NADPH. Svoje djelovanje terbutilazin ispoljava u vidu hloroze i nekroze listova i primjenjuju se za suzbijanje jednogodišnjih širokolisnih korova u poljima kukuruza i voćnjacima. Ima nisku rastvorljivost u vodi, što rezultira smanjenom biorazgradivošću.

Sve češće se terbutilazin pronalazi u površinskim i podzemnim vodama. Predstavlja rizik za okolinu i za zdravlje ljudi zbog svojih toksikoloških svojstava i srednje do visoke postojanosti u zemljištu (Grenni i sar., 2012). Usljed povećanja proizvodnje kukuruza na globalnom nivou, raste i zabrinutost usljed sve veće primjene ovog herbicida (Pannacci i sar., 2016).

### 3.5.3 Toksično djelovanje terbutilazina

Zabrana atrazina od strane Evropske unije 2006. godine (Bethsass i Colangelo, 2006) dovela je do značajnog povećanja primjene terbutilazina. Terbutilazin ispoljava blagu akutnu toksičnost

(kategorija III). Na osnovu rezultata ranijih studija u kojima je ispitivana hronična toksičnost i karcinogenost terbutilazina na miševima, pacovima i zečevima, prema Agenciji za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država (US EPA), Komitet za reviziju karcinogenosti klasifikovao je terbutilazin kao karcinogen Grupe D, što znači da ne pokazuje genotoksičnost i ne smatra se karcinogenom za ljude. Toksičnost terbutilazina, koja se odnosi na razvoj i reprodukciju, kao i na endokrini sistem, nije dovoljno proučena. Osim toga, nema dovoljno podataka o terbutilazinu kao zagađivaču podzemnih voda (Pesticide Info<sup>13</sup>).

Nema mnogo studija o toksičnosti terbutilazina na ljude i njegovom metabolizmu u ljudskom organizmu. Međutim, u eksperimentima na pacovima pokazano je da je glavni metabolički put razgradnje terbutilazina hidroliza hlora i monodealkilacija i didealkilacija, kao i hidroksilacija jedne ili obje dialkilamino grupe amina. Takođe, pokazano je da se terbutilazin brzo izlučuje iz organizma, potpuno se metaboliše i ne akumulira u tkivu (Pesticide Reregistration Status<sup>14</sup>).

Herbicidi indukuju formiranje ROS-a u eritrocitima kao što su pokazali eksperimenti *in vivo* i *in vitro* (Altuntas i sar., 2002; Sadowska-Woda i sar., 2010; Saxena i sar., 2011; Lovaković i sar., 2017). Takođe, triazinski pesticidi dovode do proizvodnje ROS-a (Bhatti i sar., 2011). Lipidna peroksidacija membrana eritrocita i promjene u antioksidativnom metabolizmu, indukovane su pod uticajem pesticida iz grupe triazina, kao i pesticida različite strukture u eksperimentima izvedenim *in vivo* i *in vitro* (Singh i sar., 2008; Abdallah i sar., 2011; Salama i sar., 2013; Abbassy i sar., 2014). Terbutilazin indukuje citogenetsko oštećenje - nestabilnost DNK niskog nivoa (*in vitro* i *in vivo*) (Lovaković i sar., 2017; Želježić i sar.,

<sup>13</sup> <https://www.pesticideinfo.org/chemical/PRI6139> (Accessed 01 August 2022)

<sup>14</sup> <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/status.html>

2018), dovodi do oksidativnog stresa, što je pokazano značajnim promjenama u aktivnostima antioksidativnih enzima (SODEC, SOD1 i GSH-Px) i povećanim ukupnim antioksidativnim kapacitetom (FRAP, engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*) (*in vivo*) (Lovaković i sar., 2017), kao i promjenama u oksidativnim i antioksidativnim parametarima metabolizma (MDA i CAT) (Davidović-Plavšić i sar., 2019). Za atrazin iz grupe hlora-triazina, utvrđeno je da djeluju narušavajući endokrinu ravnotežu inhibicijom cAMP-specifične fosfodiesteraze-4 (Kucka i sar., 2012).

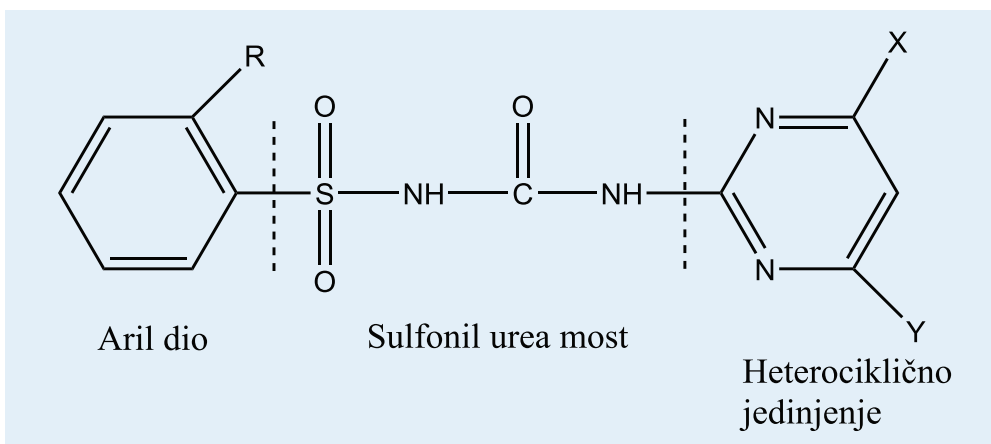
### 3.6 Sulfoniluree

Otkriće herbicida iz klase sulfoniluree, jedno je od najvažnijih događaja u istraživanju herbicida u posljednjih nekoliko decenija. Sposobnost sulfoniluree da djeluje kao herbicid zabilježena je prvi put 1966. godine (Hay, 1990). Sulfoniluree su klasa herbicida sa visokom biohemijskom aktivnošću pri niskim koncentracijama primjene (Draber i Fujita, 1992). Niske koncentracije koje se primjenjuju pomažu u rješavanju problema rukovanja, primjene i odlaganja, istovremeno smanjujući količinu hemikalija korištenih na zamlištu (Brown, 1990). Kao najznačajniji herbicidi u borbi protiv korovskih biljaka u zasadima kukuruza, izdvojili su se oni iz grupe sulfonilurea.

Sulfoniluree se strukturno sastoje od tri dijela: arilni dio, sulfonil urea most i heterociklični dio (Slika 27). Svaki dio ima važnu ulogu u određivanju ukupne herbicidne aktivnosti. Najveća aktivnost zabilježena je kod sulfonilureea u kojima benzenski prsten ima orto-supstituent (Hay, 1990).

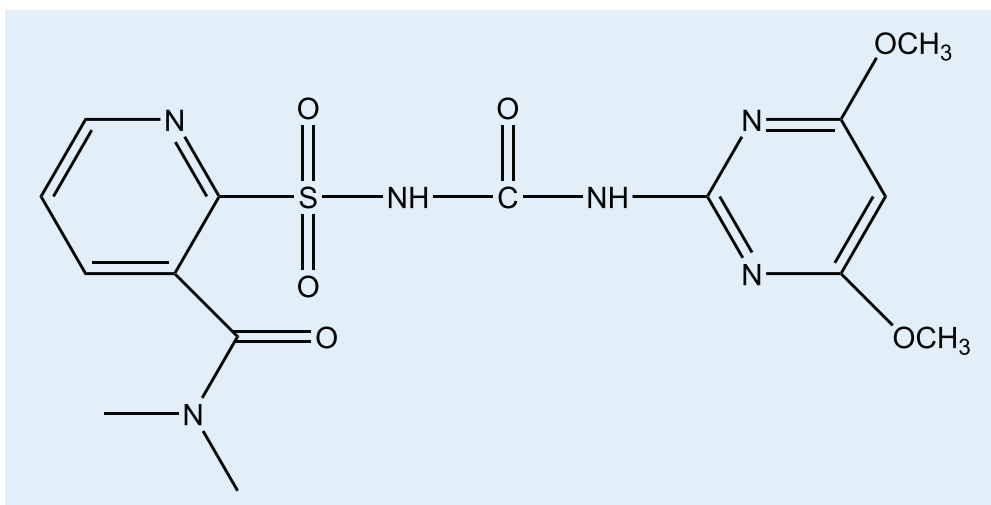
### 3.7 Nikosulfuron

Strukturna formula nikosulfurona prikazana je na Slici 28, a fizičko-hemijske osobine u Tabeli 6.



Slika 27. Opšta strukturna formula sulfoniluree herbicida.

*Kreirano u ChemDraw Professional 15*



Slika 28. Strukturna formula nikosulfurona.

*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

Nikosulfuron (2-[(4,6-dimetoksipirimidin-2-il)karbamoilsulfamoil]-N,N-dimetilpiridin-3-karboksiamid) je selektivni herbicid iz grupe sulfonilurea čiji se mehanizam djelovanja zasniva na inhibiciji aktivnosti enzima acetolaktat-sintaze koji je kod viših biljaka lokalizovan u hloroplastima. Inhibicijom acetolaktat-sintaze dolazi do blokiranja sinteze esencijalnih aminokiselina sa razgranatim bočnim lancima kao što su valin i izoleucin, što dovodi do inhibicije sinteze

proteina i smrti korova (Topolovec, 2008). Koristi se za suzbijanje mnogih jednogodišnjih i višegodišnjih travnih i širokolisnih korova i veoma je efikasan na zasadima kukuruza. Iako detaljan mehanizam inhibicije acetolaktat-sintaze nije poznat, posljedica je prestanak sinteze proteina, nukleinskih kiselina, diobe ćelije i rasta mladog korijena i listova. Nakon nekoliko dana, mladi listovi izgledaju uvenulo, a zatim takav izgled poprima i cijela biljka. Ako se ovi herbicidi primjenjuju prije sjetve ili prije nicanja biljaka i korova, onda korovi izrastu i rastu dok ne utroše rezerve hrane uskladištene u sjemenu (Topolovec, 2008, Xu i sar., 2022).

**Tabela 6. Fizičko-hemijske karakteristike herbicida nikosulfurona<sup>15</sup>**

Ime	Nikosulfuron
Hemijska formula:	<b>C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S</b>
IUPAC naziv:	<b>2-[(4,6-dimetoksipirimidin-2-il)karbamoilsulfamoil]-N,N-dimetilpiridin-3-karboksiamid</b>
Molekulska masa (g/mol):	<b>410,4</b>
Tačka topljenja (°C):	<b>169-172</b>
Napon pare (mPa):	<b>&lt;8*10<sup>7</sup></b>
pKa:	<b>4,6</b>
Rastvorljivost u vodi (g/L) 25°C	<b>7,4</b>
Rastvorljivost u dihlormetanu (g/L) 25°C	<b>160</b>
Rastvorljivost u hloroformu (g/L) 25°C	<b>64</b>
Rastvorljivost u acetonitrilu (g/L) 25°C	<b>23</b>

<sup>15</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73281>



**Tabela 6. (nastavak)**

Rastvorljivost u n-heksanu (g/L) 25°C	<b>&lt;0,02</b>
Rastvorljivost u acetonu (g/L) 25°C	<b>18</b>
Rastvorljivost u etanolu (g/L) 25°C	<b>4,5</b>
Gustina (g/mL)	<b>1,02</b>

Pokazano je da nikosulfuron može smanjiti sadržaj hlorofila i efikasnost fotosinteze, čime se smanjuje rast biljaka (Wang i sar., 2018). Primjena herbicida oštećuje fotosisteme I i II, čime se smanjuje maksimalna efikasnost fotosinteze. Razlog tome je povećana proizvodnja ROS-a koji nastaju u procesu fotosinteze u stresnim uslovima. Stalnom evolucijom biljaka, toksičnost herbicida se smanjuje mehanizmima adaptacija koje biljke razvijaju. Jedan od tih zaštitnih mehanizama odbrane je antioksidativni sistem (Wang i sar., 2018).

### 3.7.1 Toksičnost nikosulfurona

Akutna srednja oralna i dermalna letalna doza (LD<sub>50</sub>) nikosulfurona za miševe je veća od 5000 mg/kg i 2000 mg/kg, dok je inhalaciona (LC<sub>50</sub>, 4 časa) za pacove veća od 5,47 mg/L vazduha (Grahovac, 2016).

Odobren je za upotrebu samo u zemljama Evropske unije<sup>16</sup>. Prema dostupnim literaturnim podacima, nikosulfuron ima nisku akutnu toksičnost kod ljudi; malo je vjerovatno da je karcinogen i potencijalni je zagađivač podzemnih voda. Urađeno je nedovoljno studija da bi se potvrdila reproduktivna i razvojna toksičnost kao i endokrini poremećaji uzorkovani nikosulfuronom (PPDB<sup>17</sup> Nicosulfuron, 2023). Međutim, epidemiološke studije pokazuju da su upotreba i rukovanje herbicidima sulfoniluree povezani sa

<sup>16</sup> <https://www.chemicalbook.com>

<sup>17</sup> Pesticide Properties DataBase

značajno povećanim rizikom od pobačaja (Garry i sar., 2002). Pored toga, poznato je da neke sulfoniluree deluju kao hipoglikemijski agensi u liječenju dijabetesa tipa 2 kod ljudi i da su povezane sa većim rizikom od razvoja raka od drugih hipoglikemijskih agenasa (Chen i sar., 2017).

### 3.7.2 Detoksikacija pesticida u biljnim ćelijama

Biljke apsorbuju pesticide uglavnom preko listova, plodova i korijena. Metabolička sudbina pesticida u ili na biljci je složen proces koji počinje potencijalnom modifikacijom na reaktivnim mestima koja se uglavnom nalaze u listu i korijenu. Kada dospije u biljku, pesticid se može distribuirati unutar biljke, zatim od ćelije do ćelije ili preko vaskularnog sistema biljke. Step en i način na koji se pesticid usvaja i distribuira u biljci zavisi od fizičkih i hemijskih svojstava pesticida. Pesticid, koji se korijenjem usvaja iz zemljišta, može da prođe dva puta da bi došao do sudova ksilema: 1) apoplastni put i 2) simplastni put. Simplastni put je put kroz ćelije povezane preko plazmodezmi. To je reaktivno okruženje koje omogućava blizak kontakt između pesticida i biljnih enzima i drugih ćelijskih reaktanata. Apoplastni sistem obuhvata ćelijske zidove i vazdušne prostore između ćelija kroz koje se odvija transport rastvorenih materija na kratke i velike udaljenosti putem difuzije. Difuzno kretanje ima primarnu ulogu u transportu na kratke udaljenosti. Neki ksenobiotici su ograničeni samo na kretanje apoplastnim ili simplastnim putem, dok se drugi, mogu kretati kroz oba puta. Ravnoteža između distribucije pesticida u apoplastno-simplastnim kompartmanima je ono što određuje ukupan obrazac transporta. Generalno, manje lipofilni pesticidi kreću se apoplastnim putem, a više lipofilni pesticidi imaju tendenciju da se kreću simplastnim putem. Kretanje do centara metaboličke aktivnosti, kao što su vrhovi korijena i izdanaka, dešava se putem aktivnog transporta u floemu (Boersma i sar., 1988).

Biljke posjeduju mehanizme za degradaciju ili sekvestraciju (odvajanja ili odstranjivanje) većine komercijalnih pesticida iako su takve hemikalije biljci strane. Najčešće, ovi mehanizmi biotransformacije su nezavisni i nemaju veze sa načinom djelovanja i fiziološkim oštećenjima uključenim u aktivnost pesticida; umjesto toga, oni se odnose na funkcionalne grupe ili veze u jedinjenju koje su podložne enzimskom ili hemijskom „napadu“ (Casida i Likken, 1969). Metaboliziranje pesticida u biljkama može se podijeliti u tri faze: procese transformacije (I faza), konjugacije (II faza) i skladištenja (III faza). Inicijalne metaboličke reakcije, poznate i kao reakcije faze I, prvenstveno su katalizovane enzimima citohroma P450 i dovode do stvaranja reaktivnih grupa u strukturi pesticida koristeći različite mehanizme transformacije (Mougin i sar., 2001). Generisane reaktivne grupe, kao što su hidroksilne, služe kao „ručka“ za naknadnu konjugaciju i skladištenje, a katalizovane su enzimima faze II i III. Tipovi transformacija pesticida koji se javljaju u biljkama uključuju oksidaciju, hidroksilaciju, epoksidaciju, hidrolizu, redukciju, N-dealkilaciju, O-dealkilaciju, desulfuraciju, dehalogenaciju, dehidrohalogenaciju i dehidrogenaciju (Casida i Likken, 1969).

Hoagland i Zablutowicz (2001) su pokazali ulogu hidrolitičkih enzima biljaka su u reakcijama hidrolize pesticida. Esteraze, lipaze i proteaze uključene su u detoksikaciju i razgradnju pesticida. Hidroliza amida amidazama važna je u detoksikaciji alahlorina i drugih pesticida sa amidnim vezama. Enzimi monooksigenaze važni su u transformaciji nitroaromatičnih pesticida kao što je trifluralin (2,6-dinitro-N,N-dipropil-4-(trifluorometilbenzenamin)). Reakcije faze II i III uključuju konjugaciju molekula pesticida ili njihovih metabolita sa komponentama biljne ćelije. Proces faze II dovode do stvaranja rastvorljivih konjugata (uglavnom sa šećerima i aminokiselinama). Biljni metaboliti uključeni u procese konjugacije su glukoza, glutation, malonska kiselina i aminokiseline.

Konjugacija sa glutationom je važna reakcija transformacije faze II u biljkama (Hatzios, 2001). U prisustvu enzima glutation S-transferaze, glutation može da reaguje sa nizom supstrata, uključujući epokside, aril i alkil halide i druga elektrofilna jedinjenja. Rastvorljivi konjugati mogu se skladištiti u vakuolama tokom reakcija faze II (Sandermann, 1992; Korte i sar., 2000).

Konjugacija sa nerastvorljivim strukturama u biljnoj ćeliji, npr. kopolimerizacija sa ligninom, naziva se reakcija faze III. Reakcija faze III dovodi do formiranja nerastvornog ili vezanog ostatka. Riječ je o prirodnom regulatornom mehanizmu kojim biljke smanjuju rastvorljivost toksičnih pesticida u vodi, čime se smanjuje njihova reaktivnost i toksičnost. Takođe, na ovaj način se smanjuje pokretljivost pesticida u biljnom simplastu i omogućava njihovo skladištenje u vakuoli i apoplastu. Otkrivena su tri glavna puta za reakcije faze III u biljkama: transport u ćelijske vakuole, transport u ekstracelularni prostor i taloženje u ligninu ili drugim komponentama ćelijskog zida (Sandermann, 1992; Roberts, 2000). U biljkama je otkriveno nekoliko enzima koji su aktivni u uklanjanju pesticida ili drugih ksenobiotika (Tabela 7).

Nivoi enzima za detoksikaciju u biljci zavise od vrste i starosti biljke. Važno neriješeno pitanje je da li su i u kojoj mjeri vezani ostaci u biljkama bioraspoloživi. Mali broj ispitivanja, u kojima su radioaktivno obilježenim biljnim materijalom hranjene životinje, ukazuju na to da većina biotransformisanih pesticida nisu bioraspoloživi.

Ponekad se, prilikom detoksikacije pesticida, formira veliki broj metabolita, jer se degradativni „napad“ često dešava na više mjesta na molekulu pesticida, bilo istovremeno ili uzastopno. Nisu sve hemijske promjene na pesticidima enzimski posredovane; neke su rezultat reakcije sa biljnim metabolitima neenzimskim mehanizmima, a drugi nastaju fotohemijskim mehanizmima.

**Tabela 7. Biljni enzimi uključeni u detoksikaciju pesticida (Hoagland i sar., 2000; Van Eerd i sar., 2003).**

<b>Enzimi</b>	
Citohrom P450:	uključen u I fazu metabolizma pesticida katalizujući monooksigenazne reakcije;
Peroksidaze klase III:	uključene u III fazu metabolizma pesticida koja podrazumijeva dekarboksilaciju, oksidaciju sumpora, N-demetilaciju, hidroksilaciju prstena i oksidacije aromatičnih metilnih grupa;
Aril acilamidaze:	uključene u hidrolitičke transformacije katalizujući razgradnju amidne veze u I fazi metabolizma pesticida;
Esteraze:	uključene u hidrolitičke transformacije, katalizujući razgradnju estarskih veza u I fazi metabolizma pesticida;
Lipaze:	uključene u hidrolitičke transformacije, katalizujući razgradnju estarskih veza u I fazi metabolizma pesticida;
Proteaze:	uključene u hidrolitičke transformacije, katalizujući razgradnju estarskih veza u I fazi metabolizma pesticida;
Amidaze:	uključene u hidrolitičke transformacije katalizujući razgradnju amidne veze u I fazi metabolizma pesticida.

Putevi metabolizma pesticida zavise od ravnoteže enzima različitih katalitičkih sposobnosti, prisutnih u različitim biljnim vrstama, i mogućih hemijskih reakcija. Stopa metaboličkog „napada“ na pesticide od strane biljaka varira u zavisnosti od vrste do vrste, vremena boravka pesticida u biljkama ili na biljkama i stepena ulaska u biljku. Uz neke velike izuzetke, mikroorganizmi, insekti, biljke i sisari metabolišu strana organska jedinjenja istim glavnim putevima (Hall i sar., 2001). Procesi u biljkama su, u većini slučajeva, sporiji nego kod životinja,

ako su uključeni slični mehanizmi; većina životinja ima bolje sisteme razgradnje, cirkulacije i izlučivanja od biljaka. Biljke imaju tendenciju da skladište pesticide i njihove metaboličke proizvode na duže periode. Metabolizam pesticida, generalno, dovodi do detoksikacije, ali ponekad, proizvodi transformacije imaju jednaku, ako ne i veću toksičnost od odgovarajućih polaznih jedinjenja. Ovaj faktor ponekad doprinosi selektivnoj toksičnosti.

### **3.8 Modeli ispitivanja toksičnosti pesticida na neciljnim vrstama**

Zbog različite hemijske strukture i načina djelovanja, uticaj pesticida na životinjske i ljudske ćelije različit je. Međutim, zajedničko im je da izazivaju oksidativni stres koji se može odraziti na proizvodnju ROS-a (Halliwell i Gutteridge, 2006; DSouza, 2017). ROS može dovesti do oštećenja biomolekula i promjena u njihovoj strukturi i funkciji. Uprkos velikom broju studija koje se bave uticajem herbicida na oksidativni stres, ova oblast je još uvijek nedovoljno istražena. Istraživanja bi trebala da budu usmjerena na ispitivanje uticaja herbicida različite strukture i fizičko-hemijska svojstava; različite eksperimentalne modele (eritrociti, ćelijske kulture), kao i praćenje promjena u koncentraciji i aktivnosti različitih bioindikatora (oksidativni - malondialdehid, vodonik peroksid, antioksidativni - enzimski i neenzimski, enzimi faze II biotransformacije) kao i djelovanja herbicida na ćelijskom nivou.

### **3.9 Eritrociti kao model sistem za *in vitro* ispitivanja toksičnosti pesticida**

Istraživanja uticaja herbicida u kontrolisanim *in vitro* uslovima pružaju važan uvid u interakcije herbicida sa ćelijskim komponentama, što može objasniti mehanizme djelovanja herbicida (Marjanović Čermak i sar., 2018). Eritrociti su najzastupljenije ćelije u ljudskom tijelu i odgovorne su za transport kiseonika. Membrane eritrocita

su bogate polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA) dok Hb čini oko 95% ukupnih citoplazmatskih proteina. Eritrociti su izloženi djelovanju ROS-a koji se kontinuirano proizvode, uglavnom zbog autooksidacije oksihemoglobina u methemoglobin (Rifkind i sar., 2003). Zbog stalne izloženosti visokim koncentracijama kiseonika i osetljivosti PUFA i Hb na oksidaciju, eritrociti su stalni izvor ROS-a i oksidativnog stresa u fiziološkim uslovima. U uslovima izloženosti različitim vrstama abiotičkog stresa, lipidna peroksidacija je pojačana u membranama eritrocita i oksidacija Hb je intenzivirana do methemoglobina (metHb), što dodatno povećava proizvodnju ROS-a i formiranje malondialdehida kao glavnog indikatora peroksidacije lipida (Gupta i sar., 2020). Iako eritrociti nemaju jedro i organele i ne mogu *de novo* da sintetišu proteine, oni su bogati enzimskim i neenzimskim komponentama antioksidativnog zaštitnog sistema i uspješno se odupiru štetnim efektima koji mogu izazvati ROS (Podsiedlik i sar., 2020). Enzimi AOS, CAT i SOD su među najvažnijim enzimima u odgovoru ćelije na dejstvo pesticida (Deeba i sar., 2017; Gupta i sar., 2020). Superoksid dismutaza predstavlja prvu liniju odbrane od ROS-a formiranih fiziološki i dejstvom egzogenih faktora (ksenobiotici, temperatura, zračenje). Katalaza je veoma efikasna pri visokim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok niske koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uklanja glutathion peroksidaza, a glutathion reduktaza regeneriše redukovani glutathion. U eritrocitima je prisutna velika količina CAT-e, a samo jetra sadrži više ovog enzima. Kao komponente neenzimskog AOS-a u eritrocitima su prisutne molekule male molekulske mase (glutathion, vitamini E i C) (Nikolić-Kokić i sar., 2010). Dostupni literaturni podaci pokazuju da promjene aktivnosti i koncentracije AOS-a eritrocita zavisi od vrste pesticida (strukture), uslova tretmana i koncentracije pesticida (Altuntas i sar., 2004; El-Demerdash, 2007; Sadowska-Woda i sar., 2010). U uslovima oksidativnog stresa pesticidi mogu dovesti do oksidacije hemoglobina u eritrocitima do metHb u

uslovima oksidativnog stresa (Sosnowska i sar., 2013). Denaturisani hemoglobin se vezuje u obliku agregata visoke molekulske mase za membrane eritrocita (Kriebardis i sar., 2007). Pored toga, promjene u antioksidativnoj aktivnosti i koncentraciji oksidativnih i antioksidativnih parametara su pouzdan bioindikator količine ROS-a nastalih pod uticajem različitih ksenobiotika (Podsiedlik i sar., 2020).

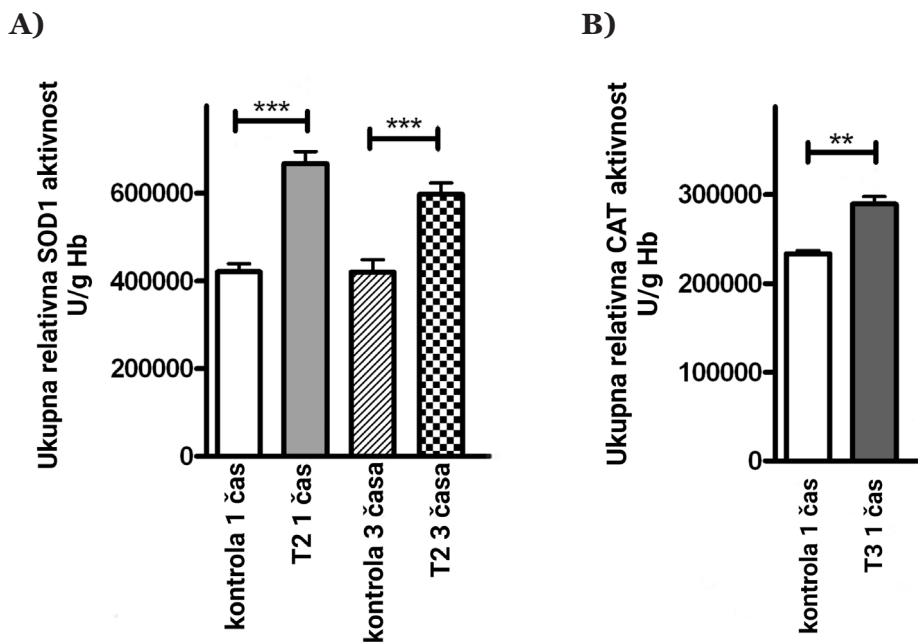
### **3.10 Uticaj herbicida na oksidativne i antioksidativne parametre metabolizma eritrocita**

Uticaj različitih koncentracija komercijalnog preparata naziva Hemazin SP 500, koji sadrži aktivnu komponentu terbutilazin, na lipidnu peroksidaciju humanih eritrocita i koncentraciju hemoglobina, pokazan je u radu Davidović-Plavšić i saradnici (2017). Uzorci humanih eritrocita tretirani su različitim koncentracijama terbutilazina: 0,0085; 0,85; 8,5 mg/L 3 časa. Povećanje sadržaja MDA izmjereno je u uzorcima tretiranim najnižom koncentracijom terbutilazina, dok je značajno smanjenje koncentracije MDA izmjereno pri tretmanu sa 8,5 mg/L terbutilazina. Koncentracija hemoglobina je rasla sa povećanjem koncentracije terbutilazina i najveća je izmjerena pri koncentraciji od 8,5 mg/L (Davidović-Plavšić i sar., 2017). Povećanje koncentracije insekticida hlorspirifosa dovodi do porasta, dok lambda cihalotrin indukuje smanjenje koncentracije Hb (Deeba i sar., 2017). Saxena i saradnici, (2011) su u svom radu pokazali da insekticidi hlorspirifos i endosulfan dovode do povećanja koncentracije Hb u odnosu na kontrolu. Ovi rezultati mogu ukazivati na različite mehanizme djelovanja pesticida u humanim eritrocitima. Herbicidi mogu da djeluju na humane eritrocite izazivanjem oksidacije Hb u metHB (Sosnowska i sar., 2013) ili da indukuju povećanje koncentracije Hb preko nepoznatog mehanizma (Deeba i sar., 2017). U istom radu je pokazano da oba insekticida indukuju porast koncentracije MDA, dok je u radu Gultekin i sar., (2000) pokazano da pri manjim koncentracijama



organofosfatnog insekticida hlorporifos-etila prvo dolazi do porasta koncentracije MDA, a zatim pri većim koncentracijama pesticida dolazi do smanjenja koncentracije MDA u lizatu humanih eritrocita *in vitro*. Osim strukture pesticida i primijenjena koncentracija utiče na oksidativne procese u eritrocitima *in vitro*.

U radu Davidović-Plavšić i saradnici (2019) ispitan je uticaj različitih koncentracija herbicida na humane eritrocite u eksperimentu *in vitro*. Ispitane su promjene redoks homeostaze u lizatu humanih eritrocita nakon akutnog izlaganja komercijalnom herbicidu (terbutilazinu Hemazin SC 500), (Davidović-Plavšić i sar., 2019). Aktivnosti antioksidativnih enzima u humanim eritrocitima SOD1, CAT i GST određivane su nakon inkubacije eritrocita sa različitim koncentracijama herbicida hemazina: 37 nmol/L (T1), 3,7 mmol/L (T2) i 37 mmol/L (T3), tokom 1 i 3 časa na 37°C. Iz lizata je hemoglobin uklonjen Tsuchihashi metodom (Tsuchihashi, 1923) i preostali rastvor je korišten za analizu izoenzimskog profila i aktivnosti SOD1. U lizatu su detektovane dvije izoforme SOD1 (SOD1 A i SOD1 B) u kontrolnim i tretiranim uzorcima. Tretman herbicidom nije doveo do promjena u izoenzimskim profilima, ali je značajno doveo do povećanja aktivnosti ukupne SOD1 pri nižim koncentracijama herbicida nakon inkubacije od 1 časa u odnosu na kontrolu. S druge strane, nakon inkubacije od 3 časa u odnosu na kontrolu jedino je pri koncentraciji herbicida od 3,7 mmol/L (T2) došlo do statistički značajnog povećanja aktivnosti SOD1 (Slika 29A). Značajno smanjenje aktivnosti SOD1 izmjereno je samo za najveću koncentraciju terbutilazina nakon inkubacije od 3 časa (Slika 29A). U kontrolnim i tretiranim uzorcima inkubiranim 1 čas i 3 časa na 37°C detektovana je jedna CAT izoforma nakon native poliakridamidne elektroforeze (Davidović-Plavšić i sar., 2019). Statistički značajno povećanje aktivnosti CAT-e izmjereno je jedino u uzorcima tretiranim 1 čas sa 37 mmol/L (T3) terbutilazinom (Slika 29B).



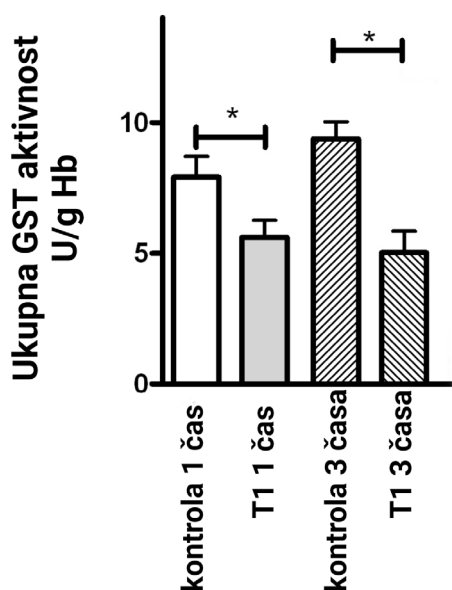
Slika 29. A) Ukupna relativna aktivnost SOD1 (zbir aktivnosti SOD1 A i SOD1 B) u kontrolnim uzorcima i uzorcima inkubiranim tokom 1 i 3 časa na 37°C terbutilazinom koncentracije 3,7  $\mu\text{mol/L}$  (T2) i 37  $\mu\text{mol/L}$  (T3). B) Ukupna relativna aktivnost CAT-e u kontrolnim i uzorcima inkubiranim tokom 1 časa na 37°C terbutilazinom koncentracije 37  $\mu\text{mol/L}$  (T3) (modifikovano prema Davidović-Plavšić i saradnici (2019)). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  SE. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

Nakon tretmana humanih eritrocita hemazinom, u poređenju sa kontrolom statistički značajno smanjenje GST aktivnosti izmjereno je za najnižu koncentraciju herbicida za 1 čas i 3 časa (Slika 30).

I drugi autori su pokazali u svojim radovima da su aktivnosti SOD1 povećane pri tretmanu eritrocita nižim koncentracijama pesticida: hlorspirifos-etilom (Gultekin i sar., 2000), piretroidnim insekticidom (Sadowska-Woda i sar., 2010) i izoksazolidinskim herbicidom klomazonom (Santi i sar., 2011). Svi navedeni pesticidi sadrže u svojoj strukturi hlor. Kako SOD1 može biti aktivirana pri nižim koncentracijama i inhibirana pri višim koncentracijama jedinjenja koja sadrže sumpor (Toohey i Cooper, 2014), pretpostavka je da bi

na sličan način mogla da djeluju i jedinjenja koja sadrže hlor, kao što je npr. terbutilazin. Tretman eritrocita organohlornim insekticidom endosulfanom i organofosfornim insekticidom hlorspirifosom dovodi do statistički značajnog smanjenja aktivnosti SOD1 (Saxena i sar., 2011), što može biti posljedica oksidativnih promjena proteina koje mogu dovesti do povećane osjetljivosti na proteolizu i denaturaciju proteina (Kriebardis i sar., 2007). Do promjene aktivnosti CAT-e može doći nakon tretmana humanih eritrocita različitim pesticidima. Tako je pokazano da za sve primijenjene koncentracije izoksazolidinskog herbicida kloramazona može doći do smanjenja aktivnosti katalaze (Santi i sar., 2011). Tretman organofosfornim insekticidom trihlorfonom je, sa druge strane, indukovao povećanje aktivnosti katalaze (Catalgol i sar., 2007). Nepromijenjene aktivnosti CAT-e izmjerene su nakon tretmana eritrocita organofosfatnim insekticidom diazinom (Altuntas i sar., 2004). U radu Davidović-Plavšić i saradnici (2019), pokazano je da je aktivnost CAT-e najveća u uslovima izloženosti najvišoj koncentraciji terbutilazina za koju se može pretpostaviti da je najprooksidativnija, kao što su to i drugi autori pokazali (Eroglu i sar., 2013). Takođe, pokazano je da tretman eritrocita svim koncentracijama sintetičkog piretroidnog insekticida lambda-cihalotrina (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 mM) indukuje smanjenje GST aktivnosti (El-Demerdash, 2007), dok je tretman organohlornim insekticidom endosulfanom i organofosfornim insekticidom hlorspirifosom indukovao povećanje GST aktivnosti (Saxena i sar., 2011). Aktivnost GST-e regulisana je putem koncentracije glutaciona i redoks statusa ćelije. Povećana koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koja je rezultat inhibicije CAT aktivnosti (Kono i Fridovich, 1982) sa superoksid anjon radikalom, može inhibirati aktivnost SOD1 (Pigeolet i sar., 1990). Antioksidativni sistem eritrocita funkcioniše u domenu pozitivne korelacije između SOD1 i CAT-e. Smanjenje GST aktivnosti pri najnižoj koncentraciji terbutilazina može biti posljedica indukcije

antioksidativnog metabolizma, posebno SOD1, zato što je aktivnost SOD1 najosjetljivija na promjene koncentracije terbutilazina tokom akutnog izlaganja. S druge strane, pri visokim koncentracijama terbutilazina tokom 3 časa inkubacije, GST aktivnost se povećala, što naglašava značaj GST-e u odbrani od ROS-a u prooksidativnim uslovima kada je aktivnost SOD1 inhibirana (Davidović-Plavšić i sar., 2019). Za razliku od SOD1 i CAT-e koji čine prvu liniju odbrane od ROS-a, enzimi zavisni od glutationa u antioksidativnom sistemu odvojeno su regulisani, vjerovatno preko koncentracije (smanjenog) glutationa i redoks statusa ćelije.



Slika 30. Aktivnost GST (glutation-S-transferaze) u kontrolnim uzorcima i tretiranim sa 37 nmol/L (T1) terbutilazinom inkubiranih 1 čas i 3 časa (modifikovano prema Davidović-Plavšić i saradnici, 2019). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  SE. \*  $p < 0,05$ .

Rezultati u radu Davidović-Plavšić i saradnici (2019) pokazali su promjenu aktivnosti enzima SOD1, CAT-e i GST-e humanih eritrocita za različite koncentracije terbutilazina i vrijeme inkubacije *in vitro*, što može ukazivati na strategiju organizma u zaštiti od oksidativnog stresa.

Kao posljedica hronične izloženosti niskim koncentracijama pesticida, može doći do promjena antioksidativnog kapaciteta na sistemskom nivou. Takođe, pošto je korišten komercijalni preparat, Hemazin SC 500, za tretman humanih eritrocita, treba uzeti u obzir i potencijalni uticaj pratećih jedinjenja komercijalnog preparata na antioksidativni metabolizam humanih eritrocita. U Tabeli 8, sumirani su dostupni podaci o promjenama aktivnosti antioksidativnih enzima kao odgovor na tretman različitim pesticidima u *in vitro* uslovima (predstavljani su tip uzorka, vrsta pesticida, uslovi tretmana i koncentracije pesticida). Kao što se vidi iz Tabele 8, strukturno različiti pesticidi dovode do oksidativnih promjena u eritrocitima.

Parakvat je jedan od najčešće korištenih herbicida u svijetu. Parakvat je komercijalni naziv za N,N'-dimetil-4,4'-bipiridin dihlorid. Vrlo je otrovan za životinje i ljude. U radu Friscic i sar., (2014) eritrociti pacova bili su izloženi različitim koncentracijama parakvata (0, 0,25, 0,5, 0,75, 1,25 mM) tokom 3 časa. Autori su pokazali prisustvo jedne SOD1 i jedne CAT izoforme u uzorcima eritrocita pacova. Dobijeni rezultati su pokazali da niže koncentracije parakvata (0,25 i 0,5 mM) dovode do povećanja aktivnosti SOD1 i CAT-e dok sa povećanjem koncentracije herbicida dolazi do inhibicije aktivnosti oba enzima. Takođe, autori su ukazali na to da niže koncentracije parakvata ne utiču na aktivnost acetilholinesteraze, dok do značajnog smanjenja aktivnosti dolazi pri tretmanu sa najvišom koncentracijom parakvata (1,25 mM). Lokalizacija acetilholin esteraze na membrani eritrocita određuje njenu osjetljivost na djelovanje ROS-a. Promjene u aktivnosti acetilholinesteraze mogu biti posljedica djelovanja ROS-a indukovano povećanim koncentracijama herbicida (Bukowska, 2006).

**Tabela 8. Promjene aktivnosti SOD1 (CuZn superoksid dismutaze), CAT (katalaze) i GST (glutation-S-transferaze) u lizatu eritrocita nakon tretmana eritrocita različitim pesticidima *in vitro*.**

Uzorak	Vrste pesticida	Uslovi tretmana	Opseg koncentracija	Promjena aktivnosti			References
				CAT	SOD1	GST	
Eritrociti pacova	Parakvat <i>Organohlorni pesticid</i>	3 časa, 37°C	0.25, 0.5, 0.75 1.25 mmol/L	Povećana aktivnost pri nižim koncentracijama, smanjena pri višim koncentracijama herbicida	Povećana aktivnost pri nižim koncentracijama i smanjena pri višim koncentracijama herbicida	–	(Frisic i sar., 2014)
Humani eritrociti	Malation <i>Organofosfatni pesticid</i>	1 čas, 37°C	25, 75, 200 µmol/L	Aktivnost niža u ćelijama tretiranim malationom nego u kontrolnim uzorcima	Aktivnost niža u eritrocitima tretiranim malationom nego	–	(Durak i sar., 2009)
Humani eritrociti	Trihlorfon <i>Organofosforini insekticid</i>	1 čas, 37°C	8, 12, 16, 20, 40, 60, 80 mg/L	Povećana aktivnost	Povećana aktivnost	–	(Catalgol i sar., 2007)
Humani eritrociti	Aminopielik D 2.4-D; Dicamba <i>Herbicidi</i>	1 čas, 37°C	100, 500, 1000 µg/L; 8, 40 i 80 µg/L	Smanjena aktivnost	–	–	(Bukowska i sar., 2006)

**Tabela 8. (nastavak)**

Humani eritrociti	beta-Ciflutrin <i>Piretroidni insekticid</i>	4 časa, 37°C	43, 215, 1075 µg/L	Smanjena aktivnost	Povećana aktivnost pri nižim koncentracijama i smanjena pri najvišoj koncentraciji insekticida	–	(Sadowska-Woda i sar., 2010)
Humani eritrociti	Hlorpirifos-etil <i>Organofosfatni insekticid</i>	0, 30, 60, 120, 240 min; 4°C	0.4, 2, 10, 50, 100 g/L i 0.01, 0.1 g/L	Aktivnost smanjena na svim inkubacionim periodima za sve koncentracije	Smanjena aktivnost pri višim koncentracijama u svim periodima inkubacije i povećana aktivnost pri nižim koncentracijama	–	(Gultekim i sar., 2000)
Humani eritrociti	Fosfalon <i>Organofosfatni insekticid</i>	0, 60, 180 min; 4°C	0, 0.0027, 0.027, 0.27, 2.7, 27 mmol/L	Smanjena aktivnost	Smanjena aktivnost	–	(Altuntas i sar., 2003)
Humani eritrociti	Diazinon <i>Organofosfatni insekticid</i>	0, 60, 180 min; 4°C	0.0033, 0.033, 0.33, 3.3 i 33 mmol/L	Nepromijenjena aktivnost za sva vremena inkubacije i sve koncentracije	Povećana aktivnost za sve koncentracije insekticida, dok između vremena inkubacije nije bilo razlike	–	(Altuntas i sar., 2004)

**Tabela 8. (nastavak)**

Uzorak	Vrste pesticida	Uslovi tretmana	Opseg koncentracija	Promjena aktivnosti			References
				CAT	SOD1	GST	
Eritrociti pacova	Etion, Dimetoat, Monokrotofos, Hlorpirifos <i>Organofosfatni pesticidi</i>	15 min, 4°C	Svaki pri 200 µg/mL	–	–	Povećana aktivnost pri svim primijenjenim pesticidima	(Singh i sar., 2006)
Eritrociti pacova	Endosulfan <i>Organohlorni insekticid i akaricid</i> Hlorpirifos <i>Organofosformi insekticid</i>	3 časa, 37°C	1 µg/L	Aktivnost značajno smanjena	Aktivnost značajno smanjena	Aktivnost povećana u poređenju sa kontrolnim vrijednostima	(Singh i sar., 2006)
Zečji eritrociti	Lambda-cihalotrin <i>Sintetički piretroidni insekticid</i>	4 časa, 37°C	0, 0.1, 0.5, 1, 2.5 i 5 mmol/L	Smanjenje aktivnosti	Smanjenje aktivnosti	Smanjenje aktivnosti	(El-Demerdash, 2007)



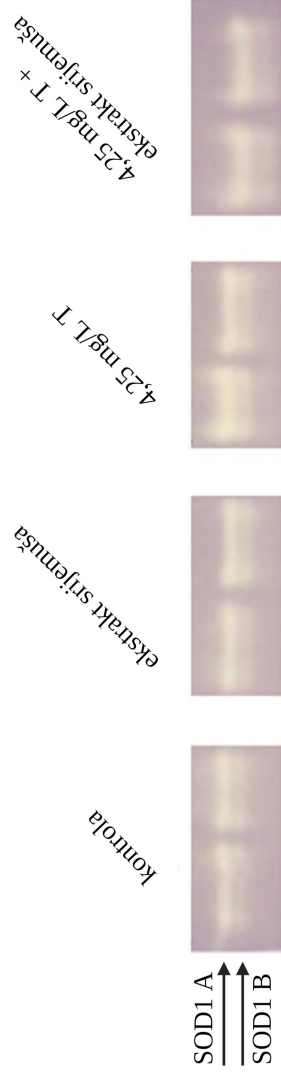
### 3.11 Zaštitni efekat sekundarnih metabolita biljaka od toksičnih efekata pesticida

Negativni efekti herbicida mogu se ublažiti prirodnim jedinjenjima koja pokazuju antioksidativni kapacitet. Srijemuš (*Allium ursinum*) je biljka bogata fenolnim jedinjenjima koja ima značajan antioksidativni kapacitet mjereno sposobnošću uklanjanja DPPH radikala (3637  $\mu\text{g Trolox/g}_{\text{DW}}$ <sup>18</sup>) i ABTS radikala (8010  $\mu\text{g Trolox/g}_{\text{DW}}$ ) (Давидовић-Плавшић i sar., 2018). Odgovor antioksidativnog sistema humanih eritrocita na tretman herbicidom terbutilazinom *in vitro* i moguća zaštitna uloga ekstrakta lista srijemuša (fenolnih jedinjenja) od oksidativnih oštećenja izazvanih terbutilazinom, prikazan je u radu Davidović-Plavšić i sar., (2021). Ekstrakt srijemuša je statistički značajno smanjio koncentraciju MDA-a i Hb-a u poređenju sa uzorcima tretiranim samo terbutilazinom (4,5 mg/L). U radu je pokazano da terbutilazin u koncentraciji od 4,25 mg/L nije značajno promijenio aktivnosti SOD1 i CAT-e (Slike 31 i 32). Aktivnost CAT-e statistički je značajno povećana u uzorcima tretiranim ekstraktom srijemuša i terbutilazinom u poređenju sa uzorcima tretiranim samo terbutilazinom. Pored toga, ekstrakt srijemuša nije značajno uticao na aktivnost SOD1. Rezultati su pokazali da ekstrakt srijemuša može smanjiti toksičnost terbutilazina, a membrana eritrocita može biti primarno mjesto zaštitnog djelovanja fenolnih jedinjenja iz ekstrakta (Davidović-Plavšić i sar., 2021). U radu je pokazano da bi intenzitet lipidne peroksidacije mogao biti biomarker oksidativnog oštećenja izazvanog terbutilazinom i zaštitnog efekta srijemuša. I drugi autori su ukazali na značajan antioksidativni kapacitet ekstrakta srijemuša (Sahnoun i sar., 2017; Tomović i sar., 2020). Takođe, i u drugim radovima je pokazano da se oksidativna oštećenja uzrokovana pesticidima, mogu smanjiti korišćenjem biljnih ekstrakata (Nakbi i sar., 2010; Turkez i sar., 2012; Khalifa i Alkhalaf, 2020).

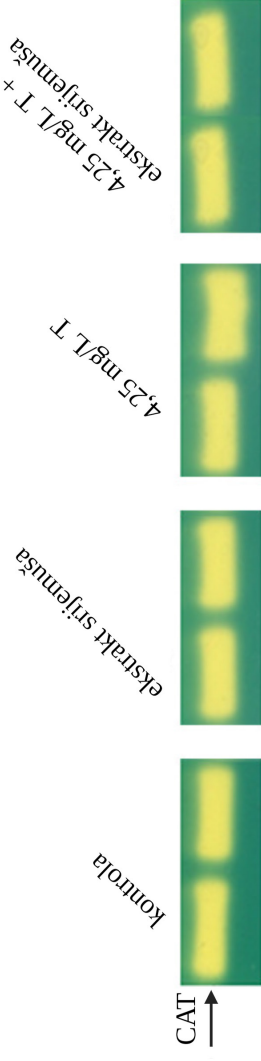
<sup>18</sup> DW, engl. *dry weight* - suva masa

Rezultati u radu Davidović-Plavšić i saradnici (2021) pokazali su da je terbutilazin doveo do povećanja koncentracije Hb, dok je terbutilazin u kombinaciji sa ekstraktom srijemuša doveo do smanjenja koncentracije Hb-a. Efekat ekstrakta srijemuša može se pripisati fenolnim jedinjenjima koja štite Hb od oksidativnog oštećenja sprečavanjem povećane proizvodnje ROS-a. Poznato je da fenolna jedinjenja imaju sposobnost uklanjanja ROS-a (Rice-Evans i sar., 1997). Dejstvo herbicida na humane eritrocite uglavnom je praćeno lipidnom peroksidacijom i povećanom koncentracijom MDA-a (Abudayyak i sar., 2014), što može biti povezano sa većom proizvodnjom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kiruthiga i sar., 2007). Mehanizam kojim fenolna jedinjenja dobijena iz srijemuša smanjuju lipidnu peroksidaciju membrana eritrocita može uključivati smanjenje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rice-Evans i sar., 1997). Pored toga, zaštitni efekat ekstrakta srijemuša na membrane eritrocita, može se pripisati njegovoj sposobnosti da se inkorporira u membrane i zaštititi lipidni dvosloj od oksidativnog oštećenja (López-Revuelta i sar., 2006; Sadowska-Woda i sar., 2010). Ekstrakt srijemuša inhibira hemolizu eritrocita izazvanu oksidativnim agensima i smanjuje štetne efekte slobodnih radikala, pri čemu ispoljava bolji efekat od vitamina C u zaštiti lipida u membrani eritrocita (Cyboran-Mikołajczyk i sar., 2019). Hidrofilna frakcija ekstrakta djevičanskog maslinovog ulja, koja sadrži veći sadržaj fenolnih jedinjenja, ima zaštitni efekat peroksidacije lipida izazvane herbicidom 2,4-dihlorofenoksisirćetnom kiselinom (Nakbi i sar., 2010). Herbicidi mogu inhibirati aktivnosti SOD1 i CAT-e direktnom interakcijom sa njima ili indirektnim povećanjem nivoa ROS-a, koji imaju inhibitorni efekat na enzime.

Moguće je da fenolna jedinjenja srijemuša djeluju direktno na terbutilazin i tako štite CAT-u od njegove inhibitorne aktivnosti (Davidović-Plavšić i sar., 2021).



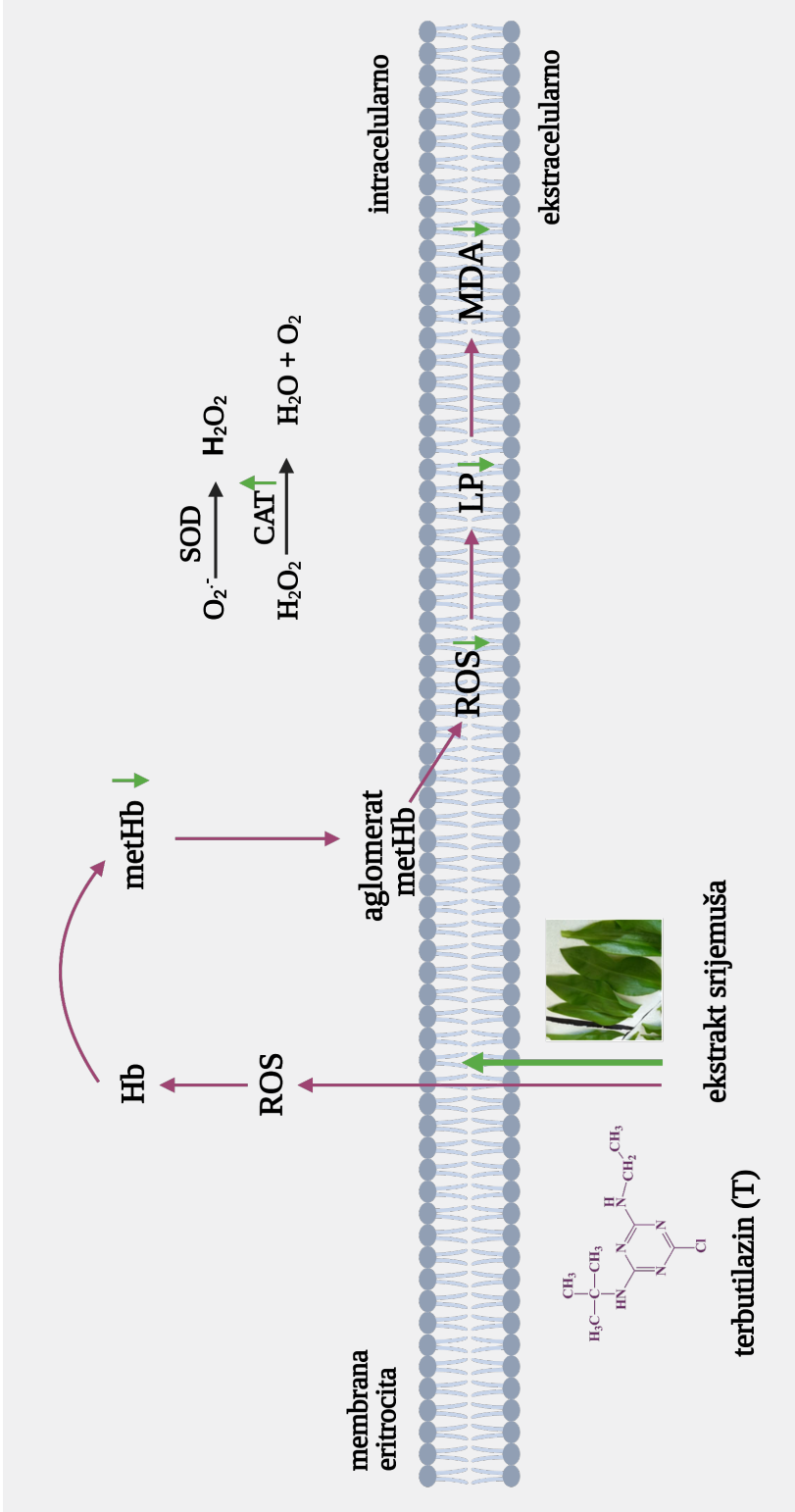
Slika 31. Nativni gel sa razdvojenim SOD1 (SOD1 A i SOD1 B) izoformama u lizatu humanih eritrocita: kontrola (o) i uzorci tretirani: ekstraktom srijemša, terbutilazinom (T) koncentracije 4,25 mg/L i zajedno sa 4,25 mg/L T i ekstraktom srijemša, inkubirani 1 čas na 37°C.



Slika 32. Nativni gel sa izoformom CAT-e u lizatu humanih eritrocita: kontrola (o) i uzorci tretirani: ekstraktom srijemša, terbutilazinom (T) koncentracije 4,25 mg/L i zajedno - 4,25 mg/L T i ekstrakt srijemša, inkubirani 1 čas na 37°C.

Pokazano je da kod oboljelih od ateroskleroze, nakon kontinuiranog konzumiranja ekstrakta srijemuša, dolazi do značajnog smanjenja koncentracije MDA-a u eritrocitima, bez promjena u SOD1 i CAT-e aktivnosti prije i poslije tretmana (Durak i sar., 2004). Zaštitni efekti biljnih ekstrakata, vodeni ekstrakt aloe (*Aloe vera*) i butanolni ekstrakt alžirskog čaja (*Paronychia argentea*), detektovani su nakon tretmana insekticidima *in vivo*, na nivou lipidne peroksidacije i aktivnosti antioksidativnih enzima (Zama i sar., 2007, Gupta i sar., 2020). Antioksidativni efekat na eritrocite imaju pojedina fenolna jedinjenja (kvercetin, rutin, resveratrol i katehin) nakon *in vitro* tretmana sa insekticidom bifentrinom, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i organohlornim pesticidom pentahlorofenolom (Sadowska-Woda i sar., 2010; Revin i sar., 2019; Maheshwari i Mahmood, 2020). Intenzitet lipidne peroksidacije je bioindikator oksidativnog stresa izazvan različitim vrstama pesticida (Ali i sar., 2014). Pored toga, nivoi MDA mogu ukazivati na stepen zaštitnog efekta antioksidanata nakon izlaganja eritrocita pesticidima (Sadowska-Woda i sar., 2010; Mossa i sar., 2014; Revin i sar., 2019; Maheshwari i Mahmood 2020).

Na osnovu dobijenih rezultata u radu Davidović-Plavšić i sar., (2021), mehanizam djelovanja terbutilazina (Slika 33), pretpostavlja se da terbutilazin u humanim eritrocitima izaziva formiranje ROS-a, a ROS indukuje oksidaciju Hb do metHb (Sosnowska i sar., 2013). MetHb se agregira i vezuje za membrane humanih eritrocita (Welbourn i sar., 2017), što može biti izvor ROS-a u membranama. Nastali ROS u membranama eritrocita indukuju peroksidaciju lipida i povećavaju koncentraciju MDA. Fenolna jedinjenja u ekstraktu srijemuša najvjerovatnije djeluju na nivou membrana humanih eritrocita smanjenjem nivoa ROS-a i posljedično dovodi do smanjenja koncentracije MDA-a i nivoa oksidovanog Hb-a (Slika 33).



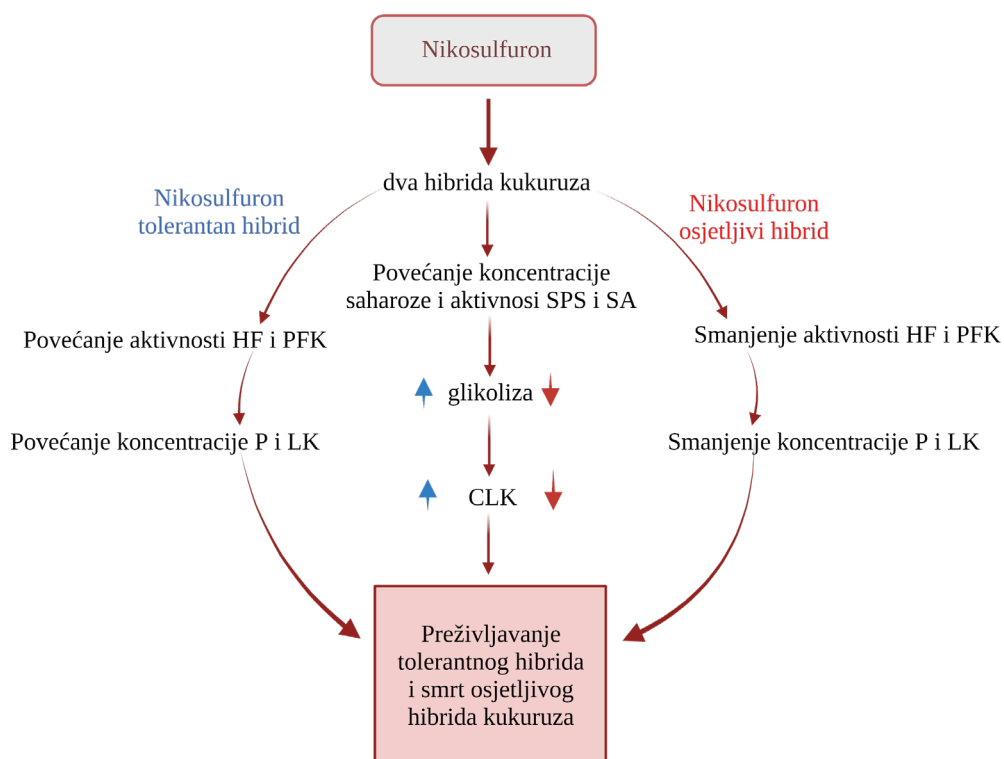
Slika 33. Predložena šema djelovanja terbutilazina i ekstrakta srijemuša na humane eritrocite. Ljubičaste i zelene strelice predstavljaju put djelovanja terbutilazina i ekstrakta srijemuša, respektivno prema Davidović-Plavšić i saradnici (2021).  
 Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).

### 3.12 Uticaj nikosulfurona na kukuruz

Nikosulfuron je efikasan, bezopasan i selektivan u malim koncentracijama (Xu i sar., 2022). Ostaci nikosulfurona u zemljištu i rijekama razgrađuju se hidrolizom i aktivnošću mikroorganizama zbog čega je manja toksičnost ovog herbicida za sljedeću generaciju usjeva (Wang i sar., 2011). Efekti tretiranja kukuruza nikosulfuronom veoma su različiti. Neki hibridi kukuruza su veoma otporni (tolerantni), dok su neki veoma osjetljivi (Wang i sar., 2018). Tolerantni hibridi kukuruza obično mogu razgraditi nikosulfuron do neaktivnih jedinjenja ili konjugovati herbicid sa glukozom. Tretmani nikosulfuronom na različite hibride uglavnom pokazuju iste efekte u ranoj fazi - hlorozu i etiolaciju, što rezultuje pojavom ljubičastih listova. U daljem rastu biljke, novi listovi dobijaju uvijen izgled. Takođe, rast biljke je inhibiran i mogu se pojaviti sekundarne stabljike. Vremenom, osjetljivi kukuruz prestaje da raste, stabljike postaju ljubičaste, listovi žute i biljka na kraju umire (Wang i sar., 2018). Na ćelijskom nivou, nikosulfuron inhibira fotosintezu jer dovodi do narušavanja strukture hloroplasta, smanjuje usvajanje ugljenika, smanjena je apsorpcija svjetlosti kao i transport elektrona kroz fotosisteme, rezultat je smanjena sinteza energije i NADPH neophodnih za biosintetske aktivnosti ćelije (Xu i sar., 2022 i reference u okviru rada). Stepen razgradnje nikosulfurona u tolerantnim biljkama je viši u odnosu na osjetljive biljke, što za posljedicu ima da nikosulfuron u osjetljivim biljkama indukuje osmotski stres i povećanu proizvodnju ROS-a (Wang i sar., 2018; Xu i sar., 2022). Mehanizmi koji dovode do tolerantnosti biljaka na tretman nikosulfuronom uključuju: povećanje neto fotosinteze, kontrolisanu proizvodnju ROS-a aktiviranjem antioksidativnog metabolizma i aktiviranje drugih zaštitnih mehanizama (regulacija osmotskog potencijala, detoksikacija) (Wang i sar., 2018). Ugljeni hidrati kao proizvodi fotosinteze imaju važnu ulogu u strukturi i

metabolizmu u svim živim ćelijama. Akumulacija ugljenih hidrata je mehanizam kojim biljke odgovaraju na različite vrste abiotičkog stresa jer doprinose osmoregulaciji i zaštiti biomolekula. U radu Xu i sar., (2022), ispitan je uticaj nikosulfurona (80 mg/kg) na dva hibrida slatkog kukuruza (*Zea mais* L.): HK301 (tolerantan na nikosulfuron) i HK320 (osjetljiv na nikosulfuron). Nikosulfuron je primijenjen prskanjem biljaka starosti 30 dana u fazi razvoja četvrtog lista. Autori su pokazali na osnovu visine biljaka, dužine korijena i broja korijena da nikosulfuron inhibira, u različitom stepenu rast dva hibrida. Dobijeni rezultati sugerišu da osjetljivi i tolerantni hibridi imaju različitu osjetljivost na nikosulfuron. Smanjenje rasta u uslovima stresa izazvanog nikosulfuronom, može biti posljedica smanjene fotosintetske aktivnosti i oksidativnog stresa. Saharoza, kao glavni proizvod fotosinteze, povezana je sa rastom, razvojem, skladištenjem, signalizacijom, adaptacijom na stres, prenosom ugljenika, i smatra se ključnim šećerom u životnim ciklusima biljaka. Sadržaj saharoze i aktivnosti enzima uključenih u metabolizam saharoze (saharoza fosfat sintaze i saharoza sintaze) u oba hibrida različito su se mijenjali u uslovima stresa izazvanog nikosulfuronom. U tolerantnom hibridu, sadržaj saharoze i aktivnosti saharoza fosfat sintaze i saharoza sintaze značajno su se povećali, dok je kod osjetljivog hibrida došlo do poremećaja u metabolizmu šećera (Xu i sar., 2022). Heksokinaza i fosfofruktokinaza su enzimi glikolize: heksokinaza katalizuje fosforilaciju glukoze i nastanak glukoza-6-fosfata, dok fosfofruktokinaza katalizuje prevođenje fruktoza-6-fosfata u fruktoza-1,6-bifosfata. Piruvat je krajnji proizvod glikolize, dok je limunska kiselina međuproizvod ciklusa limunske kiseline. Promjene u koncentraciji piruvata i limunske kiseline ukazuju na ukupan protok kroz glikolizu i ciklus limunske kiseline, odnosno energetski metabolizam (Xu i sar., 2022). Nakon tretmana nikosulfuronom, aktivnosti heksokinaze i 6-fosfofruktokinaze, kao i sadržaj piruvata

i limunske kiseline u osjetljivom hibridu, značajno su se smanjile u odnosu na tolerantni hibrid. Autori su pokazali da su glikoliza i ciklus limunske kiseline intenzivirani u tolerantnom hibridu u uslovima povećane koncentracije nikosulfurona i da omogućavaju tolerantnost na tretman herbicidom (Slika 34).



Slika 34. Uticaj nikosulfurona na dva hibrida kukuruza: nikosulfuron tolerantan i nikosulfuron osjetljiv. Skrćenice: HF-heksokinaza, PFK-fosfofrukto kinaza, P-piruvat., LK-limunska kiselina; CLK-ciklus limunske kiseline (modifikovano prema Xu i sar., 2022).

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

Nikosulfuron se često koristi u zasadima kukuruza na našim područjima. Uticaj nikosulfurona (150 µg/mL i 250 µg/mL) na kukuruz (dva hibrida, ZP 555 i ZP 606) ispitan je u radu Kuvelja i sar., (2021). Kukuruz gajen hidroponično, nakon sedam dana rasta tretiran je nikosulfuronom u trajanju od četiri dana. Rezultati su



pokazali da nikosulfuron utiče na svježiu i suhu masu lista i korijena oba hibrida, ali da promjene uglavnom nisu statistički značajne. Statistički značajne razlike uočene su u sadržaju svježie i suve mase između hibrida nakon tretmana nikosulfurnom u koncentraciji od 150 µg/mL. Ukupna koncentracija hlorofila kod hibrida ZP 606, u uzorcima koji su tretirani nikosulfuronom, smanjila se sa povećanjem koncentracije nikosulfurona, ali smanjenje nije bilo statistički značajno. Kod hibrida ZP 555 izmjereno je povećanje koncentracije hlorofila kod oba tretmana u odnosu na kontrolu, ali bez statističkog značaja. Nikosulfuron je uticao na rast i fotosintetske parametre hibrida kukuruza ZP 555 i ZP 606, kao što je pokazno i u radu Xu i sar., (2022). Niže koncentracije herbicida mogu dovesti do povećanja sinteze proteina kao odgovor na oksidativni stres izazvan herbicidom (Zhou i sar., 2007). U uzorcima lista kod oba hibrida, nikosulfuron je doveo do smanjenja sadržaja proteina. U uzorcima korijena, tretiranim nižim koncentracijama nikosulfurona, izmjereno je povećanje koncentracije proteina kod ZP 555, dok je kod hibrida ZP 606 izmjereno povećanje koncentracije proteina za obje koncentracije nikosulfurona (Kovelja i sar., 2021). Kod oba hibrida, za list i korijen uočena je tendencija porasta koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod većine uzoraka u odnosu na kontrolne, što ukazuje da nikosulfuron dovodi do indukcije oksidativnog stresa kao što je pokazano u radu Wang i sar., (2018). Odgovor biljaka na oksidativni stres ogledao se u indukciji promjena u antioksidativnom sistemu zaštite. Specifična aktivnost POX-a se povećala u uzorcima listova kod oba hibrida na nižim koncentracijama nikosulfurona, dok je sa porastom koncentracije herbicida došlo do smanjenja POX aktivnosti, ali su one i dalje bile povećane u odnosu na kontrolu (Kovelja i sar., 2021). U listovima oba hibrida tretman nižom koncentracijom nikosulfurona je doveo do povećanja specifične aktivnosti APX-a, dok je sa povećanjem koncentracije herbicida u listovima ZP 555 došlo do smanjenja APX

aktivnosti, a kod hibrida ZP 606 do povećanja. U uzorcima korijena ZP 555, tretman sa obje koncentracije nikosulfurona doveo je do značajnog smanjenja APX-a aktivnosti. Promjene u aktivnosti APX ukazuju na značaj ovog enzima pri odbrani biljke od oksidativnog stresa (Yabuta i sar., 2004). Fenolna jedinjenja su važne komponente antioksidativnog sistema odbrane, i jedan od adaptivnih mehanizama na povećanu koncentraciju herbicida jeste indukcija sinteze fenolnih jedinjenja (Huseynova i sar., 2017). Sadržaj fenolnih jedinjenja u listovima hibrida ZP 606 povećavao se sa nižom koncentracijom nikosulfurona i smanjio nakon tretmana višom koncentracijom nikosulfurona, pri čemu je koncentracija fenolnih jedinjenja bila viša u odnosu na kontrolni uzorak. S druge strane, u listovima hibrida ZP 555, koncentracija fenolnih jedinjenja bila je smanjena u odnosu na kontrolu nakon tretmana objema koncentracijama nikosulfurona (Kovelja i sar., 2021). I drugi autori su pokazali da nikosulfuron i terbutilazin utiču na rast kukuruza što može biti posljedica toksičnosti i oksidativnog stresa izazvanih herbicidima (Wang i sar., 2018; Yu i sar., 2021). U radu Kovelja i saradnika (2021) pokazano je da nikosulfuron utiče na parametre rasta, fotosintetske parametre, indukuje oksidativni stres povećanjem koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i indukuje promjene antioksidativnog sistema zaštite kod oba hibrida kukuruza. Intenzitet uticaja nikosulfurona zavisio je od njegove primijenjene koncentracije i primijećene su razlike u odgovoru hibrida pri čemu se, na osnovu izmjerenih parametara, ne može sa sigurnošću tvrditi koji je hibrid osjetljiviji/tolerantniji na prisustvo nikosulfurona.

## 4. UTICAJ METALA NA ĆELIJE I ORGANIZME

Metali se akumuliraju u ekološkom lancu ishrane kroz unos na nivou biljaka, primarnih proizvođača, a zatim kroz potrošnju na nivou potrošača, dok je korijenje biljaka primarno kontaktno mjesto za jone teških metala. U vodenim sistemima, biljke su izložene teškim metalima pri čemu se apsorbuju direktno u listove zbog čestica taloženih na folijarnim površinama.

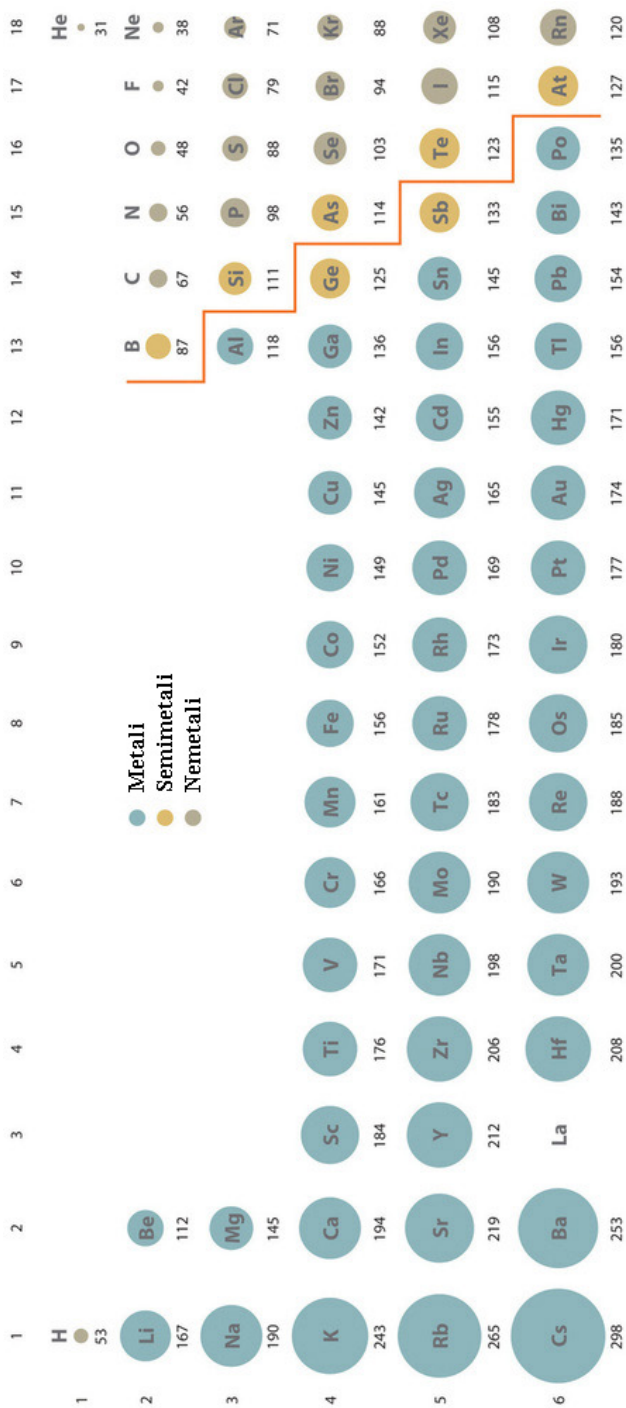
Toksičnost teških metala posljedica je njihove povišene koncentracije ili je njihovo prisustvo nepoželjno i pri vrlo niskim koncentracijama, tj. u tragovima. Koncentrišu se kao rezultat aktivnosti izazvanih ljudima i ulaze u biljna, životinjska i ljudska tkiva putem inhalacije, ishrane i rukovanja i mogu da se vežu za vitalne ćelijske komponente i ometaju njihovo funkcionisanje. Teški metali su značajni zagađivači životne sredine, a njihova toksičnost je problem sve većeg značaja iz ekoloških, evolucionih i nutritivnih razloga.

### 4.1 Atomski i jonski radijusi

U periodnom sistemu elemenata, atomski radijusi se smanjuju slijeva na desno (redovi) i povećavaju od vrha do dna (kolone). Zbog ova dva trenda, najveći atomi se nalaze u donjem lijevom uglu periodnog sistema, a najmanji u gornjem desnom uglu (Slika 35).

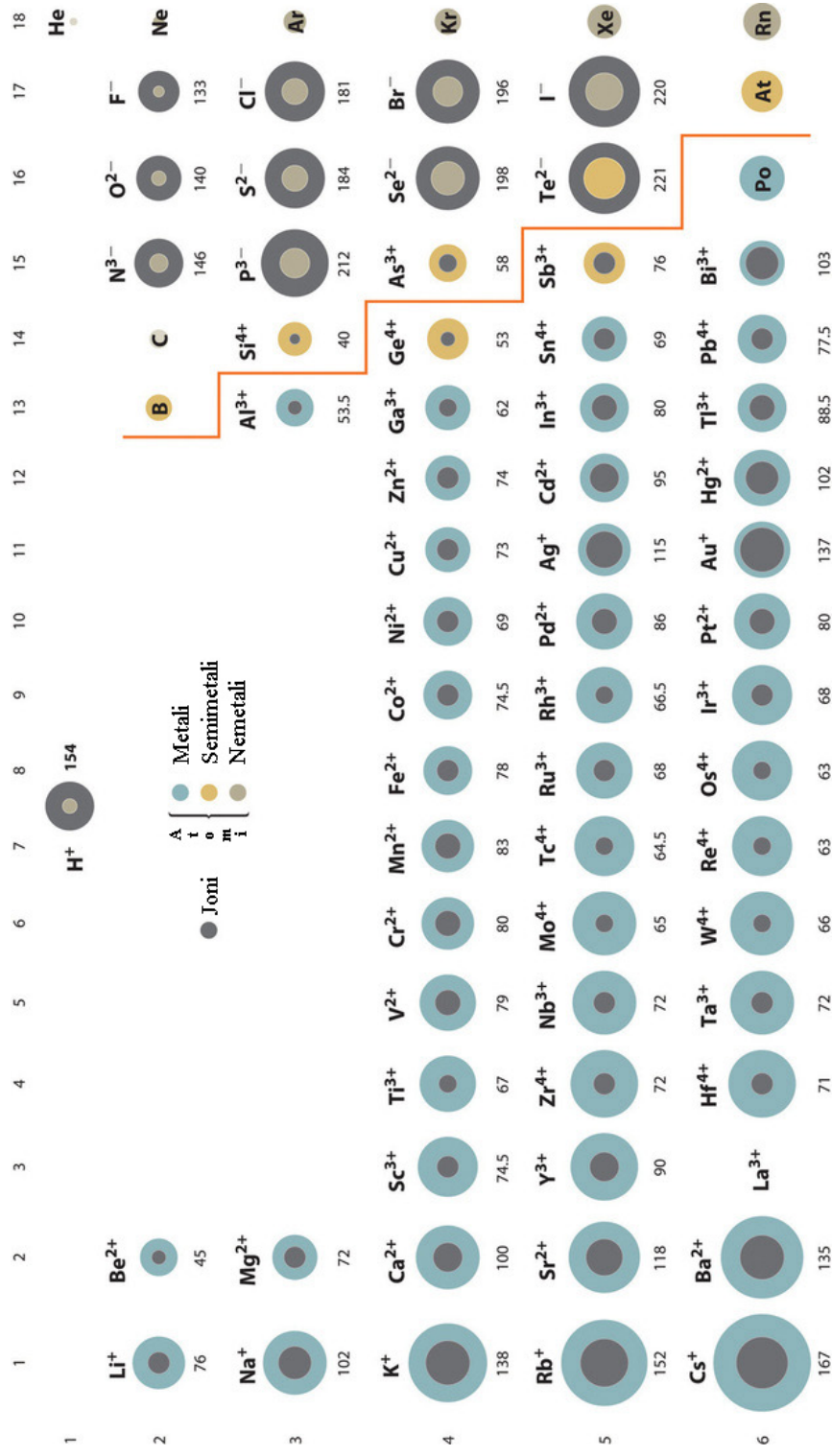
Poređenje jonskih radijusa sa atomskim radijusima (Slika 36) pokazuje da je katjon, koji je izgubio elektron, uvijek manji od svog roditeljskog neutralnog atoma, a anjon, nakon što je dobio elektron, uvijek je veći od roditeljskog neutralnog atoma. Kada se jedan ili više elektrona ukloni iz neutralnog atoma, dešavaju se dvije stvari: 1) odbijanja između elektrona u istoj glavnoj ljusci se smanjuju jer je prisutno manje elektrona, i 2) efektivno nuklearno naelektrisanje koje osjećaju preostali elektroni povećava se jer ima manje elektrona koji štite jedan drugog od uticaja jezgra. Prema tome, veličina oblasti

prostora koju zauzimaju elektroni se smanjuje i jon se smanjuje (npr. Li ima atomski radijus 167 pm dok  $\text{Li}^+$  ima jonski radijus 76 pm).



Slika 35. Izračunati atomski radijusi (u pikometrima) s-, p- i d- blok elemenata. Veličine krugova ilustruju relativne veličine atoma. Izračunate vrijednosti zasnovane su na kvantnomehničkim talasnim funkcijama<sup>19</sup>.

<sup>19</sup> Izvor: [www.webelements.com https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General\\_Chemistry/Map%3A\\_Chemistry\\_-\\_The\\_Central\\_Science\\_\(Brown\\_et\\_al.\)/07%3A\\_Periodic\\_Properties\\_of\\_the\\_Elements/7.03%3A\\_Sizes\\_of\\_Atoms\\_and\\_Ions](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_Chemistry_-_The_Central_Science_(Brown_et_al.)/07%3A_Periodic_Properties_of_the_Elements/7.03%3A_Sizes_of_Atoms_and_Ions)



Slika 36. Jonski radijusi (u pikometrima) najčešćih jonskih stanja elemenata. Sivi krugovi označavaju veličine prikazanih jona; obojeni krugovi označavaju veličine neutralnih atoma (Shannon, 1976).

Ako se različit broj elektrona može ukloniti da bi nastali joni sa različitim naelektrisanjem, jon sa najvećim pozitivnim naelektrisanjem je najmanji (npr. jonski radijus  $\text{Fe}^{2+}$  je 78 pm dok je  $\text{Fe}^{3+}$  64,5 pm). Suprotno tome, dodavanje jednog ili više elektrona neutralnom atomu uzrokuje povećanje odbijanja elektrona i smanjenje efektivnog nuklearnog naelektrisanja, tako da se veličina regiona verovatnoće povećava i jon se širi (npr. atomski radijus F je 42 pm dok  $\text{F}^-$  je 133 pm).

Gubitkom ili dodavanjem elektrona elementima, mogu nastati katjoni ili anjoni čiji su jonski radijusi slični jonskim radijusima nekih drugih elemenata u jonskom stanju koji su udaljeni u periodnom sistemu (unutar iste periode ili druge grupe). To može dovesti do zamjene tj. istiskivanja jona kada su joni jednih elementata prisutni u mnogo većoj koncentraciji u odnosu na druge jone elemenata sličnih jonskih radijusa. Kao primjer se može navesti istiskivanje  $\text{Pb}^{2+}$  (77,5 pm) iz kostiju suplementacijom  $\text{Zn}^{2+}$  (74 pm) i suprotno, akumulacija  $\text{Pb}^{2+}$  u kostima kada je prisutan mali nedostatak  $\text{Zn}^{2+}$  (Jamieson i sar., 2006). Takođe, istovremena primjena Zn i Pb, koji se vežu za slična mjesta na enzimima, dovodi do smanjenja inhibicije enzima izazvanim Pb, što sugerise da primjena Zn potiskuje toksične efekte olova (Flora i sar., 1989, 1991).

## 4.2 Osobine teških metala i njihova uloga u živim organizmima

Teški metali su prirodni elementi koji imaju veliku atomsku masu i gustinu koja je veća od  $5 \text{ g/cm}^3$  (Khanna i sar., 2018). Za većinu teških metala karakteristična su metalna svojstva: duktilnost, savitljivost, provodljivost, zatim stabilnost katjona i specifičnost za ligande (Raskin i sar., 1994). Teški metali se smatraju elementima u tragovima zbog prisustva u različitim sferama životne sredine u koncentracionom opsegu od ppb do ppm (Banuelos i Ajwa, 1999). Teški metali su grupa

elemenata koja uključujuje Cu, Mn, Pb, Cd, Ni, Co, Fe, Zn, Cr, Mo, V, As, Ag, Pt i druge. Teški metali kao što su Co, Cu, Cr, Fe, Ni, Mg, Mn, Mo, Se i Zn su biogeni esencijalni nutrijenti koji su potrebni u malim količinama za različite biohemijske i fiziološke funkcije (WHO, 1996). Neki teški metali važni su sastojci pigmenata i kofaktori enzima (Zn, Mn, Ni i Cu). Kofaktori nekoliko ključnih enzima imaju važnu ulogu u različitim oksido-redukcionim reakcijama (WHO, 1996). Bakar je, na primjer, esencijalni kofaktor enzima povezanog sa oksidativnim stresom, superoksid dismutazom, citohrom c oksidazom, feroxidazom. Takođe, Cu je kofaktor metaloenzima uključenih u formiranje hemoglobina, metabolizam ugljenih hidrata, biosintezu kateholamina i unakrsno povezivanje kolagena, elastina i keratina za kosu. Sposobnost izmjene bakra između oksidovanog Cu(II) i redukovanog Cu(I) stanja, koriste kuproenzimi uključeni u redoks reakcije (ATSDR - Agencija za toksične supstance i registar bolesti - engl. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 2004; Harvey i McArdle, 2008; Stern, 2010). Međutim, upravo ovo svojstvo bakra čini ga potencijalno toksičnim jer prelazi između Cu(II) i Cu(I) mogu dovesti do stvaranja superoksid anjon radikala i hidroksilnog radikala (ATSDR, 2004; Harvey i McArdle, 2008; Tchounwou i sar., 2008; Stern, 2010).

Prekomjerno izlaganje bakru povezano je sa oštećenjem ćelija koje dovodi do Vilsonove bolesti kod ljudi (ATSDR, 2004; Tchounwou i sar., 2008). Slično bakru, i drugi esencijalni elementi kao što su cink, mangan, kobalt i gvožđe neophodni su za funkcionisanje ljudskog tijela, ali su toksični kada njihova koncentracija postane previsoka (Asubiojo i sar., 1997). Za neke teške metale, uključujući Cr i Cu, postoji veoma uzak opseg koncentracija između korisnih i toksičnih (Tchounwou i sar., 2008; Nordberg i sar., 2014). Neadekvatno snabdijevanje organizama ovim mikronutrijentima dovodi do različitih bolesti ili sindroma nedostatka (WHO, 1996). Ostali metali kao što su Al, Sb, As Ba, Be, Bi, Cd, Ga, Ge, Au, In, Pb, Li, Hg, Pt, Ag,

Sr, Te, Tl, Sn, Ti, V i U nemaju utvrđene biološke funkcije i smatraju se neesencijalnim metalima (Nordberg i sar., 2014).

#### **4.2.1 Izvori teških metala u životnoj sredini**

Teški metali prirodno su prisutni i sveprisutni u zemljinoj kori. Ovi elementi su najstarije toksične supstance za ljude, a koriste se u različite svrhe posljednjih nekoliko decenija. Nekoliko prirodnih i antropogenih procesa uključeno je u obezbjeđivanje ulaska teških metala u životnu sredinu (Shallari i sar., 1998; Bradl, 2002; Waalkes i sar., 2007; Sträter i sar., 2010; Martin, 2012). Najznačajniji prirodni izvori su erozija, prirodna potrošnja minerala i vulkansko djelovanje, dok antropogeni izvori uključuju topljenje metala, rudarstvo, galvanizaciju, korišćenje pesticida, đubriva i biočvrstih materija u poljoprivredi, odlaganje mulja, neplansko zbrinjavanje komunalnog otpada, industrijsko oslobađanje, atmosfersku fiksaciju, itd. (Modaihsh i sar., 2004; Chehregani i Malaieri 2007; Fulekar i sar., 2009; Wuana i Okieimen, 2011). Akumulacija teških metala u zemljištu zabrinjavajuća je u poljoprivrednoj proizvodnji zbog štetnog djelovanja na sigurnost i kvalitet hrane; tržišnost i rast usjeva zbog fitotoksičnosti te opstanka mikroorganizama u zemljištu.

Antropogeni izvori nekih toksičnih teških metala sumirani su u Tabeli 9.

Do zagađenja životne sredine teškim metalima može doći putem korozije metala, atmosferskog taloženja, erozije metalnih jona iz tla i ispiranjem teških metala, ponovnom suspenzijom sedimenta i isparavanjem metala iz vodnih resursa u zemljište i podzemne vode (Nriagu, 1989).

#### **4.2.2 Biorasploživost i toksičnost teških metala**

Uticaj teških metala na ljude i druge organizme zavisi od njihove koncentracije, toksičnosti i biorasploživosti, odnosno od stepena do kojeg se apsorbuju u krvi ili skladište u unutrašnjim organima.



**Tabela 9. Neesencijalni teški metali najčešće prisutni u povećanim koncentracijama u životnoj sredini, koji su ujedno i najštetniji za ljudsko zdravlje, i njihovi izvori.**

Teški metali	Izvori	Reference
Cd	Galvanizacija, fosfatna đubriva, baterije, boje i pigmenti i plastični stabilizatori	Pulford i Votson, 2003; Mohod i Dhote, 2013.
As	Konzervansi i pesticidi za drvo	<a href="https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/overview-wood-preservative-chemicals">https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/overview-wood-preservative-chemicals</a> .
Pb	Upotreba herbicida i insekticida, emisija gasova iz sagorijevanja olovnih goriva i proizvodnja baterija	Wuana i Okieimen, 2011.
Hg	Medicinski otpad i upotreba pesticida, ribe i zubni amalgam	Memon i sar., 2001; Wuana i Okieimen, 2011; Rodrigues i sar., 2012.

Toksičnost i bioraspoloživost teškog metala djelimično zavise od temperature kao i od reaktivnosti i rastvorljivosti, koje su određene specijacijom ili hemijskim oblikom elementa. Termin „specijacija“, kako se ovdje koristi, odnosi se na 1) identitet elementa, 2) oksidaciono stanje elementa, 3) fizičko stanje elementa [tj. faznu povezanost; prisustvo u tečnoj, gasovitoj ili čvrstoj fazi (amorfnoj ili kristalnoj), koloidnoj čestici, životinjskoj ili biljnoj ćeliji ili biofilmu, prisustvo u vidu površinskog premaza ili tankog filma na čvrstoj supstanci, kao sorpcioni kompleks (monomerni ili polimerni) na čvrstoj, koloidnoj čestici ili organskoj supstanci; itd.], 4) empirijsku formulu elementa i 5) detaljnu molekularnu strukturu elementa (Brown i sar., 1999). Bioraspoloživost određuje kinetiku kompleksiranja, rastvorljivost u lipidima i particioni koeficijent oktanol/voda (Hamelink i sar., 1994).

Na primjer, hrom u obliku Cr (VI) javlja se kao tetraedarski oksoanjon u vodenom rastvoru, prilično je rastvorljiv i pokretljiv u podzemnim i površinskim vodama i toksičan je za organizme. Nasuprot tome, kada je u obliku Cr (III), hrom je vezan za šest kiseonika u oktaedarskom kompleksu, relativno je nerastvorljiv i nepokretan i predstavlja mali rizik za organizme. Takođe, kompleks Cu (II) sa 8-hidroksihinolinom, rastvorljiv u organskim rastvaračima, veoma je toksičan za alge, dok je njegov sulfonatni derivat rastvorljiv u vodi i znatno je manje toksičan (Florence, 1983; Merian i Clarkson, 1991).

Teški metali ispoljavaju svoj toksični efekat u reakciji sa reaktivnim grupama ćelijskih makromolekula neophodnih za normalne fiziološke funkcije. Reaguju sa grupama koje sadrže kiseonik (-OH, -COO, -OPO<sub>3</sub>H, >C=O), sumpor (-SH, -S-S-) i azot (-NH<sub>2</sub> i >NH) i utiču na organizam interakcijom sa esencijalnim metalima formiranjem metal-protein kompleksa, pri čemu na intezitet reakcije utiču faktori kao što su starost i stadijum razvoja organizma, načina života, imuni status organizma (Nolan, 2003; Young, 2005; Duruibe i sar., 2007). U biološkim sistemima teški metali mogu da utiču na ćelijske membrane i organele: mitohondrije, lizosome, endoplazmatski retikulum, jedro i enzime uključujući u metabolizam, detoksikaciju i popravku oštećenja (Wang i Shi, 2001). Utvrđeno je da metalni joni stupaju u interakciju sa ćelijskim komponentama kao što su DNK i nuklearni proteini, uzrokujući oštećenje DNK i konformacione promjene koje mogu dovesti do promjene u ćelijskom ciklusu, karcinogeneze ili apoptoze (Wang i Shi, 2001; Beyersmann i Hartwig, 2008; Nordberg i sar., 2014). Nastanak ROS-a i oksidativni stres igraju ključnu ulogu u toksičnosti i karcinogenosti metala kao što su As (Tchounwou i sar., 2004a; Yedjou i Tchounwou, 2006; Yedjou i Tchounwou, 2007), Cd (Tchounwou i sar., 2001), Cr (Patlolla i sar., 2009a; Patlolla i sar., 2009b), Pb (Yedjou i Tchounwou, 2007; Tchounwou i sar., 2007) i Hg (Sutton i sar., 2002; Sutton i Tchounwou, 2007). Zbog visokog

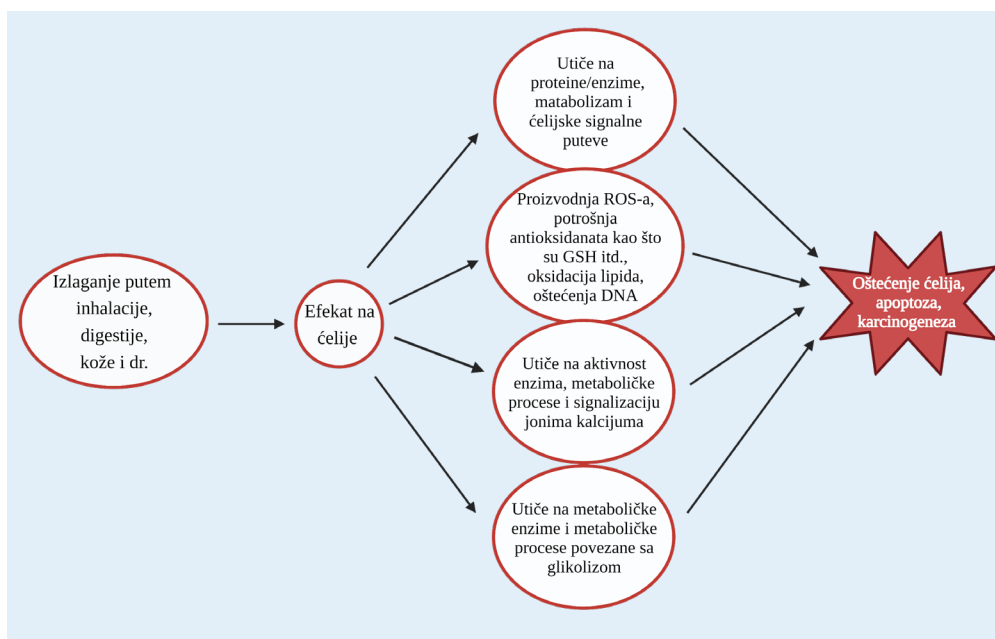
stepena toksičnosti, ovih pet elemenata svrstavaju se u prioritetne metale koji imaju veliki javno-zdravstveni značaj. Svi ovi elementi su sistemski toksične supstance za humani organizam, za koje je poznato da izazivaju višestruko oštećenje organa, čak i pri izloženosti nižim koncentracijama. Prema Agenciji za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država (US EPA) i Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC, engl. *International Agency for Research on Cancer*), ovi metali su klasifikovani kao „poznati“ ili „vjerovatni“ karcinogeni za ljude na osnovu epidemioloških i eksperimentalnih studija, koje pokazuju povezanost između izloženosti i incidencije raka kod ljudi i životinja.

Toksičnost i karcinogenost izazvana teškim metalima uključuju u mnoge aspekte mehanizma djelovanja, od kojih neki nisu jasno razjašnjeni ili shvaćeni. Međutim, poznato je da svaki metal ima jedinstvene karakteristike i fizičko-hemijska svojstva koja daju njegove specifične toksikološke mehanizme djelovanja. Zbog toga su važni podaci koje pružaju analiza prirodnog pojavljivanja, proizvodnje i upotrebe u životnoj sredini, potencijal za izlaganje ljudi i molekularni mehanizam toksičnosti, genotoksičnosti i karcinogenosti (Tchounwou i sar., 2012).

Teški metali kao što su, Cd, As, Pb i Hg nemaju korisne efekte na organizme i zbog toga su vrlo štetni za biljke, životinje i čovjeka; zagađuju sredinu, vazduh, vodu i zemljište; mogu biti otrovni za živa bića i dovesti do oštećenja na ćelijskom i sistemskom nivou. Akumulacija teških metala kao što su Pb, As, Hg, Cd i Ni, mogu narušiti glavne metaboličke procese u ljudskom tijelu (Slika 37).

Poznato je da Cd ometa unos Ca smanjenjem aktivnosti  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaze (Reddy i sar., 1988; Wong i Wong, 2000), što rezultira smanjenjem nivoa Ca u organizmu (Sauer i Vatabe, 1988; Verbost i sar., 1989). S druge strane, Cu utiče uglavnom na kinetiku i koncentraciju Na i Cl (Pelgrom i sar., 1995; Sloman, 2003) narušavanjem aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, što dovodi do poremećaja osmolarnosti (Grosell i sar., 2004). Joni Cd vezuju se za tiolne (-SH) grupe proteina, cisteina

i glutationa i inhibiraju funkciju ovih biomolekula. U izvjesnoj mjeri  $\text{Cd}^{2+}$  može oponašati kalcijum ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Baldisserotto i sar., 2004). Na primjer,  $\text{Cd}^{2+}$  može da se deponuje u kostima i vezuje  $\text{Ca}^{2+}$  vezujuće proteine. Takođe, joni Pb mogu da zauzmu mjesta vezivanja Ca na brojnim proteinima zavisnim od Ca. Cd i Pb se vezuju za kalmodulin, senzorni protein slobodnog Ca, koji utiče na mnoge ćelijske funkcije (Behra, 1993). Poznato je da Cd smanjuje aktivnost različitih enzima oksidativnog metabolizma: citrat sintaze (Couture i Kumar, 2003), sukcinat dehidrogenaze (SDH), glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PDH) (Gargiulo i sar., 1996) i laktat dehidrogenaze (LDH) (Hilmy i sar., 1985).



Slika 37. Mogući mehanizmi toksičnosti kod ljudi izazvani teškim metalima koji su najčešće prisutni u povećanim koncentracijama u životnoj sredini (Izvor Fu i sar., 2019).

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

Prema Osmanu i sar., (2007), Pb indukuje smanjenje aktivnosti tri važna metabolička enzima: G6PDH, LDH i piruvat kinaze (PK). I Cd i Pb remete sintezu hemoglobina inhibicijom dva važna enzima:

ferohelataze i dehidrataze delta levulinske kiseline (Nakagawa i sar., 1995; Caldwell i Phillips, 1998). Podaci različitih autora koje su prikupili Jezierska i Viteska (2001), ukazuju da teški metali mogu uticati i na druge enzime. Teški metali narušavaju endokrinu ravnotežu kod riba. Na primjer, za Cd je prijavljeno da smanjuje nivoe hormona štitne žlijezde (Hontela i sar., 1996), inhibira receptore estrogena (Guével i sar., 2000) i remeti ekspresiju hormona rasta (Jones i sar., 2001), dok olovo inhibira sintezu tiroidnih hormona utičući na metabolizam joda (Chaurasia i sar., 1996). Prooksidativna svojstva metalnih jona mogu dovesti do oksidativnog stresa kod riba i oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana. Kadmijum, bakar i olovo takođe imaju genotoksični efekat na ribe (Cavas i sar., 2005; Bagdonas i Vosylienė, 2006; Çavaş, 2008).

## 4.3 Esencijalni teški metali

### 4.3.1 Bakar (Cu)

#### 4.3.1.1 Izvori Cu

Bakar je metal koji se prirodno nalazi u životnoj sredini: u stijenama, zemljištu, vodi i vazduhu. Koristi se za izradu raznih vrsta proizvoda kao što su žica, vodovodne cijevi i lim. Bakar se kombinuje sa drugim metalima za pravljenje mesinganih i bronzanih cijevi i slavina. Jedinjenja bakra obično se koriste u poljoprivredi gdje ulaze u sastav pesticida za liječenje biljnih bolesti poput plijesni, za tretman vode i kao konzervansi za drvo, kožu i tkanine<sup>20</sup>. Koncentracije Cu su ~ 4 ppm u krečnjacima, 55 ppm u magmatskim stijenama, 50 ppm u pješčarima i 45 ppm u škriljcima. Izražene koncentracije bakra u škriljcima i pješčarima sugerišu da bakar u litosferi postoji uglavnom u obliku adsorbovanih jona, kao sitnozrnaste čestice ili kao jedan od mnogih, malo zastupljenih, sedimentnih minerala bakra<sup>21</sup>.

<sup>20</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Copper>

<sup>21</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Copper#section=Natural-Pollution-Sources>

### 4.3.1.2 Uloga Cu u živim organizmima

Bakar je esencijalni element prisutan u tragovima u biljkama i životinjama (uključujući čovjeka) i neophodan je za život. Životinje i čovjek moraju da apsorbiraju manje količine bakra iz zemljišta, odnosno da ga uzimaju putem jela i pića<sup>22</sup>. Unos bakra se dešava u strogo regulisanom procesu kroz specifične transportere bakra na plazma membrani visokog afiniteta ili permeaze niskog afiniteta (De Feo i sar., 2007; Kim i sar., 2008). Vezivanjem za proteine šaperona, omogućen je transport Cu u ćeliji.

Cu je kofaktor za nekoliko enzima (poznatih kao „kuproenzimi“) uključenih u proizvodnju energije, metabolizam Fe, aktivaciju neuropeptida, sintezu vezivnog tkiva i sintezu neurotransmitera (Erdman i sar., 2012; Ross i sar., 2020). Ceruloplazmin (CP) je protein koji je prisutan u velikim količinama i veže više od 95% ukupnog bakra u zdravoj ljudskoj plazmi, a ima ulogu i u metabolizmu Fe (Hellman i Gitlin, 2002).

Bakar je takođe uključen u mnoge fiziološke procese, kao što je: angiogeneza<sup>23</sup>, neurohormonska homeostaza, regulacija ekspresije gena, razvoj mozga, pigmentacija i funkcionisanja imunog sistema (Ross i sar., 2020). Pored toga, odbrana od oksidativnog oštećenja zavisi uglavnom od superoksid dismutaza koje sadrže bakar (Owen, 1982; Allen i Klevay, 1994). Prosječna ljudska ishrana obezbjeđuje Cu, oko 1,400 µg/dan za muškarce i 1,100 µg/dan za žene koja se prvenstveno apsorbira u gornjem dijelu tankog crijeva (Klevay, 2011; Erdman i sar., 2012; Rhodes i sar., 2017; Ross i sar., 2020). Samo male količine Cu obično se skladište u tijelu, a tijelo prosječne odrasle osobe sadrži od 50-120 mg bakra. Skoro dvije trećine Cu u

<sup>22</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Copper>

<sup>23</sup> fiziološki proces i prirodni odgovor tijela na ishemiju, koji se karakteriše rastom novih krvnih sudova iz već postojećih. Angiogeneza je integralni dio kako u normalnim razvojnim procesima u organizmu, tako i u brojnim patološkim stanjima kao što su tumorski rast i metastaziranje, inflamatorne i vaskularne bolesti, povrede i otvorene rane na tijelu.

tijelu nalazi se u skeletu i mišićima (Russell i sar., 2001; Ross i sar., 2020). Većina bakra se izlučuje putem žuči, a mala količina se izlučuje urinom. Ukupni fekalni gubici Cu žučnog porijekla i neapsorbovanog dijetalnog bakra iznose oko 1 mg/dan (Erdman i sar., 2012; Ross i sar., 2020). Nivoi bakra u tijelu homeostatski se održavaju apsorpcijom Cu iz crijeva i oslobađanjem Cu iz jetre u žuč kako bi se obezbijedila zaštita od nedostatka Cu i toksičnosti (Russell i sar., 2001).

Status Cu se ne procjenjuje rutinski u kliničkoj praksi i nisu identifikovani biomarkeri koji tačno i pouzdano procjenjuju status Cu (Erdman i sar., 2012). U studijama na ljudima obično se mjere koncentracija bakra i aktivnost „kuproenzima“ u plazmi i krvnim ćelijama jer osobe kod kojih je ustanovljen nedostatak bakra često imaju nizak nivo bakra i CP-a u krvi (Erdman i sar., 2012). Međutim, na nivo CP-a i bakra u plazmi mogu uticati i drugi faktori, kao što su nivo estrogena, trudnoća, infekcija, zapaljenje i neki karcinomi (Erdman i sar., 2012). Normalne koncentracije slobodnog bakra u serumu<sup>24</sup> su 1,6-2,4 μmol/L ili 10-15 μg/dL i 180–400 mg/L za CP<sup>25</sup>. Kod ljudi, preporučene dnevne količine bakra u ishrani<sup>26</sup> su od 0,9 do 1,3 mg.

### 4.3.1.3 Toksičnost Cu

Pretpostavlja se da je toksičnost Cu posljedica redoks reakcija Fentonovog tipa koje se javljaju pri visokim koncentracijama Cu. Tom prilikom se proizvode veće količine ROS-a koje u organizmu štetno djeluju (Bost i sar., 2016). Od ranije je dobro poznato da ROS imaju štetne efekte na ćelije, posebno oštećenje DNK i oksidacija proteina i lipida (Halliwell i Gutteridge 1990). Cu (I) i Cu (II) imaju visok afinitet za proteinska mjesta koja posjeduju bočne lance cisteina, metionina i histidina, deluju kao potencijalni ligandi koji dovode do

<sup>24</sup> <https://emedicine.medscape.com/article/2087780-overview>

<sup>25</sup> <https://healthjade.net/copper/>

<sup>26</sup> <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Copper-HealthProfessional/#en3>

izmještanja jona esencijalnih metala sa njihovih aktivnih mjesta, što rezultira pogrešnim uvijanjem proteina. Zbog toga, uzimanje Cu kao suplementa, praćeno apsorpcijom, transportom, distribucijom i konačno izlučivanjem iz tijela, mora biti strogo regulisano (O'Halloran i Culotta, 2000). Slučajno ili namjerno predoziranje organizma bakrom, može izazvati akutno oštećenje jetre, a hronično uzimanje većih količina bakra može dovesti do preopterećenja bakrom i hroničnog oštećenja jetre. Akutna hepatotoksičnost bakra obično je rezultat gutanja toksičnih količina (1 do 10 g). Prema klasifikaciji karcinogena<sup>27</sup> Cu pripada grupi D - ne može se klasifikovati u pogledu karcinogenosti kod ljudi. Jedinjenja bakra se ne mogu klasifikovati u pogledu karcinogenosti kod ljudi zbog nedostatka podataka o uticaju na ljude, neadekvatnih podataka o životinjama iz testova jedinjenja bakra i dvosmislenih podataka o mutagenosti. Kod djece može doći do slučajnog trovanja, posebno prilikom gutanja novčića. Početni simptomi mogu biti metalni ukus i gastrointestinalni distres zbog erozije želuca ili tankog crijeva. Akutna predoziranja bakrom mogu dovesti do ranog pojavljivanja kardiovaskularnog kolapsa, kome i smrti u roku od nekoliko sati. Oštećenje jetre ima tendenciju da nastane nakon 24 do 72 časa i karakteriše ga značajno povećanje nivoa aminotransferaza u serumu, minimalno povećanje aktivnosti alkalne fosfataze, rano pojavljivanje insuficijencije jetre i povećanje protrombinskog vremena i žutice. Ukupna klinička slika akutnog oštećenja jetre bakrom podsjeća na akutnu toksičnost Fe i Zn i može se izazvati na životinjama. Šok i rhabdomioliza (razgradnja mišićnog tkiva pri čemu se u krvotok oslobađa mioglobin, što može dovesti do oštećenja bubrega) mogu doprinijeti povećanju aktivnosti enzima aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) u serumu (Jo i sar., 2019), dok hemolitička anemija može da dovede do povećanja nivoa ukupnog bilirubina. Terapija predoziranja

<sup>27</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23978#section=Evidence-for-Carcinogenicity>



bakrom uključuje ispiranje želuca, nadoknadu tečnosti, dimerkaprol (protivotrov na bazi bakra) i penicilamin (helirajući agens koji se koristi za smanjenje zaliha bakra), uz transfuziju krvi za hemolitičku anemiju i dijalizu za akutnu bubrežnu insuficijenciju. Hronično oštećenje jetre usljed povećanog nivoa bakra javlja se kod Vilsonove bolesti, ali se javlja i nakon hroničnog prekomjernog uzimanja bakra i možda kao rezultat hronične izloženosti pojavama ili predmetima iz životne sredine, kao što je bakarna cijev koja se koristi u hemodijalizi<sup>28</sup>.

### 4.3.2 Gvožđe (Fe)

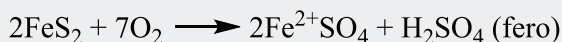
#### 4.3.2.1 Izvori Fe

Gvožđe je drugi najzastupljeniji metal u zemljinoj kori<sup>29</sup>. Prisustvo Fe u površinskim vodama je antropogenog porijekla i povezano je sa rudarskim aktivnostima. Proizvodnja sumporne kiseline i otpuštanje gvožđa (Fe<sup>2+</sup>) odvija se usljed oksidacije gvožđe disulfida (FeS<sub>2</sub>) koji je uobičajen u slojevima uglja (Valko i sar., 2005).

#### 4.3.2.2 Uloga Fe

Gvožđe je kofaktor za mnoge životno važne proteine i enzime (Valko i sar., 2005). Najzastupljeniji je element u tragovima u tijelu i neophodan je za većinu bioloških sistema (Abhilash i sar., 2013). Gvožđe je prelazni metal i značajan je za različite biološke redoks procese zbog izmjene između fero (Fe<sup>2+</sup>) i feri (Fe<sup>3+</sup>) oblika (Phippen i sar., 2008).

Sljedeće jednačine predstavljaju pojednostavljenu reakciju oksido-redukcije Fe jona (Phippen i sar., 2008):



<sup>28</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Copper>

<sup>29</sup> <https://sciencing.com/eight-abundant-elements-earths-crust-8120554.html>

Reakcije posredovane gvožđem omogućavaju proces disanja kod većine aerobnih organizama gdje Fe učestvuje kao kofaktor citohrom oksidaze. U ljudskom tijelu, Fe je prisutno u svim ćelijama i ima nekoliko vitalnih funkcija: prenosilac je kiseonika iz pluća do tkiva u obliku hemoglobina, omogućava korištenje i skladištenje kiseonika u obliku mioglobina u mišićima, omogućava transport elektrona u obliku citohroma unutar ćelija i sastavni je dio enzimskih reakcija u različitim tkivima. Takođe, Fe je kofaktor enzima uključenih u održanje redok homeostaze: katalaze, Fe superoksid dismutaze. Nedostatak Fe može narušiti vitalne funkcije i dovesti do morbiditeta i mortaliteta<sup>30</sup>. Najviše 3 do 4 grama elementarnog Fe kod odraslih nalazi se u hemoglobinu (Erdman i sar., 2012). Veliki dio preostalog Fe skladišti se u obliku feritina ili hemosiderina (proizvod razgradnje feritina) u jetri, slezini i koštanoj srži ili se nalazi u mioglobinu u mišićnom tkivu. Ljudi obično gube samo male količine Fe urinom, fecesom, gastrointestinalnim traktom i kožom. Gubici su veći kod žena u menstrualnom periodu zbog gubitka krvi. Heparin, cirkulišući peptidni hormon, ključni je regulator apsorpcije i distribucije Fe u cijelom tijelu, uključujući plazmu (Drakesmith i Prentice, 2012). U ishrani, gvožđe se nalazi u dva oblika: hem Fe i nehem Fe. Biljke i hrana obogaćena Fe, sadrže samo nehem Fe, dok meso, morski plodovi i živina sadrže i hem Fe i nehem Fe. Hem Fe, koje se formira kada se gvožđe vezuje sa protoporfirinom IX, čini 10% do 15% ukupnog unosa gvožđa u zapadnim populacijama (Erdman i sar., 2012). Kod odraslih, preporučeni unos Fe u ishrani<sup>31</sup> je 8 do 11 mg dnevno za muškarce i 8 do 18 mg za žene kod kojih se preporučuju viši nivoi Fe tokom trudnoće (27 mg dnevno). Fe se slabo apsorbuje i zalihe Fe u tijelu i u tkivu u velikoj su mjeri kontrolisane modifikovanjem stope apsorpcije. Adekvatne količine Fe nalaze se u većini namirnica koje se koriste u zapadnim zemljama, sa najvećim količinama u crvenom mesu i

<sup>30</sup> <https://medlineplus.gov/iron.html>

<sup>31</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548214/>

umjerenim količinama u ribi, živini, zelenom povrću i žitaricama od kojih su neke obogaćene Fe.

Organizmu je potrebna odgovarajuća količina Fe. Ako je premalo Fe, može se razviti anemija zbog nedostatka Fe. Nedostatak Fe obično je posljedica gubitka Fe, uglavnom kao rezultat gubitka krvi u gastrointestinalnom traktu ili zbog menstruacije, a rijetko je posljedica nedostatka unosa ili nemogućnosti da se apsorbuje dovoljno Fe iz hrane. Mala djeca i žene koje su trudne ili imaju menstruaciju sa većim su rizikom da imaju manji sadržaj Fe. Gvožđe je često u sastavu mnogih multivitaminskih i mineralnih suplemenata koji se koriste u liječenju anemije u terapijski preporučenoj dnevnoj dozi (1-2 mg). Dnevna hrana bi morala sadržati 12 do 15 mg gvožđa, jer se pokazalo da se iz hrane resorbuje od 2% do 15% unesenog Fe, a samo se oko 0,01% sadržaja Fe iz tijela eliminiše svakog dana (Albretsen, 2006). Samo gvožđe ima mali ili nikakav efekat u većim dozama za liječenje ili prevenciju anemije usljed nedostatka Fe bez redukcije  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$  u digestivnom traktu koje se dešava u prisustvu vitamina C ili -SH grupe proteina. Joni Fe se apsorbuju iz lumena crijeva u ćelije sluzokože. Fero oblik se bolje apsorbuje od feri oblika jer se feri oblik taloži iz rastvora pri pH 7 ili u normalnim fiziološkim uslovima (Ponka, i sar., 1990). Međutim, oba oblika se mogu apsorbovati ako su jonizovana (Hillman, 1990; Goyer i Clarkson, 1996). Pošto Fe mora biti jonizovano da bi se apsorbovalo, metalno gvožđe i oksid gvožđa (rđa) generalno ne izazivaju zabrinutost kada se progutaju (Goyer i Clarkson, 1996). Većina apsorpcije gvožđa dešava se u dvanaestopalačnom crijevu i gornjem jejunumu, ali kod životinja sa toksikozom Fe se dobro apsorbuje duž svih dijelova crijevnog trakta (Hillman, 1990; Goyer i Clarkson, 1996). Ishrana bogata šećerom i vitaminom C povećava apsorpciju Fe, dok ishrana sa visokim sadržajem fosfata smanjuje apsorpciju Fe. U akutnim trovanjima, Fe se apsorbuje na pasivan način zavisano od koncentracije, slično načinu na koji se apsorbuje većina drugih metala.

Apsorbovano gvožđe se prenosi na feritin ili se u cirkulaciji vezuje za protein transferin. Transferin je alfa<sub>1</sub>-globulin koji se sintetise u jetri. U kompleksu sa transferinom, Fe se distribuira do drugih mjesta skladištenja Fe u tijelu. Jedinstvena karakteristika metabolizma Fe je skoro potpuno odsustvo izlučivanja Fe. Svako gvožđe izgubljeno razgradnjom hemoglobina, brzo se vezuje za transferin i transportuje u koštanu srž radi ponovne sinteze hemoglobina. Shodno tome, malo Fe se gubi urinom i fecesom. Pored toga, gubitak Fe nije značajno povećan čak i nakon predoziranja gvoždem. Najveći gubitak Fe je zbog ekfolijacije<sup>32</sup> ćelija gastrointestinalne sluzokože kod svih sisara i kroz gubitak krvi tokom menstrualnog ciklusa.

Veća količina Fe od normalne može oštetiti organizam. Uzimanje previše suplemenata Fe može izazvati trovanje gvoždem. Hemohromatoza je nasljedna bolest koja uzrokuje preveliko nakupljanje Fe u tijelu.

Na različite načine se može održavati normalan status Fe u organizmu, koji se primjenjuju u različitim fazama iscrpljivanja Fe. Nivo serumskog feritina može se koristiti za identifikaciju iscrpljenosti Fe u ranoj fazi (Gibson, 1990). Smanjena brzina isporuke uskladištenog i apsorbovanog Fe da bi se zadovoljile potrebe ćelijskog Fe predstavlja uznapredovalu fazu iscrpljivanja Fe, koja je povezana sa smanjenim nivoom serumskog Fe, retikulocitnog hemoglobina, procentom zasićenosti transferinom i sa većim ukupnim kapacitetom vezivanja Fe i većom koncentracijom receptora transferina u serumu. Posljednji stadijum nedostatka Fe, koji se karakteriše anemijom usljed nedostatka Fe, javlja se kada su niski: koncentracija hemoglobina u krvi, hematokrit (udio crvenih krvnih zrnaca u krvi po zapremini), srednji korpuskularni volumen i srednje vrijednosti ćelijskog hemoglobina. Testovi za hemoglobin i hematokrit najčešće su korišćene mjere za skrining pacijenata na nedostatak Fe, iako nisu

<sup>32</sup> fiziološki proces kojim se odumrle ćelije odbacuju sa površine kože

ni osetljivi ni specifični (WHO, 2012). Koncentracije hemoglobina niže od 13 g/dL kod muškaraca i 12 g/dL kod žena ukazuju na anemiju usljed nedostatka gvožđa. Normalne vrijednosti hematokrita su od 41% do 50% kod muškaraca i 36% do 44% kod žena.

### **4.3.2.3 Toksičnost Fe**

#### **4.3.2.3.1 Mehanizam toksičnosti Fe**

Širok spektar štetnih slobodnih radikala se formira kada apsorbavano gvožđe ne uspije da se veže za proteine, što zauzvrat utiče na koncentraciju slobodnog Fe u ćelijama sisara i biološkim tečnostima. Velike doze Fe mogu da dovedu do ulaska prekomjerne količine Fe u tijelo, pri čemu tijelo postaje zasićeno gvožđem. Kada proteini, koji vezuju Fe, postanu zasićeni, slobodni joni Fe ulaze u cirkulaciju. Slobodno Fe prodire u ćelije jetre, srca i mozga. Na ćelijskom nivou, slobodno Fe povećava peroksidaciju lipida uzrokujući oštećenje membrana mitohondrija, mikrozoma i drugih ćelijskih organela (Albretsen, 2006). Slobodni radikali nastali u reakciji sa Fe „napadaju“ DNK, što dovodi do oštećenja ćelija, mutacija i malignih transformacija koje zauzvrat izazivaju niz bolesti (Grazuleviciene i sar., 2009). Povećana količina slobodnog Fe izaziva sistemsku metaboličku acidozu kroz nekoliko mehanizama. Prvo, laktocidoza se javlja zbog hipovolemije<sup>33</sup> i hipotenzije (Albretsen, 2006). Drugo, gvožđe u ćelijama ispoljava svoj toksični efekat na mitohondrije tako što uklanja elektrone iz elektron transportnog lanca razdvajajući oksidativnu fosforilaciju, što za posljedicu ima prelazak na anaerobni metabolizam (Baranwal i Singhi, 2003). Fe ispoljava najznačajnije dejstvo na kardiovaskularni sistem. Prekomjerne količine Fe mogu izazvati nekrozu miokarda, postarteriolarnu dilataciju, povećanu permeabilnost kapilara i smanjen minutni volumen srca. Slobodno Fe stimuliše oslobađanje serotonina i histamina. Svi ovi mehanizmi

<sup>33</sup> stanje smanjene intravaskularne zapremine tečnosti u organizmu

dovode do šoka. Prekomjerna količina Fe ometa mehanizme zgrušavanja, povećavajući hemoragijske procese (krvarenje) i može da izazove trombocitopeniju<sup>34</sup>.

Slobodni joni Fe inhibiraju Krebsov ciklus, a kao posljedica dolazi do akumulacije organskih kiselina. Jetra akumulira slobodno Fe u Kupferovim ćelijama i hepatocitima. Gvožđe se lokalizuje u mitohondrijima ovih ćelija i dovodi do oštećenja drugih ćelijskih organela. Na kraju dolazi do hipoglikemije, hiperamonemije, defekta koagulacije i hepatične encefalopatije<sup>35</sup>. Slobodno Fe inhibira trombinom indukovanu konverziju fibrinogena u fibrin. Preopterećenje gvoždem indukuje histološki evidentnu fibrozu u jetri životinja (Bloomer i Brown, 2019).

Toksičnost Fe u ćelijama dovodi do oštećenja tkiva: gastrointestinalnog trakta i bioloških tečnosti, srca, jetre i mozga. Prekomjerno unošenje Fe je ozbiljan problem u razvijenim zemljama i zemljama u kojima se ishrana umnogome zasniva na mesu i povećava rizik od raka. Radnici izloženi azbestu koji sadrži skoro 30% gvožđa pod visokim su rizikom od raka pluća. Shodno prethodno rečenom, koncentracija Fe strogo je kontrolisana u ćelijama sisara i biološkim tečnostima.

Slobodni radikali mogu biti važan uzrok raka pluća (Ghosh i sar., 2007). Superoksid anjon radikal ima sposobnost da oslobađa gvožđe iz feritina i to slobodno gvožđe reaguje sa sve više i više superoksid anjon radikala i vodonik peroksida formirajući visoko toksični hidroksil radikal.

Soli gvožđa kao  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  niske su akutne toksičnosti kada se unose oralnim, dermalnim i inhalacionim putevima i stoga se svrstavaju u kategoriju toksičnosti III. Soli Fe se

<sup>34</sup> smanjen broj trombocita u perifernoj krvi

<sup>35</sup> poremećaj pri kojem se pogoršava funkcija mozga jer se u krvi nagomilavaju otrovne supstance koje bi, u normalnim okolnostima jetra uklonila

smatraju bezbjednim u smislu davanje hrane i lijekova jer su njihovi toksični efekti zanemarljivo mali (Fine, 2000). U visokim dozama i namjernim ili slučajnim predoziranjem, Fe izaziva ozbiljne toksične efekte, čija je jedna komponenta akutno oštećenje jetre<sup>36</sup>.

Kod malog djeteta, 75 mg/kg Fe se smatra izuzetno opasnim. Doza od 30 mg/kg može dovesti do simptoma toksičnosti. Procjene smrtonosne doze kreću se od 180 mg/kg i više. Maksimalna koncentracija Fe u serumu od 5 µg/mL i više povezana je sa umjerenim do teškim trovanjem<sup>37</sup>.

Trovanje gvoždem je oduvijek bila tema interesovanja uglavnom pedijataru, jer su djeca izložena velikom broju proizvoda koji sadrže gvožđe (Hershko, 2007). Akutna toksičnost se odvija u pet faza. Prva faza se javlja nakon 30 min do 6 časova predoziranja gvoždem i obilježena je gastrointestinalnim efektima kao što su bol u stomaku, gastrointestinalno krvarenje, povraćanje i dijareja. Druga faza je u roku od 6 do 24 časa od predoziranja i smatra se latentnim periodom, periodom očiglednog medicinskog oporavka. Treća faza se javlja između 6 i 72 časa nakon pojave određenih kliničkih simptoma. Ovu fazu karakteriše ponavljanje gastrointestinalnih simptoma, šok i metabolička acidoza. Takođe se primijećuju koagulopatija<sup>38</sup> izazvana gvoždem, disfunkcija jetre, kardiomiopatija<sup>39</sup> i bubrežna insuficijencija<sup>40</sup>. Četvrta faza se javlja u roku od 12-96 časova od predoziranja gvoždem. Karakteriše se povećanjem aktivnosti aminotferaza i mogućom progresijom bolesti, pa sve do otkazivanja jetre. Peta faza od 2 do 8 nedelja predstavlja posljedice zarastanja povrijeđene sluznice gastrointestinalnog trakta uključujući ožiljke i opstrukciju pilora ili proksimalnog crijeva (Yuen i Becker, 2021).

<sup>36</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548214/>

<sup>37</sup> <https://go.drugbank.com/drugs/DB01592>

<sup>38</sup> zajednički naziv za poremećaje zgrušavanja krvi

<sup>39</sup> skup različitih bolesti koje dovode do oštećenja funkcije srca

<sup>40</sup> privremeno ili trajno oštećenje bubrega koje dovodi do gubitka normalne funkcije bubrega.

Ljudi mogu biti izloženi povišenom nivou gvožđa putem vode za piće, pošto podzemna voda za piće u mnogim zemljama premašuje dozvoljenu granicu postavljenu Direktivom Evropske unije 98/83/EC o kvalitetu vode za piće (Grazuleviciene i sar., 2009). Na zastupljenost i raznovrsnost akvatičnih vrsta kao što su beskičmenjaci i ribe, u velikoj mjeri utiču direktni i indirektni efekti kontaminacije vode gvožđem (Vuori, 1995). Talog gvožđa, kako na biološkim tako i na drugim površinama, prouzrokuje oštećenja kod riba dovodeći do začepjenja škrga i ometanja disanja.

### 4.3.3 Cink (Zn)

#### 4.3.3.1 Izvor Zn

Zn je jedan od najčešćih elemenata u zemljinoj kori. Nalazi se u vazduhu, zemljištu i vodi, a prisutan je i u svim namirnicama. Zn se komercijalno upotrebljava kao premaz za sprečavanje rđe, u baterijama sa suvim ćelijama i pomiješan sa drugim metalima za pravljenje legura poput mesinga i bronz. Legura Zn i Cu koristi se za pravljenje penija<sup>41</sup>. Uobičajena jedinjenja Zn koja se nalaze na lokacijama opasnog otpada uključuju  $ZnCl_2$ ,  $ZnNO$ ,  $ZnSO_4$  i  $ZnS$ . Jedinjenja Zn široko se koriste u industriji za pravljenje boja, gume, konzervansa za drvo i masti. Zn je esencijalni mineral i teški metal koji ulazi u sastav većine multivitaminskih i mineralnih suplemenata, a u terapiji Vilsonove bolesti koristi se u većim dozama zbog svoje sposobnosti da blokira apsorpciju bakra. Zn nije povezan sa povećanjem aktivnosti serumskih enzima tokom terapije ili sa klinički očiglednim oštećenjem jetre<sup>42</sup>.

#### 4.3.3.2 Uloga Zn

Zn je sveprisutni element u tragovima. Neophodan je kao katalitički, strukturni i regulatorni jon za rast i razvoj mikroorganizama,

<sup>41</sup> peni (engl. *Penny*) - stoti dio britanske funte, kovanica prečnika 21 mm

<sup>42</sup> <https://wwwn.cdc.gov/TSP/substances/ToxSubstance.aspx?toxid=54>



biljaka i životinja (i čovjeka) (Mocchegiani i sar., 2000). Poznat je po svojoj ulozi kofaktora SOD-a pri čemu štiti biološke strukture od oštećenja izazvanih slobodnim radikalima održavanjem adekvatnih nivoa SOD-a i metalotioneina. Takođe, ima ulogu u sprečavanju interakcije između Fe i Cu sa specifičnim ćelijskim komponentama (nukleotidi i glukoza za Fe ili DNK, a ugljeni hidrati, enzimi i proteini za Cu). Prelazni metali vezani za molekule formiraju koordinacioni kompleks, koji zatim reaguje sa  $H_2O_2$  i formira  $\cdot OH$  radikal. Nastali hidroksil radikal tada može da reaguje sa vodonikom vezanim za karboksilnu grupu molekula, mijenjajući njegova svojstva. Ova mjesta služe kao centri za formiranje radikala kroz ponovljeno redoks obnavljanje metala. Lančane reakcije slobodnih radikala izazvane prelaznim metalom, dovode do peroksidacije lipida, oštećenja DNK i proteina. I Fe i Cu igraju ključnu ulogu u pokretanju i širenju peroksidacije lipida, koja narušava strukturu lipidnog dvosloja. Redoks aktivni prelazni metali povezani sa ćelijskim komponentama uspostavljaju mjesto za ponavljajuće formiranje  $\cdot OH$  radikala (Jarosz i sar., 2017). Kao dio hormona timusa, Zn je neophodan za njegove funkcije kao što su sazrijevanje i diferencijacija T-ćelija (Mocchegiani i sar., 2000).

Antioksidativna funkcija Zn pripisuje se sposobnosti kompeticije Zn sa Fe i Cu za mjesta vezivanja koja su prisutna u ćelijskoj membrani. Joni Fe i Cu mogu katalizovati proizvodnju slobodnih radikala iz lipidnih peroksida. Izmjena Fe i Cu cinkom može spriječiti stvaranje visoko reaktivnih radikala zbog redoks inertnosti Zn, čime se sprečava peroksidacija lipida (Oteiza, 2012; Cruz i sar., 2015). Nedostatak Zn je uglavnom povezan sa povećanjem nivoa lipidne peroksidacije mitohondrijalne i mikrozomalne membrane zajedno sa osmotskom osjetljivošću membrane eritrocita. Proteini koji vezuju Zn, kao što su metalotioneini (MT), prisutni su u gotovo svim živim organizmima. Ovi proteini imaju značajnu ulogu u preuzimanju,

distribuciji, skladištenju i oslobađanju Zn. Osim toga, MT imaju i zaštitnu ulogu u stresnim situacijama: oksidativno oštećenje nakon izloženosti kiseioničnim radikalima, usljed izloženosti toksičnim metalima (posebno Cd) i ishrani siromašnoj Zn (Vašák i Hasler, 2000; Coyle i sar., 2002). Zn kao dio MT-a poboljšava izlučivanje metala kao što su Pb, As i dr. iz organizma. Granični (mali) nedostatak Zn (odražava blaga stanja nedostatka Zn koja su najčešće uočena u ljudskoj populaciji) pojačava akumulaciju Pb u kostima, dok njegov dodatak u vidu suplemenata smanjuje Pb akumulaciju u kostima kod pacova (Jamieson i sar., 2006). Zajednička primjena Zn i Pb, koji se vežu za slična mjesta na enzimima, dovodi do smanjenja inhibicije dehidrogenaze aminolevulinske kiseline u krvi izazvane Pb kod mužjaka Wistar pacova, što sugerije da primjena Zn potiskuje toksične efekte olova (Flora i sar., 1991, 1989).

U sličnoj studiji, otkriveno je da je dodatak Zn povezan sa smanjenjem toksičnog efekta HgCl<sub>2</sub> (Franciscato i sar., 2011). Zn-metaloproteinaza posjeduje značajan potencijal da eliminiše štetan efekat *metil-žive* (CH<sub>3</sub>-Hg<sup>+</sup>) na razvoj nervnog tkiva (Guzzi i Laporta, 2008). Zn je, zajedno sa Se, povezan sa smanjenjem toksičnosti izazvane CH<sub>3</sub>-Hg<sup>+</sup>. Sve ovo ukazuje da Zn ima zaštitnu ulogu prilikom oštećenja izazvanih različitim metalima kroz smanjenje apsorpcije, kompeticije za vezivanje za enzime i kroz indukciju sinteze molekula kao što su MT. Osim što ima pozitivne efekte, suplementacija Zn je, takođe, povezana sa izmjenom drugih esencijalnih metala pri čemu se mogu narušiti normalne fiziološke aktivnosti (Briner, 2014). Stoga, neophodan je uravnotežen pristup prilikom suplementacije ovih metalnih jona da bi se spriječile neželjene komplikacije. Dodatak Zn kao zaštite od oksidativnog oštećenja izazvanog Fe, može dovesti do smanjenja koncentracije Cu (Maret i Sandstead, 2006; Plum i sar., 2010). Preporuke za prosječan unos Zn kod ljudi kreće se između 7 mg/dan za muškarce i 15 mg/dan za žene (Wakimoto i Block., 2001).

## 4.3.4 Mangan Mn

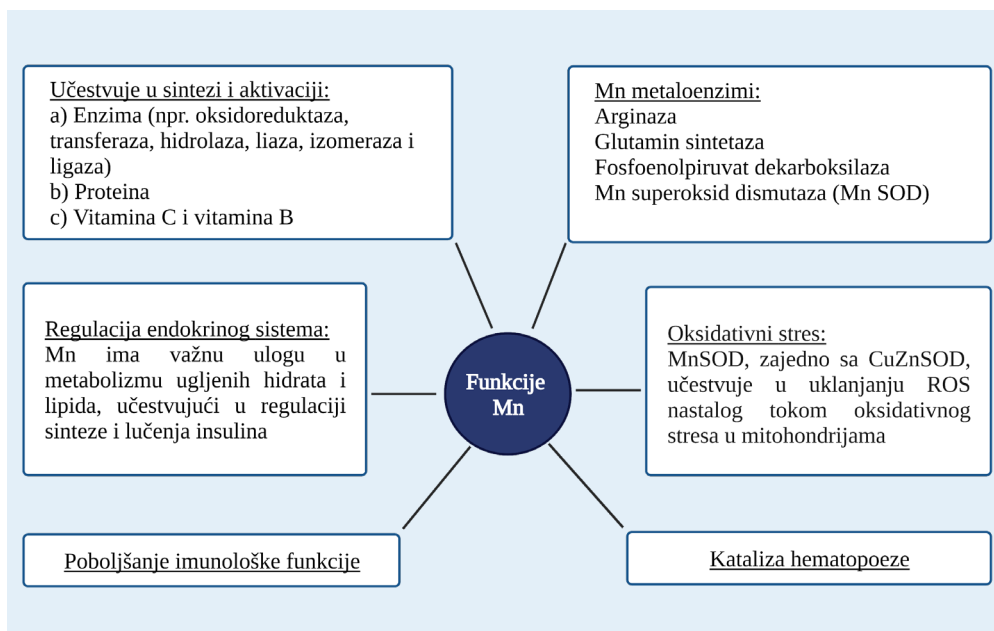
### 4.3.4.1 Izvori Mn

Mangan (Mn) je prirodni element koji se nalazi u metamorfnim i sedimentnim stijinama, zemljištu (Reimer, 1999) i u vodi. Sveprisutan je u životnoj sredini i čini oko 0,1% Zemljine kore. Stijene Zemljine kore glavni su izvor Mn koji se nalazi u atmosferi. Okean, šumski požari, vegetacija i vulkanska aktivnost drugi su glavni prirodni atmosferski izvori mangana. Takođe, Mn potiče iz mrtvih biljaka i životinja i životinjskog izmeta. Važni izvori rastvorenog mangana su: anaerobne sredine u kojima se redukuju čestice oksida Mn, direktna redukcija čestica oksida Mn u aerobnoj sredini, prirodno trošenje minerala koji sadrže Mn (II) i kisela sredina. Mn (II) jon je rastvorljiviji od Mn (IV); stoga će Mn imati tendenciju da postane biodostupniji sa smanjenjem pH i redoks potencijala (Heal, 2001). Glavni antropogeni izvori Mn u životnoj sredini uključuju ispuštanje komunalnih otpadnih voda, kanalizacioni mulj, rudarstvo i preradu minerala, emisije iz proizvodnje legura, čelika i gvožđa, sagorijevanje fosilnih goriva i, u mnogo manjoj mjeri, emisije iz sagorijevanja aditiva za gorivo (Howe i sar., 2004).

### 4.3.4.2 Uloga Mn

Mn se apsorbuje kroz gastrointestinalni trakt, a zatim se transportuje do organa bogatih mitohondrijama (jetre, pankreasa i hipofize) gdje se brzo koncentriše (Deng i sar., 2013). Mn je uključen u sintezu i aktivaciju mnogih enzima (npr. oksidoreduktaza, transferaza, hidrolaza, liaza, izomeraza i ligaza); metabolizam glukoze i lipida; povećanu sintezu proteina, vitamina C i vitamina B; katalizu hematopoeze; regulaciju endokrinog sistema i poboljšanje imunološke funkcije (Aschner i Aschner, 2005). Osim toga, Mn metaloenzimi uključujući arginazu, glutamin sintetazu, fosfoenolpiruvat dekarboksilazu i Mn superoksid dismutazu takođe doprinose gore

navedenim metaboličkim procesima i smanjuju oksidativni stres indukovani slobodnim radikalima (Slika 38).



Slika 38. Fiziološke uloge Mn (preuzeto iz Li i Yang, 2018).

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

Međutim, prekomjerna izloženost manganu u životnoj sredini ili na radnom mjestu, štetna je po ljudsko zdravlje, posebno u rizičnoj populaciji kao što su rudari, zavarivači i proizvođači čelika. Prema podacima Geološkog instituta SAD iz 2016. godine, u Južnoj Africi, Kini i Australiji iskopano je 67% od ukupno iskopanog Mn (18 miliona tona) u svijetu u 2015. godini. Iskopavanje rude Mn i njena prerada izazivaju zagađenje vazduha i vode, ugrožavajući zdravlje radnika i opšte populacije koja živi u blizini fabrika - gutanjem i udisanjem, kao i dermalno i intravenozno. Akutna izloženost Mn može dovesti do manganizma<sup>43</sup>, a hronična izloženost izaziva ekstrapiramidalni sindrom<sup>44</sup> sa karakteristikama sličnim onima kod

<sup>43</sup> trovanje manganom; profesionalna bolest

<sup>44</sup> skup simptoma nastalih kao nus pojava određenih lijekova koji izazivaju poremećaj pokreta poput nekontrolisanih ili neželjenih kretnji, trzaja, tremora (drhtanja), mišićnih kontrakcija

Parkinsonove bolesti (Koh i sar., 2014). Prevalencija<sup>45</sup> metaboličkih bolesti, uključujući dijabetes melitus tipa 2, gojaznost, insulinsku rezistenciju, aterosklerozu, hiperlipidemiju, nealkoholnu masnu bolest jetre i steatozu jetre<sup>46</sup>, dramatično se povećala u posljednjih nekoliko decenija (Stegemann i Buchner, 2015). Ovi metabolički poremećaji obično su uzrokovani klasterizacijom metaboličkog sindroma (MetS). Kriterijumi za identifikaciju MetS-a uključuju tri od pet markera: abdominalnu gojaznost, poremećeni metabolizam ugljenih hidrata, visok krvni pritisak i dislipidemiju<sup>47</sup>, uključujući povišene nivoe triglicerida i snižene nivoe lipoproteina visoke gustine (HDL) (Rotter i sar., 2015). Pored toga, mnoge studije su pokazale da su metaboličke bolesti povezane sa oksidativnim stresom i upalom (Fernandez-Twinn i Ozanne 2010; Fang i sar., 1998; Mehta i sar., 2002; Fromenty i sar., 2004; Glover i sar., 2014; Johns i sar., 2015; Liu i sar., 2018).

Mn je komponenta ili aktivator nekih enzima, uglavnom antioksidanata, i ima važnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata i lipida, čak i u održavanju normalne sinteze i lučenja insulina. Prema tome, Mn može imati zaštitne efekte na pojavu MetS-a (Korc, 1983). Mn je komponenta MnSOD-a koja umanjuje efekat oksidativnog stresa u mitohondrijama. Mitohondrije su glavno mjesto gde se proizvode ROS koje imaju i fiziološku i patološku ulogu u ćeliji. Kada se prekomjerna količina ROS-a akumulira, to doprinosi oksidativnom oštećenju pronađenom u nekoliko neuropatoloških stanja povezanih sa pojačanom ekspresijom glukokortikoida, koji igraju važnu ulogu u regulisanju biosinteze i metabolizma ugljenih hidrata, lipida i proteina (Martin-Montañez i sar., 2014). Pored toga, MnSOD je primarni antioksidant koji uklanja superoksid anjon radikal formiran unutar

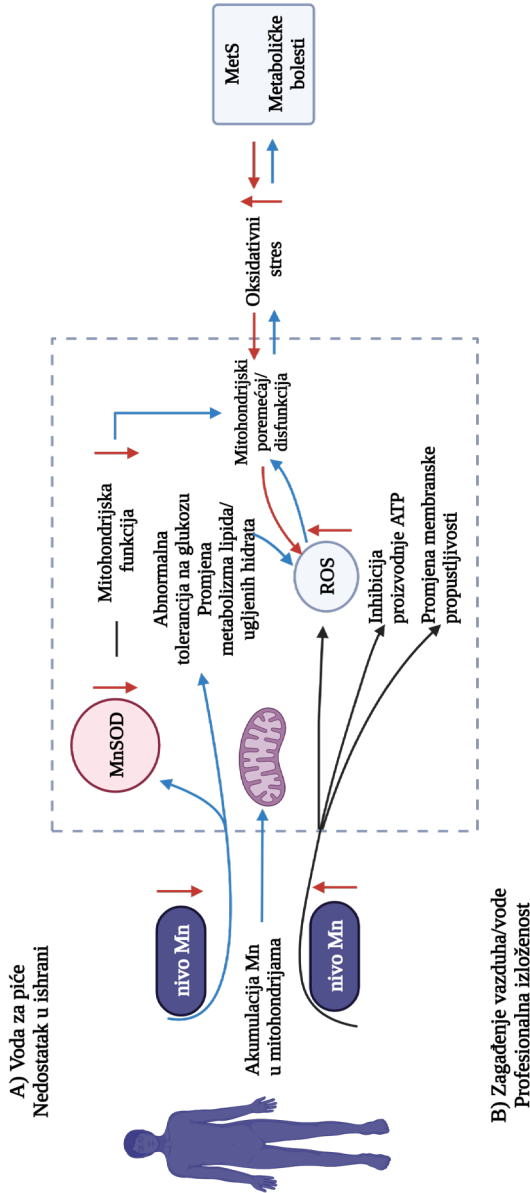
<sup>45</sup> broj slučajeva pojedinih bolesti kod određenog stanovništva u određenom razdoblju; najčešće se izražava postotkom ili stopom (npr. 53 oboljela na 100.000 stanovnika)

<sup>46</sup> patološko nagomilavanje masti u jetrenim ćelijama uzrokovano različitim etiološkim faktorima, od kojih su najčešći gojaznost i alkoholizam

<sup>47</sup> poremećena koncentraciju lipoproteina u krvi

mitohondrija i štiti od oksidativnog stresa (Munusamy i MacMillan-Crow, 2009; Azadmanesh i Borgstahl, 2018).

Ako su mitohondrije oštećene ili nefunkcionalne, proizvodnja ROS-a biće dodatno povećana i pogoršaće oksidativni stres u mitohondrijama (Rachek i sar., 2007) (Slika 39).



Slika 39. Mehanizmi djelovanja Mn u metaboličkim bolestima putem oksidativnog stresa. A) Nedostatak Mn izaziva brojne štetne efekte kao što su: poremećaj rasta; loše formiranje kostiju i defekti skeleta; smanjena plodnost i defekti pri rođenju; abnormalna tolerancija na glukozu i izmijenjen metabolizam lipida i ugljenih hidrata i kod životinja i kod ljudi. Prema tome, nedostatak Mn može dovesti do mitohondrijalne disfunkcije ili poremećaja kroz smanjenje nivoa MnSOD-a i mijenjanje metabolizma lipida i ugljenih hidrata. B) Prevelika količina Mn može poremetiti normalnu mitohondrijalnu funkciju povećanjem ROS-a u mitohondrijama, inhibiranjem proizvodnje ATP-a i promjenom permeabilnosti membrane. Zatim, može rezultirati mitohondrijalnom disfunkcijom ili poremećajem i na kraju izazvati MetS ili metaboličke bolesti. Prekomjerna količina ROS-a i oksidativni stres direktno bi doveli do MetS-a ili metaboličkih bolesti. Ako se dogode MetS ili metaboličke bolesti, to će zauzvrat povećati proizvodnju ROS-a i oksidativni stres i ubrzati mitohondrijalnu disfunkciju ili poremećaj (preuzeto iz Li i Yang, 2018).

Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).

Ipak, istraživanja u molekularnoj biologiji i u populacijskim studijama u vezi sa ulogom Mn u metaboličkim bolestima putem mitohondrijalnog oksidativnog stresa, ograničena su i nedosljedna. Nedostatak Mn i intoksikacija povezani su sa štetnim metaboličkim i neuropsihijatrijskim efektima (Greger, 1999).

U studiji o polimorfizmu metaboličkih gena i podložnosti profesionalnom hroničnom manganizmu, otkriveno je da osobe sa homozigotnim polimorfizmom (L/L) gena citohroma P450 2D6L (CIP2D6L) mogu smanjiti rizik od hroničnog manganizma u poređenju sa divljim tipom (Wt/Wt) (Zheng i sar., 2002).

## **4.4 Toksični teški metali**

Zbog povećanja geoloških i antropogenih aktivnosti, zagađenje biosfere (posebno zemljišta, vodenih ekosistema te manjeg dijela atmosfere u obliku čestica i para) teškim metalima, postalo je uobičajeno. Teški metali, kao što su kadmijum, bakar, olovo, hrom, mangan, gvožđe i živa, najčešći su zagađivači životne sredine (Fu i Wang, 2011) u područjima s visokim antropogenim uticajem. U Tabeli 10, navedene su fizičko-hemijske osobine za neke teške metale.

### **4.4.1 Kadmijum (Cd)**

#### **4.4.1.1 Izvori Cd**

Cd je prirodni element u Zemljinoj kori. Obično se nalazi kao mineral u kombinaciji sa drugim elementima: kadmijum-oksidi (CdO), kadmijum-hlorid (CdCl<sub>2</sub>), kadmijum-sulfat (CdSO<sub>4</sub>) i kadmijum-sulfid (CdS). Sva zemljišta i stijene, uključujući ugalj i mineralna đubriva, sadrže Cd u malim količinama. Kroz aktivnosti u prirodi, Cd se oslobađa u životnu sredinu pod uticajem vremenskih prilika (dejtvom vjetra i kiše), riječnim transportom, vulkanskim erupcijama i raznim ljudskim aktivnostima (vađenje ruda, topljenje, pušenje duvana, spaljivanje

komunalnog otpada i proizvodnja đubriva). Cd je metal 20. vijeka. Prvi put je korišćen u Prvom svjetskom ratu, kao zamjena za kalaj (Sn). Većina Cd je nusproizvod proizvodnje drugih metala kao što su Zn, Pb i Cu. Cd ne korodira lako i ima mnogo primjena u 20. vijeku (obično se koristi kao stabilizator za različite proizvode (Järup i sar., 1998), u različitim tipovima baterija, u bojama, metalnim premazima i plastici i široko se koristi u galvanizaciji<sup>48</sup> (Cheng i sar., 2014). Cd može ostati decenijama u zemljištu i sedimentima. Biljke postepeno preuzimaju akumulirane metale i lancem ishrane Cd na kraju dopijeva u ljudsko tijelo jer se Cd pretežno nalazi u voću i povrću zbog visokog stepena prenosa iz zemljišta u biljke (Bernard i sar., 2008).

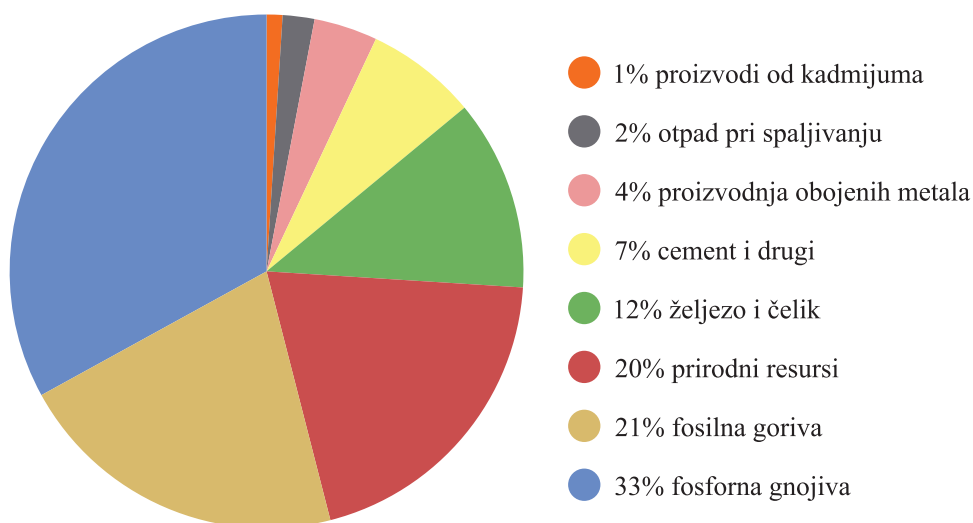
**Tabela 10. Fizičko-hemijske osobine nekih teških metala koji su najčešći uzroci toksičnosti kod živih organizama**

	Atomski broj	Molekulska masa	Oksidaciona stanja	Atomski radijusi (pm)	Jonski radijusi (pm)
Kadmijum (Cd)	48	112,4	+2	155	95 (+2)
Olovo (Pb)	82	207,2	+4, +2	154	77,5 (+4)
Živa (Hg)	80	200,59	+2, +1	171	102 (+2)
Mangan (Mn)	25	54,94	+7, +4, +3, +2	161	83 (+2)
Arsen (As)	33	74,92	+5, +3, -3	114	58 (+2)
Bakar (Cu)	29	63,55	+2, +1	145	73 (+2)
Hrom (Cr)	24	51,996	+6, +3, +2	166	80 (+2)
Zn (Zn)	30	65,4	+2	142	74 (+2)
Kobalt (Co)	27	58,93	+3, +2	152	74,5 (+2)
Gvožđe (Fe)	26	55,84	+3, +2	156	78 (+2)

<sup>48</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cadmium>



Na Slici 40, predstavljeni su relativni doprinosi različitih izvora Cd (Regoli, 2005).



Slika 40. Relativni doprinos različitih izvora izloženosti ljudi Cd  
(Izvor: Regoli, 2005)

Takođe, izloženost ljudi Cd može biti posljedica povećanog unosa ovog metala putem biljaka (Khaliq i sar., 2019) i vodenih životinja (Zhang i sar., 2016; Rai i sar., 2019).

#### 4.4.1.2 Potencijalna izloženost ljudi kadmijumu

Izloženost ljudi Cd moguća je kroz nekoliko izvora uključujući metalnu industriju, kontaminiranu hranu, pušenje cigareta i rad na radnim mjestima kontaminiranim Cd<sup>49</sup> (Paschal i sar., 2000; Yadav i sar., 2010). Profesionalna izloženost kadmijumu uključuje: rudarstvo, topljenje ruda, udisanje dima, proizvodnja nikel-kadmijum baterija, pigmenta za boje, stabilizatora, legura i galvanizacija (US Department of Health and Human Services, 1999; Pang i sar., 2016). Glavni putevi izlaganja ljudi ovom teškom metalu su udisanje i gutanje hrane što može izazvati akutnu ili hroničnu intoksikaciju (Zhang i sar., 2004). Oralna izloženost kadmijumu je konzumacija kontaminirane hrane i/ili vode.

<sup>49</sup> <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-09/documents/cadmium-compounds.pdf>

Ovaj put je najvažniji put za nepušače i one koji nisu profesionalno izloženi kadmijumu (Pang i sar., 2016). Apsorpcija kožom je rijetka.

Cd je, takođe, prisutan u tragovima u određenim namirnicama kao što su lisnato povrće, krompir, žitarice i sjemenke, jetra i bubrezi životinja, rakovi i mekušci (Satarug i sar., 2003). Pored toga, namirnice bogate Cd mogu u velikoj mjeri povećati koncentraciju Cd u ljudskom tijelu. Primjeri su pečurke, školjke, dagnje, kakao prah i sušene morske alge. Važan put distribucije Cd je cirkulacija, dok se krvni sudovi smatraju glavnim putevima toksičnosti Cd. Hronična inhalaciona izloženost česticama Cd generalno je povezana sa promjenama u plućnoj funkciji (emfizem) (Davison i sar., 1988). Izloženost na radnom mjestu česticama Cd u vazduhu, povezana je sa smanjenjem olfaktorne funkcije (Mascagni i sar., 2003). Nekoliko epidemioloških studija dokumentovalo je povezanost hronične izloženosti niskom nivou Cd sa smanjenjem mineralne gustine kostiju i osteoporozom (Åkesson i sar., 2006; Gallagher i sar., 2008; Schutte i sar., 2008). Iako su emisije Cd evidentno smanjene u većini industrijalizovanih zemalja, to je i dalje alarmantan izvor straha za radnike i ljude koji žive u zagađenim područjima jer može izazvati akutne i hronične intoksikacije (Chakraborty i sar., 2013; Richter i sar., 2017).

Izloženost Cd se obično određuje mjerenjem nivoa Cd u krvi ili urinu. Cd u krvi odražava nedavnu izloženost Cd (na primjer, pušenje). Cd u urinu ukazuje na akumulaciju ili opterećenje bubrega Cd (Järup i sar., 1998; Wittman i Hu, 2002). Procjenjuje se da oko 2,3% američke populacije ima povišen nivo Cd u urinu ( $> 2$  mg/g kreatinina), markera hronične izloženosti i opterećenja tijela (Becker i sar., 2002). Nivoi Cd u krvi i urinu obično su viši kod pušača cigareta, srednji kod bivših pušača i niži kod nepušača (Becker i sar., 2002; Mannino i sar., 2004). Zbog konstantne upotrebe Cd u industriji, zagađenje životne sredine i izloženost ljudi Cd dramatično su porasli tokom prošlog vijeka (Elinder and Järup, 1996).

### 4.4.1.3 Uloga Cd

Do danas nije pokazana biogena aktivnost za Cd, sa izuzetkom morske dijatome *Thalassiosira weissflogii* čija karboanhidraza (enzim uključen u fiksaciji neorganskog C za fotosintezu) sadrži Cd (Lane i sar., 2005). Ovo otkriće pružilo je dugo očekivano objašnjenje za ponašanje Cd u okeanima nalik hranljivim materijama.

### 4.4.1.4 Molekularni mehanizmi toksičnosti i Cd

Na svjetskoj rang listi Cd je sedmi najtoksičniji teški metal prema Agenciji za toksične supstance i registar bolesti (ATSDR, engl. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*). Tokom života, ljudi mogu biti izloženi Cd tokom radnog vremena ili u okruženju, pri čemu se on nakon apsorpcije, akumulira u ljudskom tijelu (Valko i sar., 2005). Stepent izlučivanja Cd iz ljudskog tijela je mali što produžava vrijeme poluraspada do 30 godina, a ovaj metal se najvećim dijelom deponuje u jetri i bubrezima (75%) (Rani i sar., 2014) kao i reproduktivnim organima, uključujući testise, jajnike i placentu (Paksy i sar., 1997; Zadorozhnaja i sar., 2000; Brohi i sar., 2017). Kadmijum dovodi do ozbiljne plućne i gastrointestinalne iritacije, koja može biti fatalna ako se Cd udiše ili proguta. Nakon akutnog gutanja, simptomi kao što su bol u stomaku, osjećaj pečenja, mučnina, povraćanje, salivacija, grčevi u mišićima, vrtoglavica, šok, gubitak svijesti i konvulzije obično se javljaju u roku od 15 do 30 minuta. Akutni unos Cd može izazvati eroziju gastrointestinalnog trakta, povredu pluća, jetre ili bubrega i komu, u zavisnosti od puta trovanja (Baselt i Cravey, 1982). Cd može da izazove ozbiljna oštećenja pluća, i ako se unese u većim količinama, to može dovesti do iritacije stomaka i izazvati povraćanje i dijareju. Dugotrajno izlaganje pri nižim koncentracijama Cd u bubrezima dovodi do nefropatije<sup>50</sup>, krhkih

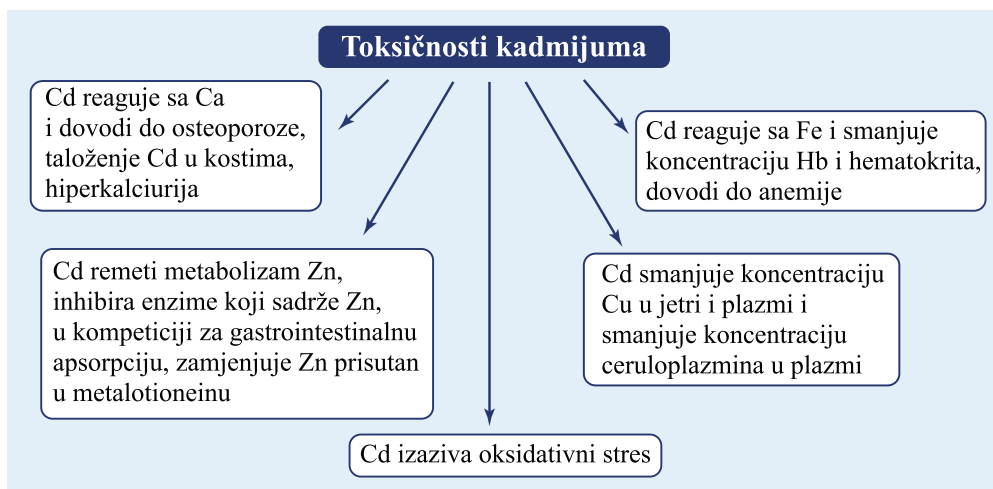
<sup>50</sup> termin koji se koristi za označavanje bolesti ili oštećenja bubrega, što na kraju može dovesti do otkazivanja bubrega.

kostiju i oštećenja pluća (Richter i sar., 2017). Hronična izloženost Cd dovodi do smanjenja nivoa norepinefrina, serotonina i acetilholina (Singhal i sar., 1976). Izloženost Cd može dovesti do komplikacija kao što su bolesti bubrega, osteoporoza, hipertenzija kao i rak pluća, mokraćne bešike, bubrega, pankreasa, želuca, prostate i dojke, jetre, testisa, nadbubrežne žlijezde i hemopoetskog sistema (Boffetta, 1993; Waalkes, 2000; Satoh i sar., 2002; Nordberg i sar., 2014).

Američki nacionalni toksikološki program i Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) na osnovu dokaza o karcinogenom djelovanju elementarnog Cd i jedinjenja Cd kod ljudi i eksperimentalnih životinja, klasifikovali su Cd i njegova jedinjenja kao karcinogene Grupe 1 za ljude (Boffetta, 1993; Chakraborty i sar., 2013).

Bubrezi su organi koji su najviše pogođeni toksičnošću Cd jer se on akumulira u proksimalnim tubularnim ćelijama u većim koncentracijama. Takođe, Cd može izazvati mineralizaciju kostiju (preko oštećenja kostiju ili disfunkcije bubrega). Istraživanja na ljudima i životinjama pokazala su da je oštećenje skeleta jedan od kritičnih efekata izlaganja Cd zajedno sa poremećajima u metabolizmu Ca, koji rezultira stvaranjem bubrežnih kamenaca i hiperkalciurijom. Eksperimenti na životinjama pokazali su da se 50% Cd apsorbuje u plućima i manji postotak u gastrointestinalnom traktu. Prijevremeni porođaj i smanjena porođajna težina problemi su koji se javljaju ako je izloženost Cd visoka tokom trudnoće kod ljudi (Henson i Chedrese, 2004).

Cd i njegova jedinjenja, u poređenju sa drugim metalima, veoma su rastvorljivi u vodi. Njihova bioraspoloživost veoma je visoka i stoga ima tendenciju bioakumulacije. Nepušači su izloženi Cd putem hrane i nekim drugim putevima. Ipak, unos Cd drugim putevima mnogo je manji (Mudgal i sar., 2010). Na Slici 41, prikazani su mehanizmi toksičnosti Cd (Flora i sar., 2008).



Slika 41. Mehanizmi toksičnosti Cd u animalnoj/humanoj ćeliji.

*Kreirano u ChemDraw Professional 15.*

Mehanizam djelovanja Cd u organizmu nije u potpunosti objašnjen. Iako nije redoks aktivan metal, glavno dejstvo Cd u mutagenezi je stvaranje ROS-a (Filipič i sar., 2006). Zbog porasta nivoa ROS-a, razvijaju se različiti fiziološki poremećaji kao što je povećana permeabilnost krvno-moždane barijere i promjene u sinaptičkom prenosu. Cd je redoks neaktivan metal i ne može sam da pokrene Fentonovu reakciju (Casalino i sar., 1997). Zbog toga, indirektnim procesom indukuje oksidativni stres. Neki od poznatih mehanizama preko kojih djeluje su: 1) Cd se kompleksira sa tiol grupama enzima uključenih u antioksidativne mehanizme, kao što su glutathion peroksidaza GPx, SOD i katalaza, i inhibira njihove aktivnosti (Wang i sar., 2004); 2) Cd smanjuje intracelularni sadržaj GSH; 3) Cd inhibira GPx aktivnost formiranjem kompleksa Cd-selen i 4) Cd inhibira kompleks III mitohondrijalnog elektronskog transportnog lanca i povećava proizvodnju ROS-a (Wang i sar., 2004; Irfan i sar., 2013) koji može pokrenuti puteve apoptoze.

Takođe, Cd utiče na puteve transdukcije signala indukujući formiranje inozitol polifosfata, povećavajući nivo slobodnog Ca u citoplazmi u različitim tipovima ćelija (Thevenod i Jones, 1992) i

blokirajući kalcijumove kanale (Suszkiw i sar., 1984; Dally i Hartwig, 1997). Pri nižim koncentracijama (1-100 nM), Cd se vezuje za proteine, smanjuje efikasnost popravke oštećenja DNK (Abshire i sar., 1996), aktivira degradaciju proteina, vrši regulaciju citokina i protoonkogenata (Durnam i Palmiter, 1981) i indukuje ekspresiju nekoliko gena, uključujući gene za metalotioneine, hem oksigenaze, glutation transferaze, proteine toplotnog stresa, reaktante akutne faze i DNK polimerazu  $\beta$  (Hwua i Yang, 1998). Oksidativni stres se smatra jednim od mehanizama genotoksičnosti. Izazvan izlaganjem kadmijumu, oksidativni stres može oštetiti (Valko i sar., 2006) i uništiti normalnu funkciju organela i proizvesti mutacije DNK koje dovode do promjene u ekspresiji gena i, konačno, indukovanja apoptoze (Ognjanović i sar., 2010). Poremećaj funkcije popravke oštećenja DNK indukovani Cd može dovesti do akumulacije oštećenja DNK, izazivajući genetske mutacije, a time i rak (Giaginis i sar., 2006; Zhou i sar., 2012). Neki enzimi za popravku oštećenja DNK imaju strukturu Zn prsta (engl. *Zn finger*), a kadmijum može da zamijeni cink na ovom enzimu, čime inhibira popravku oštećenja DNK (Zhou i sar., 2012). *In vitro* studije su pokazale da Cd izaziva citotoksične efekte u koncentracijama od 0,1 do 10 nM i prekide DNA lanaca koji su izazvani slobodnim radikalima (Tsuzuki i sar., 1994). Cd je slab mutagen u poređenju sa drugim karcinogenim metalima, kao npr. Cr (Biggart i Costa, 1986).

Nedavne studije su pokazale da je oksidativni stres potencijalni uzrok neurotoksičnosti. Izlaganje kadmijumu ima inhibitorni efekat na glavne antioksidativne enzime, glutation reduktazu i superoksid dismutazu (Stohs i sar., 2001; Valko i sar., 2006), koji učestvuju u održavanju redoks homeostaze. Nakon izlaganju kadmijumu, primijećena je povećana peroksidacija lipida u nekim regionimamozga kao što su mali mozak i kortekst (Shukla i sar., 1996; Méndez-Armenta i sar., 2003). Koncentracija Cd se povećava 3000 puta jer se vezuje za protein melatonin koji je bogat cisteinom (MT), pri čemu Cd formira

kompleks sa MT. Kompleks Cd-MT izaziva hepatotoksičnost u jetri a u bubrezima se reapsorbuje u cjevčicama bubrega i razgrađuje u lizozomima, što dovodi do oštećenja i smrti bubrežnih ćelija (nefrotoksičnost) nakon akumulacije u bubrežnom tkivu (Ohta i Cherian, 1991; Sabolić i sar., 2010; Jomova i Valko, 2011). Sposobnost Cd da se vezuje za ostatke cisteina, aspartata, histidina i glutamata, može dovesti do nedostatka Fe (Castagnetto i sar., 2002). Cd ima oksidaciono stanje isto kao i Zn, zbog čega Cd može da zamijeni Zn koji je prisutan u MT-u, čime ga sprečava da djeluje kao „hvatač“ slobodnih radikala unutar ćelija.

Takođe, kadmijum utiče na aktivnost mnogih enzima uključenih u metabolizam ugljenih hidrata. Kadmijum može da inhibira proces glikolize u jetri i mišićima smanjenjem aktivnosti heksokinaze i fosfofruktokinaze (Almeida i sar., 2001; Ramirez-Bajo i sar., 2014). Povećanjem koncentracije kadmijuma, glikoliza može biti inhibirana ranije (Zhou i sar., 2012). Kadmijum povećava aktivnost nekoliko drugih enzima uključenih u metabolizam razlaganja aminokiselina, kao što su oksidaza aminokiselina, glutamat dehidrogenaza, itd. (Cicik i Engin, 2005).

Odgovor na stres sa Cd uključuje nekoliko sistema odgovora koji pdrazumijevaju sintezu proteina za stres izazvan visokim/niskim temperaturama (engl. *heat shock i cold stress, respektivno*) i oksidativni stres (Blom i sar., 1992; Coogan i sar., 1992; Ferianc i sar., 1998).

## 4.4.2 Olovo (Pb)

### 4.4.2.1 Izvori Pb

Olovo je prirodni plavičasto-sivi metal prisutan u malim količinama u Zemljinoj kori. Nalazi se u koncentrisanim i lako dostupnim nalazištima rude Pb koja su široko rasprostranjena širom svijeta. U atmosferi, glavni izvor Pb su emisije Pb nastale sagorijevanjem olovnog benzina. Olovni benzin povučen je iz upotrebe

nakon 1973. godine, a zatim zabranjen 1995. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (sa izuzetkom goriva za avione sa klipnim pogonom) (EPA, 1996a), dok je kod nas još uvijek u upotrebi. Pb se koristilo kao sredstvo protiv detonacije u gorivima Nacionalne asocijacije za automobilske trke sve do 2008. godine. Boje na bazi Pb sa istrošenih površina (koje proizvode visoko koncentrisane ostatke Pb i prašinu) u starijim stambenim zgradama (građenim prije 1978. godine) i dalje predstavlja izvor trovanja djece Pb u Sjedinjenim Američkim Državama (CDC<sup>51</sup>, 1991; 2012d). Kombinacija korozivne vode i Pb cijevi ili spojeva zalemljenih olovom u distributivnom sistemu ili pojedinačnim kućama, može stvoriti lokalne zone visoke koncentracije Pb u vodi (EPA, 1989b, 2007a; Hanna-Attisha i sar., 2016).

Drugi antropogeni izvori Pb uključuju iskopavanje i topljenje rude; proizvodnju i upotrebu proizvoda koji sadrže Pb (npr. boje i glazure na bazi Pb, električni oklopi/zaštita, vodovod, akumulatorske baterije, lemljenje i rastvarači za zavarivanje); proizvodnja i primjena pesticida koji sadrže Pb; sagorijevanje uglja i nafte i spaljivanje otpada. Osim toga, koristi se u proizvodnji municije i uređaja za zaštitu od rendgenskih X-zraka. Procjenjuje se da je 2004. godine u Sjedinjenim Američkim Državama korišćeno 1,52 miliona tona olova za različite industrijske primjene. Od te količine, proizvodnja olovnih baterija činila je 83%, a preostala upotreba je pokrivala niz proizvoda, kao što su municija (3,5%), oksidi za boje, staklo, pigmente i hemikalije (2,6%) i olovni lim (1,7%)<sup>52</sup>. Posljednjih godina, upotreba olova značajno je smanjena jer se manje koristi u industriji boja i keramičkih proizvoda. Uprkos ovom napretku, među 16,4 miliona domova u Sjedinjenim Američkim Državama sa više od jednog djeteta mlađeg od 6 godina po domaćinstvu, 25% domova i dalje ima značajne količine dotrajale boje, prašine ili su u blizini gole zemlje kontaminirane olovom (Jacobs i sar.,

<sup>51</sup> engl. *Centers for Disease Control and Prevention*

<sup>52</sup> <https://www.usgs.gov/centers/national-minerals-information-center/lead-statistics-and-information>



2002), što doprinosi povećanju koncentracije olova u krvi kod djece (Harvey, 2002) i do 20 µg/dL ili više (Charney i sar., 1980).

#### **4.4.2.2 Distribucija Pb u životnoj sredini**

Pb se ne razgrađuje u životnoj sredini, iako može postojati u različitim hemijskim oblicima (organskim i neorganskim, najčešće u oksidacionom stanju 2<sup>+</sup>) (ATSTDR, 2020). Čestice koje sadrže Pb mogu se transportovati kroz vazduh, vodu i zemljište. Generalno, atmosfersko taloženje je najveći izvor Pb koji se nalazi u zemljištima na koje ne utiču drugi lokalni izvori van vazduha (npr. prašina od dotrajale olovne boje). Pb se kontinuirano prenosi između vazduha, vode i zemljišta prirodnim hemijskim i fizičkim procesima kao što su vremenske prilike, oticanje, padavine, suvo taloženje prašine i tok potoka/rijeke; međutim, izgleda da su zemljište i sedimenti važni za uklanjanje Pb. Pb se snažno adsorbuje na većinu zemljišta, što ograničava brzinu ispiranja. Kiselost zemljišta (pH) i njegov sastav najvažniji su faktori koji utiču na rastvorljivost, pokretljivost i fitodostupnost Pb u zemljištu. Drugi uslovi koji povećavaju pokretljivost Pb u zemljištu su redukujući uslovi i visok sadržaj hlorida.

Olovo je još pronađeno u raznim drugim potrošačkim proizvodima, kao što su kozmetiku, farbe za kosu, nakit, ribolovačke potapalice, utege za gume i uvezene dječije igračke; tradicionalni ili narodni lijekove i pakovanja za slatkiše/hranu; takođe se oslobađa prilikom pucanja iz pištolja. Za odrasle, izloženost Pb obično je povezana sa izlaganjem na radnom mjestu. Za djecu, izloženost visokim nivoima Pb povezana je sa boravkom u prostorima kontaminiranim Pb (npr. zemlja ili unutrašnja prašina u starijim domovima sa bojom na bazi Pb). Primarni izvor izloženosti Pb kod djece je površinska prašina (na tlu ili uvučena) koja sadrži Pb iz različitih izvora uključujući dotrajalu boju na bazi Pb (Lanphear i sar., 1998a; Succop i sar., 1998; CDC, 2009). Ekološki, Pb iz površinske prašine posebno je dostupno djeci zbog njihove

intenzivnije aktivnosti stavljanja ruku na usta. Pošto se Pb prenosi iz zemljišta veoma sporo, istorijski izvori taloženja Pb u zemljištu i dalje doprinose trenutnoj izloženosti (Laidlaw i Filipelli 2008; Laidlaw i sar., 2012). Nivo Pb u krvi (PbB) koristi se kao biomarker izloženosti Pb. Na osnovu analize izloženosti olovu za djecu od 1 do 5 godina, dominantni putevi izloženosti koji najviše doprinose PbB u populaciji SAD, su gutanje zemlje i prašine; za druge starosne grupe (npr. mlađa djeca) ili određene lokalne oblasti u SAD, drugi glavni izvori/putevi izloženosti kao što su voda za piće i hrana, mogu biti važni (Zartarian i sar., 2017).

PbB u SAD se značajno smanjio u poslednjih nekoliko decenija kao rezultat uklanjanja Pb iz benzina i ograničenja koja su postavljena na upotrebu Pb u bojama za uređenje životnog prostora (Schwartz i Pitcher, 1989; Brody i sar., 1994; Pirkle i sar., 1994, 1998; CDC, 2011; 2018a). Primijećene su sezonske varijacije PbB kod djece, sa opštim trendom povećanja PbB tokom kasnog ljeta i rane jeseni (Johnson i Bretsch 2002; Laidlaw i sar., 2005; Gulson i sar., 2008). Sezonski obrasci ponašanja (npr. aktivnosti na otvorenom) i vremenske prilike koje promovišu transport prašine Pb (vlažnost i brzina vjetra) mogu doprinijeti uočenim sezonskim obrascima u PbB (Laidlaw i sar., 2005; 2012) i pružiti dodatne dokaze za površinsku prašinu koja najviše doprinosi izloženosti djece Pb i PbB.

#### **4.4.2.3 Izloženost ljudi Pb**

Izloženost olovu dešava se uglavnom udisanjem čestica prašine ili aerosola kontaminiranih olovom i gutanjem hrane, vode i boje kontaminirane olovom (ATSDR, 1992; 1999). Odrasli apsorbuju 35 do 50% olova kroz vodu za piće, a stopa apsorpcije kod djece može biti veća od 50%. Na apsorpciju olova utiču faktori kao što su starost i fiziološki status. Nekoliko saveznih programa koje sprovode državne i lokalne zdravstvene vlade, nisu se fokusirali samo na zabranu olova u benzinu, farbama i zalemljenim limenkama, već su vlade dodatno

podržale programe skrininga za trovanje olovom kod djece i smanjenje olova u stambenim objektima (CDC, 1991). Uprkos napretku u ovim programima, izloženost ljudi olovu ostaje ozbiljan zdravstveni problem (Pirkle i sar., 1994; Pirkle i sar., 1998). Izloženost olovu tokom trudnoće lako se prenosi na fetus u razvoju (Ong i sar., 1985). Dokazi kod ljudi potvrđuju nalaze na životinjama (Corpas i sar., 1995), povezujući prenatalno izlaganje olovu sa smanjenom porođajnom težinom i prijevremenim porođajem (Andrews i sar., 1994) i sa abnormalnostima neurološkog razvoja kod potomaka (Huel i sar., 1992).

#### **4.4.2.4 Molekularni mehanizmi toksičnosti Pb**

Toksičnost Pb za ljude poznata je više od 2 000 godina. Rane epidemiološke studije fokusirale su se na očiglednu toksičnost povezanu sa visokom profesionalnom izloženošću. Međutim, tokom posljednjih nekoliko decenija, došlo je do rastuće svijesti da je izloženost na niskom nivou u životnoj sredini koja dovodi do PbB <10 µg/dL povezana sa štetnim efektima, posebno kod djece. Nivoi PbB povezani sa neželjenim efektima variraju u zavisnosti od mjesta i načina djelovanja Pb. Neželjeni efekti se javljaju pri PbB < 5 µg/dL i za najviše proučavane krajnje tačke djelovanja (neurološke, bubrežne, kardiovaskularne, hematološke, imunološke, reproduktivne i razvojne). CDC (2018b) navodi da „nije identifikovan bezbjedan nivo olova u krvi kod djece“. Kao rezultat toga, politika javnog zdravlja SAD fokusirala se na eliminisanje trovanja olovom kao problema javnog zdravlja. CDC smatra da je PbB povišen kod djece kada premaši referentnu vrijednost definisanu kao 97,5% za populaciju SAD. Trenutna referentna vrijednost Pb propisana od strane CDC-a, zasnovana na podacima Nacionalnog istraživanja zdravlja i ishrane (NHANES, engl. *National Health and Nutrition Examination Survey*) (NHANES 2007–2008 i 2009–2010), iznosi 5 µg/dL. Stoga je primarni cilj sadašnjih istraživanja ispitivanje uticaja PbB ≤5 µg/dL na zdravlje ljudi.

U ljudskom tijelu, najveći procenat olova se unosi u bubrege, zatim u jetru i druga meka tkiva kao što su srce i mozak. Međutim, skelet predstavlja glavni dio tijela u kojem se deponuje Pb (Flora i sar., 2006). Nervni sistem je najranjivija meta trovanja olovom. Glavobolja, slaba pažnja, razdražljivost, gubitak pamćenja i tupost rani su simptomi efekata izlaganja centralnog nervnog sistema olovu (CDC, 2001; ATSDR, 1999).

Koncentracija Pb u krvi, PbB, odražava i trenutnu izloženost i zalihe Pb u kostima, koje se mogu prenijeti u krv. Zbog relativno brze eliminacije Pb iz krvi u poređenju sa eliminacijom iz kostiju, Pb u krvi će odražavati uglavnom istoriju izloženosti u prethodnih nekoliko mjeseci, ali ne nužno i veću količinu Pb u kostima. Kao rezultat toga, jedno mjerenje PbB možda neće biti pouzdan podatak za opterećenje tijela Pb ili za kumulativnu izloženost. Longitudinalna mjerenja PbB mogu se koristiti za konstruisanje kumulativnog krvnog Pb indeksa (CBLI, engl. *Cumulative Blood Pb Index*), koji može biti bolji odraz istorije izloženosti; međutim, CBLI neće detektovati kratkoročne varijacije u izloženosti do kojih može doći između mjerenja. Direktna, neinvazivna mjerenja koncentracije Pb u kostima, mogu se koristiti kao podatak o dugotrajnoj izloženosti organizma olovu jer se većina apsorbovanog Pb zadržava u kostima. Zdravstveni efekti unošenja Pb su isti, bez obzira na put izlaganja (npr. udisanje ili gutanje). S obzirom na to da se izloženost kvantifikuje internim pokazateljima izloženosti (npr. PbB, Pb u kostima), epidemiološke studije ne pokušavaju da definišu put izloženosti. Izloženost Pb u životnoj sredini dešava se kontinuirano tokom života i Pb se zadržava u tijelu decenijama. Pošto interni pokazatelji doze ne mogu da definišu kompletnu istoriju izlaganja, trajanje i vrijeme izlaganja, koji su u najjačoj korelaciji sa uočenim zdravstvenim efektom, obično su nepoznati ili veoma neizvjesni.

U mnogim studijama su dokumentovani štetni efekti Pb kod djece i odrasle populacije. Kod djece, ove studije su pokazale povezanost između povećanog nivoa Pb u krvi i smanjene inteligencije, nižeg koeficijenta

inteligencije-IK, odložen ili oštećen neurobihejvioralni razvoj<sup>53</sup>, smanjena oštrina sluha, govorni i jezički hendikepi, zaostajanje u rastu, slab raspon pažnje i antisocijalno ponašanje (Amodio-Cocchieri, 1996; Factor-Litvak i sar., 1998; Kaul i sar., 1999; USEPA, 2002). U odrasloj populaciji, reproduktivni efekti, kao što je smanjen broj spermatozoida kod muškaraca i spontani pobačaji kod žena, povezani su sa visokom izloženošću olovu (Apostoli i sar., 1998; Hertz-Picciotto, 2000).

Akutna izloženost Pb izaziva oštećenje mozga, oštećenja bubrega i gastrointestinalne bolesti, dok hronična izloženost može izazvati štetne efekte u krvi, centralnom nervnom sistemu, krvnom pritisku, bubrezima i metabolizmu vitamina D (ATSDR, 1992; USEPA, 1992; Amodio-Cocchieri, 1996; Apostoli i sar., 1998; Factor-Litvak i sar., 1998; ATSDR, 1999; Kaul i sar., 1999; Hertz-Picciotto, 2000). Jedan od glavnih mehanizama pomoću kojih Pb ispoljava svoje toksično dejstvo je putem biohemijskih procesa koji uključuju sposobnost Pb da inhibira ili oponaša djelovanje Ca i da stupa u interakciju sa proteinima (ATSDR, 1999). U kostima, 99% od ukupne količin  $Ca^{2+}$  u organizmu, nalazi se u obliku kristalnog hidroksiapatita ( $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ ). Unutar skeleta, Pb se ugrađuje u mineral hidroksiapatit umjesto Ca. Olovo se vezuje za biološke molekule i na taj način ometa njihovu funkciju putem brojnih mehanizama. Pb se veže za sulfhidrilne i amidne grupe enzima, mijenjajući njihovu konformaciju i smanjujući njihovu aktivnost.

Williams i sar., (2010) su pokazali u svojoj studiji da je veća količina Pb u krvi povezana sa kasnijim početkom puberteta dječaka u peripubertetskom periodu. Studije o efektima olova na endokrini sistem uglavnom su zasnovane na radnicima koji su bili izloženi olovu i eksperimentalnim životinjskim modelima. Iako su dokazi kontradiktorni, akumulacija olova u organizmu utiče na većinu endokrinih žlijezda. Vjerovatno Pb utiče na vezu hipotalamus-hipofiza izazivajući prigušene TSH (tireostimulišući hormon), GH (hormon rasta, engl. *growth hormone*) i FSH (folikulostimulirajući hormon)/LH (luteinizirajući

<sup>53</sup> ponašanja ljudi u određenim situacijam tokom razvoja

hormon) odgovore na TRH (tireotropni oslobađajući hormon, engl. *Thyrotropin-Releasing Hormone*), GHRH (hormon rasta oslobađajući hormon, engl. *Growth Hormone-Releasing Hormone*) i GnRH (gonadotropin oslobađajući hormon, engl. *Gonadotropin-Releasing Hormone*) stimulaciju, respektivno. Neki od ključnih metaboličkih enzima glavna su mjesta za toksično djelovanje olova. Olovo može da oponaša esencijalne mineralne jone kao što su Fe, Zn i Ca i da se veže za mjesta vezivanja kofaktora inhibirajući aktivnost enzima ili mijenjajući transport esencijalnih katjona kao što je Ca (Flora i sar., 2007). Poznato je da intoksikacija Pb izaziva lipidnu peroksidaciju membrana (Jiun i Hseien, 1994) i oštećenje DNK posredovano formiranjem ROS-a (Hermes-Lima i sar., 1991). Olovo, takođe, interferira sa antioksidativnim enzimima kao što su SOD, GPx i CAT i neenzimskim antioksidativnim molekulama (Valko i sar., 2005; Flora i sar., 2008; Sharma i sar., 2014). Tako je pokazano da su aktivnosti antioksidativnih enzima, uključujući SOD i GPx u eritrocitima radnika izloženih Pb, značajno veće nego kod neeksponiranih radnika (Bechara i sar., 1993). Takođe, pokazano je da toksičnost izazvana olovom i apoptoza u ljudskim ćelijama raka, uključuju nekoliko ćelijskih i molekularnih procesa kao što su oksidativni stres i indukcija ćelijske smrti (Yedjou i Tchounwou, 2006; 2007), transkripcionu aktivaciju gena za stres (Tchounwou i sar., 2004b), DNK oštećenje (Yedjou i Tchounwou, 2007), eksternalizacija fosfatidilserina i aktivacija kaspaze-3 (Yedjou i sar., 2010).

Veliki broj istraživanja pokazao je da Pb djeluje tako što ometa procese zavisne od kalcijuma u neuronskoj signalizaciji i intracelularnoj transdukciji signala. Pb remeti intracelularni ciklus kalcijuma, mijenjajući mogućnost oslobađanja zaliha iz organela, kao što su endoplazmatski retikulum i mitohondrije (Goldstein, 1993; Simons, 1993). U nekim slučajevima olovo inhibira procese zavisne od Ca, uključujući oslobađanje nekoliko neurotransmitera i aktivaciju jonskih kanala vezanih za receptore u glutamatergičkim neuronima

zavisnim od Ca (Vijverberg i sar., 1994). U drugim slučajevima, Pb pojačava procese zavisne od kalcijuma, kao što su protein kinaza C i kalmodulin (Goldstein, 1993; Schanne i sar., 1997). Eksperimentalne studije su pokazale da je Pb potencijalno karcinogeno jer izaziva tumore bubrega kod pacova i miševa (Goyer, 1993; Waalkes i sar., 1995), i stoga ga IARC smatra vjerovatnim karcinogenom za ljude (Silbergeld i sar., 2000). Takođe je poznato da izloženost olovu izaziva mutacije gena i razmjene sestrinskih hromatida (Lin i sar., 1994; Yang i sar., 1999), morfološke transformacije u kultivisanim ćelijama glodara (DiPaolo i sar., 1978). *In vitro* i *in vivo* studije su pokazale da jedinjenja olova izazivaju genetska oštećenja putem različitih indirektnih mehanizama koji uključuju inhibiciju sinteze i popravke DNK, oksidativno oštećenje i interakciju sa proteinima koji vezuju DNK i proteinima supresora tumora. Roy i Rossman (1992) su pokazali da olovo-acetat ( $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ) izaziva mutagenost u toksičnoj dozi na lokusu gpt *E. coli* nakon inficiranja ćelija V79. Oni su, takođe, pokazali da toksične doze  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$  i olovo-nitrata ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_3$ ) izazivaju prekide DNK na lokusu gpt *E. coli* transfektovanog u ćelije V79 (Roy i Rossman, 1992). Druga studija Wise i sar., (1993) nije pronašla dokaze za direktne genotoksične ili efekte oštećenja DNK Pb osim olovo-hromata ( $\text{PbCrO}_4$ ). Oni su istakli da genotoksičnost može biti posljedica heksavalentnog hromata, a ne olova (Wise i sar., 1993).

Organska jedinjenja olova zasnovana na kovalentnim vezama imaju drugačije toksikološke efekte od neorganskih soli olova (kao što je  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ). Organska jedinjenja olova mogu da se apsorbuju kroz kožu i zatim uđu u mozak (Marshall i sar., 2007). Nakon toga, olovo se apsorbuje u plazmu, zatim ekstracelularnu tečnost i akumulira u mekim i tvrdim tkivima. Na kraju, olovo se uglavnom izlučuje putem urinarnog i digestivnog sistema (Patočka i Cerny, 2003).

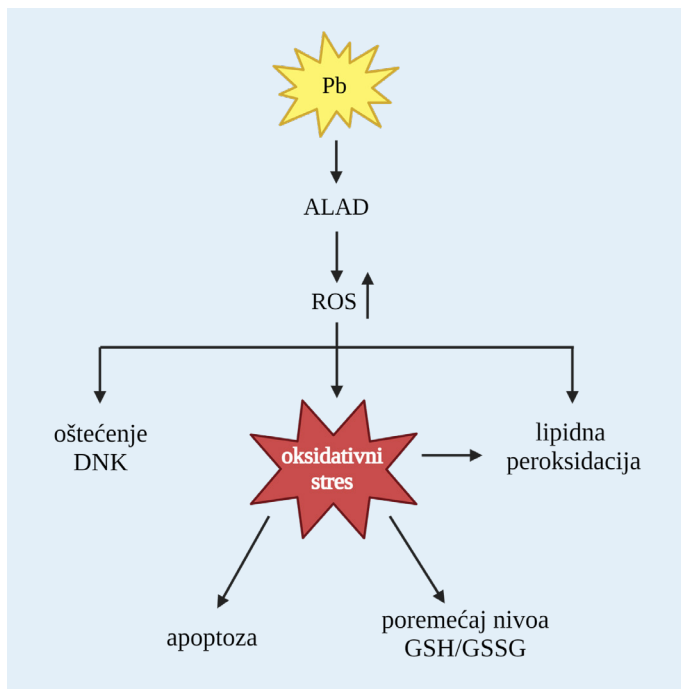
Olovo izaziva oksidativni stres i narušava ravnotežu oksidanata/antioksidanata u ćelijama (Kasperczyk i sar., 2012). Oksidativni stres

izazvan Pb glavni je mehanizam njegove toksičnosti. Zbog oslobađanja slobodnih radikala, oštećenja izazvana Pb u živim sistemima uključuju dva odvojena mehanizma (Ercal i sar., 2001). Prvi mehanizam je direktna proizvodnja ROS-a, kao što su  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  i hidroperoksidi. Studije su pokazale da olovo može podići nivo reaktivnog kiseonika i  $Ca^{2+}$  unutar ćelija, što zauzvrat dovodi do smanjenja mitohondrijalnog potencijala i apoptoze kroz oslobađanje citohroma c (Moreira i sar., 2001). Drugi mehanizam podrazumijeva potrošnju antioksidanata ćelija (Ercal i sar., 2001). Pored promjena aktivnosti antioksidativnih enzima, direktno je uključen u reakcije posredovane slobodnim radikalima (Knowles i Donaldson, 1990), utiče na aktivnost enzima i promjene u koncentraciji antioksidativnih molekula, kao što je glutation (Mudipalli, 2007). Kao antioksidant prisutan u ćelijama, GSH ih štiti od slobodnih radikala. Permpongpaiboon i sar., (2011) i Kasperczyk i sar., (2005), pokazali su da su značajno povišeni nivoi MDA primijećeni kod radnika izloženih olovu (uočeni su i drugi znaci oksidativnog oštećenja). Xia i saradnici (2018) ispitali su efekte  $Pb(C_2H_3O_2)_2$  na metabolizam ljudskih eritrocita *in vitro*, a rezultati su u skladu sa rezultatima (Kaserczyka i sar., 2005). Pokazano je da je inhibiran pentozofosfatni put kao rezultat smanjene aktivnosti glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) (Kasperczyk i sar., 2005). Suprotno ovom zapažanju, primijećeno je znatno povećanje aktivnosti G6PD kod radnika izloženih Pb (Svjetska zdravstvena organizacija, 2004). Paglia i sar., (1975) su istraživali aktivnost enzima u ljudskim eritrocitima izloženim Pb *in vitro* i dobili iste rezultate kao u radovima drugih autora (Antonowicz i sar., 1990; Rosenberg i sar., 2002) koji su proučavali izloženost radnika Pb. Rezultati su pokazali da je grupa izložena Pb imala značajno više PbB od prosječnog nivoa, kao što je objavljeno u studiji Kasperczyk i sar., (2005). Razlika u rezultatima navedenih autora i Svjetske zdravstvene organizacije može biti posljedica vremena izlaganja olovu, koncentracije olova i intenziteta intracelularnog oksidativnog stresa.



Wang i sar., (2010) proučavali su oštećenje izazvano kadmijumom u korteksu bubrega nakon izlaganja olovu i kadmijumu. Zaključak je da niske koncentracije  $Pb(C_2H_3O_2)_2$  mogu da poboljšaju brzinu ćelijskog disanja što je u skladu sa rezultatima Kaserczyk i sar., (2005). Ovo je indirektni rezultat šatla malata i aspartata u ćelijama, koji povećava oksidativnu dekarboksilaciju piruvata i transport NADH iz citoplazme u mitohondrije, što može dovesti do smanjenja aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH).

Međutim, nije bilo značajne promjene u aktivnosti FBA (fruktozo bifosfat aldolaze), što ukazuje da Pb ima ograničen efekat na put glikolize. *In vitro* studija na mozgu pacova ukazuje da Pb može inhibirati enzime glikolize i mitohondrijalnu respiraciju (Yun i Hoyer, 2000) i da ometa mnoge tjelesne funkcije unutar tijela, utičući na većinu organa. Oralnim unošenjem organski oblik Pb apsorbuje jetra i stoga se metaboliše, u poređenju sa neorganskim olovom koje se ne metaboliše u jetri (Bánfalvi, 2011). Glavni mehanizmi uticaja olova na metabolizam prikazani su na Slici 42.



Slika 42.  
Toksični mehanizmi uticaja Pb na metabolizam (preuzeto iz Fu i Xi, 2020). ALAD  
*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

Olovo može inhibirati mitohondrijalnu oksidativnu fosforilaciju, mijenjajući aktivnost dehidrataze  $\delta$ -aminolevulinske kiseline (ALAD) ćelije. ALAD sintetizira porfobilinogen kroz asimetričnu kondenzaciju dva molekula aminolevulinske kiseline. Porfobilinogen je prekursor tetrapirola, uključujući hem, hlorofil i vitamin B12. Inhibicija dehidrataze  $\delta$ -aminolevulinske kiseline nakon izlaganja Pb koristi se kao biomarker izloženosti olovu kod ljudi i divljih životinja (Casarett, 2008).

## 4.5 Mehanizmi akutne toksičnosti - neurotoksičnost

### 4.5.1 Acetilholin esteraza

Acetilholin (ACh) je važan neurotransmiter koji utiče na određene funkcije mozga, kao što je pamćenje, i na tjelesne funkcije, kao što su kontrakcije mišića koje omogućavaju pomjeranje mišića. Acetilholinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7) je enzim u holinergičkom nervnom sistemu koji katalizuje hidrolizu neurotransmitera acetilholina (ACh) i na taj način prekida njegovu neurotransmitersku aktivnost:



Prisutna je u većini tkiva u organizmu. Uglavnom se nalazi na neuromuskularnim spojevima i u hemijskim sinapsama holinergičkog tipa, gde njegoa aktivnost služi za prekid sinaptičkog prenosa. Pripada porodici enzima karboksilesteraza (Casarett, 2008). Inhibicija AChE indukuje akumulaciju ACh u sinapsama i kontinuiranu stimulaciju holinergičkih receptora, što dovodi do promjena u neurotransmisiji i paralizi (Deidda i sar., 2021). Aktivnost AChE može se koristiti kao biomarker izloženosti neurotoksičnim jedinjenjima. Mnogi teški metali mogu da prođu krvno-moždanu barijeru i akumuliraju se u nervnom tkivu, što uzrokuje oksidativni stres, upalu i metaboličku disfunkciju povezanu sa neurodegenerativnim oboljenjima. Zn, kao esencijalni metal, i Cd, kao neesencijalni metal, klasifikovani su kao neurotoksični metali (Deidda i sar., 2021). Sarasamma i sar., (2018) su pokazali da

su nivoi oksidativnih vrsta i peroksidacije lipida povišeni u mozgu *zebrafish* (zebrice) nakon izlaganja Zn i da utiču na aktivnost AChE. Cd indukuje oksidativni stres tako što povećava generisanje ROS-a i time posreduje aktivnost AChE (Gupta i sar., 2017; Moyano i sar., 2018).

Jedan od važnih enzima uključenih u procese detoksikacije teških metala je GST, enzim faze II biotransformacije. GST katalizuje konjugaciju različitih ksenobiotika, kao i konjugaciju ROS-a i proizvoda peroksidacije lipida sa glutationom kako bi ksenobiotici bili hidrofilniji za transport ili izlučivanje (Grammou i sar., 2011; Ensibi i Yahia., 2017). Podaci iz literature pokazuju da GST odgovor može zavisiti od vrste, intenziteta i trajanja stresa primijenjenog na organizam, kao i od tipa organizma (Nunes i sar., 2006b; Jemec i sar., 2007; Ensibi i sar., 2017; Pirsahab i sar., 2019).

#### 4.6 Uticaj teških metala na animalnu ćeliju

Uticaj esencijalnog Zn i neesencijalnog Cd na oksidativne i antioksidativne parametre *Artemia franciscana* ispitivan je u radu Kukavica i sar., (2023). Cilj je bio da se ispituju efekti izlaganja Zn, koncentracije 14 mg/L i 72 mg/L i Cd, koncentracije 7,7 mg/L i 77 mg/L tokom 24 i 48 časova na oksidativne i antioksidativne parametre i aktivnost glutation-S-transferaze u tkivu *Artemia franciscana*. Istovremeno, izmjeren je stepen usvajanja metala od strane tkiva i ispitana je neurotoksičnost metala određivanjem aktivnosti acetilholinesteraze (AChE). Dobijeni rezultati su pokazali da je tokom tretmana od 24 i 48 časova *Artemia franciscana* akumulirala Zn brže i u većoj mjeri od Cd. Cd je detektovan samo u uzorcima tretiranim 48 časova višom koncentracijom Cd. Nakon 24 i 48 časova, koncentracija Zn u tkivu *A. franciscana* tretiranom sa 14 mg/L Zn i 72 mg/L Zn, značajno je povećana u poređenju sa kontrolom za obje koncentracije. Razlog niske koncentracije Cd detektovane u tkivu *A. franciscana* može biti činjenica nepropustljivosti ljuska ciste *Artemia spp.* za Cd u ranim

fazama izloženosti Cd (Thall i Acey 1985; Rafiee et al. 1986). Izloženost *Artemia urmiana* različitim koncentracijama Cd dovela je do slične akumulacije Cd u toku 24 časa (Mohiseni i sar., 2017), dok su jedinke *A. franciscana* veoma efikasne u usvajanju Zn nakon izlaganja od 72 časa (Devi i sar., 2017). Ensibi i Yahia (2017) pokazali su da se sadržaj proteina u *Centropages ponticus* povećava sa povećanjem koncentracije Cd i vremena izlaganja. Tretman sa obje koncentracije Cd tokom 24 časa dovelo je do najznačajnijih promjena u kvalitativnom i kvantitativnom profilu proteina. Na SDS gelovima, najznačajnije promjene detektovane su u opsegu molekulske mase od 175-70 kDa, 42-35 kDa i 22-10,5 kDa. Mohamed i sar. (2014) su ispitivali SDS-PAGE proteinske profile *Artemia salina* tretirane Cd i pokazali da se intenzitet proteinskih traka povećava na početku tretmana, a zatim smanjuje u odnosu na kontrolu na kraju eksperimentalnog perioda, pri čemu su najveće promjene detektovane u oblastima male molekulske mase.

Do povećanja količine proteina može doći usljed *de novo* sinteze proteina uključenih u odgovor na stres izazvan metalima kao što su metalotioneini, proteini toplotnog šoka, antioksidativni proteini (Trinchella i sar., 2006). Važnu ulogu u toleranciji artemije na metale imaju proteini koji vezuju metal (Acey i sar., 1989). Pri povećanim koncentracijama Zn i Cd, sinteza MT-a povećava se nakon nekoliko sati (Barata i sar., 2002; Trinchella i sar., 2006). U uslovima oksidativnog stresa moguće je oksidativno oštećenje proteina koje dovodi do pojačane proteolize proteina, a to može biti razlog smanjenja koncentracije proteina u uzorcima tretiranim metalom nakon 48 časova. Pored toga, teški metali utiču na pogrešno uvijanje proteina i agregaciju proteina što ih čini nefunkcionalnim (Tamás i sar., 2014).

Nakon 24 časa tretmana teškim metalima (TM) najveća koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je izmjerena u uzorku tretiranom sa 72 mg/L Zn i statistički je značajno veća od kontrolnog uzorka za 24 časa. Statistički značajno niže koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izmjerene su u uzorcima

tretiranim nižim koncentracijama Cd i Zn u poređenju sa kontrolnim uzorcima nakon 24 časa. Niža koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izmjerena je u svim uzorcima tretiranim 48 časova u poređenju sa uzorcima tretiranim 24 časa. Osim toga, nije bilo razlika u koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> između uzoraka nakon 48 časova (Kukavica i sar., 2022). Pri visokim koncentracijama, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deluje kao oksidant koji dovodi do oštećenja biomolekula (npr. proteina) i uključen je u Fentonovu reakciju za proizvodnju visoko reaktivnog hidroksilnog radikala, koji izaziva značajna oksidativna oštećenja. Izlaganje *Takifugu obscurus* različitim koncentracijama Cd tokom 96 časova dovelo je do značajnog povećanja nivoa ROS-a u tkivima (Wang i sar., 2016). Niske koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izmjerene u uzorcima *A. franciscana* nakon tretmana Cd i Zn, mogu ukazivati na efikasnost zaštitnog sistema u tkivu *A. franciscana* ili na njegovu potrošnju putem drugih procesa u ćelijama (Kukavica i sar., 2023).

Kako Zn i Cd nisu redoks metali, oni nisu direktno uključeni u formiranje ROS-a preko Fentonove reakcije, ali ipak mogu povećati koncentraciju ROS-a u ćelijama. Cd dovodi do proizvodnje ROS-a inhibicijom transporta elektrona u elektron transportnom lancu u mitohondrijama, dok Zn može da zamijeni redoks aktivne jone (npr. Cu i Fe) (Halliwell i Gutteridge, 1999; Sarabia i sar., 2002; Sandrini i sar., 2006).

U uzorcima *A. franciscana* tretiranim sa 77 mg/L Cd i 14 mg/L Zn, došlo je do značajnog povećanja koncentracije MDA poslije 24 časa, u poređenju sa kontrolom. Nakon 48 časova, manja koncentracija Cd i veće koncentracije Zn dovele su do povećanja koncentracija MDA u odnosu na kontrolu. Poređenje uzoraka tretiranih istim metalima različitim koncentracijama tokom 24 i 48 časova, pokazalo je da su koncentracije MDA-a bile veće u uzorcima tretiranim sa 7,7 mg/L Cd i 72 mg/L Zn tokom 48 časova i u kontrolnom uzorku nakon 48 časova (Kukavica i sar., 2023). Tretman tkiva *Artemia salina* (Pacheco i sar., 2021) i tkiva *Artemia parthenogenetica* (Sarabia i sar., 2002) kadmijumom, indukuje

povećanje nivoa lipidne peroksidacije. Ates i sar., (2013) su pokazali da Zn u tkivu *Artemia salina* dovodi do povećanja koncentracije MDA na način koji zavisi od koncentracije i vremena. S druge strane, u radu Pacheco i sar., (2021) pokazano je da tretman različitim koncentracijama Zn, tokom 24 časa ne dovodi do promjene nivoa peroksidacije lipida. Podaci o nivou peroksidacije lipida u tkivima Artemije (Sarabia i sar., 2002; Ates i sar., 2013; Pacheco i sar., 2021), kao i drugih beskičmenjaka (Wang i sar., 2016; Ortega i sar., 2017) pokazuju da nivo peroksidacije lipida zavisi od vrste metala, koncentracije metala, dužine izlaganja, vrste organizma i perioda razvoja ispitivanog organizma.

Promjene u aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i CAT i koncentracije neenzimskog antioksidanta GSH u tkivu *A. franciscana* nakon tretmana kadmijumom i cinkom, zavisile su od koncentracije metala i vremena izloženosti (Kukavica i sar., 2023). Jiang i sar., (2013) su pokazali da izlaganje Cd tokom 24 i 48 časova, ne dovodi do promjena u SOD i CAT aktivnosti u tkivu *Cherax kuadricarinatus* i da produženo izlaganje dovodi do povećane aktivnosti enzima. U tkivu *Perna perna* nisu primijećene promjene u aktivnosti SOD-a i CAT-a nakon dva dana izlaganja ZnCl<sub>2</sub> (Trevisan i sar., 2014). Cd može djelovati na nivou membrane ili intracelularno povećanjem koncentracije superoksid anjon radikala i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, što može izazvati povećanje aktivnosti SOD-a i CAT-a. Međutim, prekomjerna proizvodnja ROS-a može imati inhibitorni efekat na aktivnost ovih enzima (Wang i Wang, 2009; Ensibi i Yahia, 2017; Mohiseni i sar., 2017; Pirsahab i sar., 2019). Jedan od razloga za smanjenu aktivnost SOD-a može biti taj što visoka koncentracija Cd može dovesti do inhibicije aktivnosti SOD-a zamjenom kofaktora (Cu, Zn i Fe).

Tretman sa 72 mg/L Zn i 7,7 mg/L Cd je u tkivu *A. franciscana* nakon 24 časa, doveo je do povećanja GST aktivnosti, dok je nakon 48 časova izmjereno značajno smanjenje GST aktivnosti. Povećanje GST aktivnosti poslije 24-časovnog tretmana može biti odgovor ćelija

na izlaganje teškim metalima. Inhibicija GST aktivnosti i smanjena koncentracija GSH otkrivena nakon 48-časovnog izlaganja, ukazuju na direktno kompleksiranje metala sa GSH ili uključivanje nekih drugih mehanizama u detoksikaciju Cd i Zn. Povećani nivo lipidne peroksidacije može biti stalni generator ROS-a, što može dovesti do smanjene koncentracija GSH i drugih antioksidanata (Wang i Wang, 2009). Trevisan i sar., (2014) su sa *Perna perna* pokazali da  $ZnCl_2$  indukuje značajno smanjenje koncentracije GSH, što ukazuje na potrošnju GSH usljed intenziviranja oksidativnih procesa. Ovi rezultati su u skladu sa našim zapažanjem pozitivne korelacije između koncentracije GSH i GST aktivnosti. Odgovor GST na tretman TM-om može zavisiti od vrste, intenziteta i trajanja stresa primijenjenog na organizam, kao i od tipa organizma (Nunes i sar., 2006; Jemec i sar., 2007; Ensibi i Yahia, 2017; Pirsheh i sar., 2019).

Aktivnost AChE se u tkivu *A. franciscana* povećala nakon 24-časovnog tretmana sa 77 mg/L Cd i 14 mg/L Zn u poređenju sa kontrolom, dok nisu uočene značajne razlike u aktivnosti AChE između uzoraka tretiranih metalima tokom 24 časa. Poslije 48 časova, došlo je do smanjenje aktivnosti AChE u uzorku tretiranom sa 77 mg/L Cd u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Tokom prva 24 časa, Cd ima najveći uticaj na aktivnost AChE, dok Zn dovodi do povećane koncentracije  $H_2O_2$ . Indukcija/inhibicija AChE u zavisnosti od vremena izlaganja tretmanima Cd i Zn, demonstrirana je i *in vitro* i *in vivo* (Wang i Wang, 2009; Najimi i sar., 1997; Miranda i sar., 2019). Niska doza  $ZnCl_2$  značajno je povećala aktivnost AChE i smanjila koncentraciju ACh u moždanom tkivu zebrice (Sarasamma i sar., 2018). Zn i Cd izazivaju oksidativni stres, što dovodi do peroksidacije lipida i neurotoksičnosti (Sarasamma i sar., 2018; Gupta i sar., 2017; Moyano i sar., 2018; Miranda i sar., 2019; Gagné i sar., 2007).

GST/GSH sistem biotransformacije igra važnu ulogu u detoksikaciji oba metala. Pokazalo se da produženo izlaganje metalima

(48 časova) daje pozitivnu korelaciju između koncentracije MDA i aktivnosti AChE, što može ukazivati na značaj peroksidacije lipida i ROS-a u neurotoksičnosti izazvanoj metalima (Kukavica i sar., 2023).

## 4.7 Biljke i teški metali

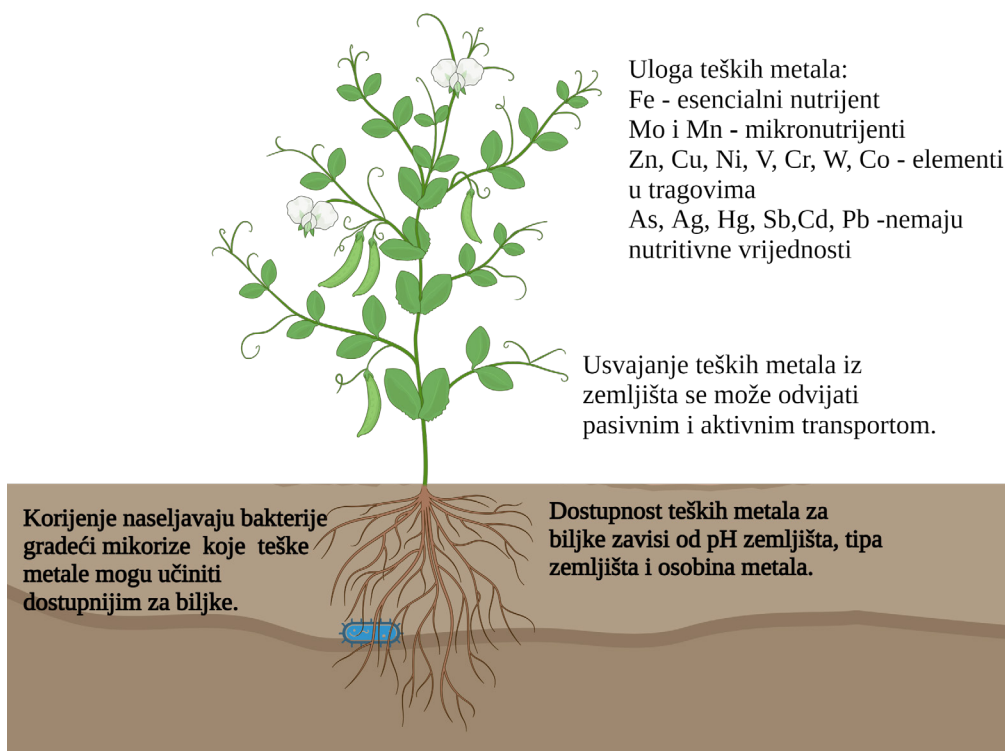
### 4.7.1 Izvori i pokretljivost teških metala u zemljištu

Povećane antropogene aktivnosti kao što su rudarstvo, moderna poljoprivreda i primjena đubriva, ekstenzivna upotreba podzemnih voda za navodnjavanje, odlaganje otpadnih voda i industrijalizacija, značajno utiču na distribuciju metala u prirodi (Tiwari i sar., 2018). Adsorpcija teških metala iz kontaminiranog zemljišta i povećanje njihove koncentracije u jestivim dijelovima biljaka, mogu predstavljati problem i opasnost za ljudsko zdravlje. Na pokretljivost teških metala, u smislu njihovog transporta iz zemljišta u biljke, utiče nekoliko faktora: pH zemljišta, sadržaj organske materije, sadržaj oksidanasa kao i prisustvo mikorize, struktura i profil zemljišta (De Matos i sar., 2001; Mehes-Smith i sar., 2013; Stankovic i sar., 2014; Fryzova i sar., 2018) (Slika 43).

Bioraspoloživost i biodostupnost metala odnose se na mogućost interakcije teških metala sa organizmom i njihova dostupnost u dijelovima organizma u kojima može izazvati određene toksične efekte. Pokretljivost metala, biodostupnost i potencijalna toksičnost metala zavise od koncentracije metala u zemljištu, prirode njegove povezanosti sa drugim rastvorljivim jedinjenjima u zemljištu i sposobnosti zemljišta da oslobodi metal iz čvrste faze da bi bio dostupan za biljke (Violante i sar., 2010). Povećane koncentracije teških metala u zemljištu mogu biti toksične za biljku utičući negativno na njene metaboličke procese i rast (Prasad, 2004). Kada je u pitanju metabolizam biljaka, razlikuju se dozvoljene i toksične koncentracije metala u zemljištu. Dozvoljene koncentracije teških metala su koncentracije metala koje su korisne za žive organizme u zemljištu, za rast biljaka i nemaju štetan



efekat (Tabela 11). Toksične granice koncentracije metala su iznad dozvoljenih koncentracija, njihovim prekoračenjem metali postaju štetni za žive organizme u zemljištu i toksični za rast biljaka. Teški metali kao što su As, Cd, Hg, Pb ili Se nisu esencijalni ili potrebni za rast biljaka dok se Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni i Zn smatraju esencijalnim elementima za rast i metabolizam biljaka, ali njihove veće koncentracije mogu lako izazvati toksičnost (Rascio i Navari-Izzo, 2011; Fryzova i sar., 2018).



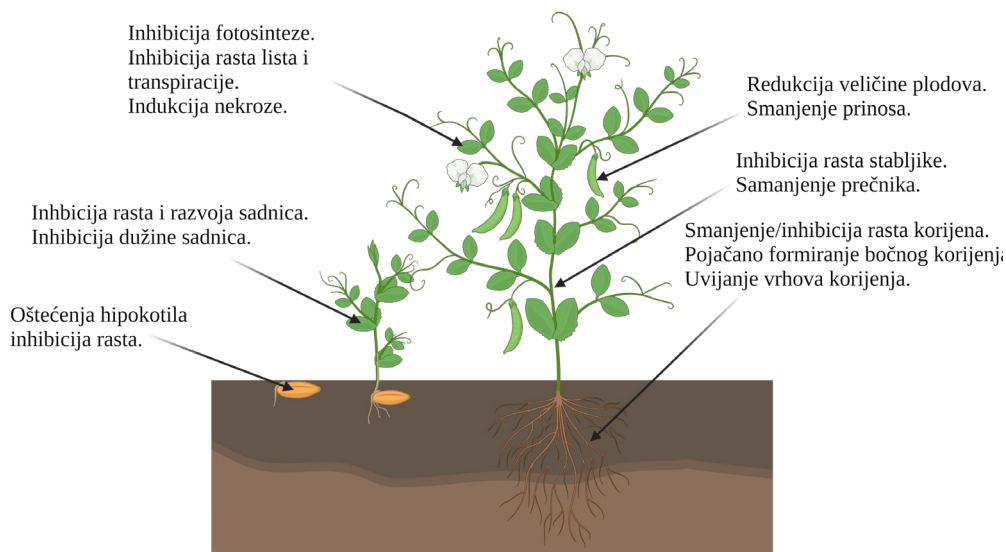
Slika 43. Dostupnost, usvajanje teških metala i njihova važnost za biljke (prema Fryzova i sar., 2017).

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

#### 4.7.2 Uticaj teških metala na biljke

Kada su prisutni u odgovarajućim koncentracijama, teški metali, kao nutrijenti, održavaju funkcionalnost ključnih enzima i regulišu metaboličke puteve uključujući fotosintezu, sintezu DNK, metabolizam šećera i redoks homeostazu. Međutim, u povećanim koncentracijama,

teški metali ispoljavaju toksičnost koja može biti fatalna za biljke (Riyazuddin i sar., 2021). Toksičnost teških metala izaziva morfološke, anatomske i fiziološke promjene kod biljaka (Slika 44).



Slika 44. Uticaj teških metala na biljke. Teški metali utiču na sve biljne organe i u svim fazama razvoja dovodeći do anatomske, morfološke, fiziološke i biokemijske promjene (prema Riyazuddin i sar., 2021).

*Created with BioRender.com (Kreirano u BioRender-u).*

Toksičnost teških metala može biti rezultat brojnih promjena u metabolizmu biljaka koje su posljedica: inhibicije aktivnosti enzima, blokiranja funkcionalnih grupa biološki aktivnih molekula, uklanjanja ili zamjene esencijalnih elemenata u važnim metaloenzimima i narušavanja integriteta ćelijskih membrana. Pored toga, toksično djelovanje može se ispoljiti pojačanom proizvodnjom ROS-a iz važnih metaboličkih procesa kao što su ciklus limunske kiseline i fotosinteza (Rascio i Navari-Izzo, 2011).

Toksični uticaj TM-a na biljke zavisi od niza faktora koji uključuju vrstu i koncentraciju TM-a, kao i od biljne vrste, faze razvoja biljke i vremena izlaganja. Efekti toksičnosti metala mogu se uočiti na skoro svim biljnim tkivima i tokom svih faza razvoja biljaka - od klijanja sjemena do starenja.

Formiranje bočnih korijena početni je simptom toksičnosti TM-a, koji vodi narušavanju apsorpcije i provodljivosti vode, što za posljedicu ima slabiji transport proizvoda fotosinteze do korijena (Riyazuddin i sar., 2021).

U Tabeli 11, navedeni su toksični i dozvoljeni opsezi teških metala za zemljište i za biljke.

**Tabela 11. Dozvoljen opseg koncentracija teških metala u biljkama i zemljištu (preuzeto iz Hajar i sar., 2014).**

<b>Teški metali</b>	<b>Dozvoljen opseg u biljkama (mg/kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Dozvoljen opseg u zemljištu (mg/kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vrijednosti u zemljištu toksične za biljke (mg/kg<sup>-1</sup>)</b>
Arsen (As)	5	6	20
Kadmijum (Cd)	2	0,35	3 - 8
Hrom (Cr)	0,006 - 18	70	75 - 100
Bakar (Cu)	0,4 - 45,8	30	60 - 125
Gvožđe (Fe)	640 - 2486	-	-
Magnezijum (Mg)	0,73 - 1,41	-	-
Olovo (Pb)	3	35	100-400
Selen (Se)	0,002 - 0,08	-	-
Cink (Zn)	1 - 160	90	70 - 400
Aluminijum (Al)	200 - ≥1000	-	-
Srebro (Ag)	0,01	-	-
Kobalt (Co)	0,1 - 10	8	25 - 50
Kalcijum (Ca)	1830,2 - 2042,5	-	-
Mangan (Mn)	15 - 100	1000	1500 - 3000
Nikl (Ni)	0,1 - 3,7	50	100

Manja količina proizvoda fotosinteze u korijenu vodi inhibiciji rasta korijena. Transport TM-a iz kontaminiranog zemljišta do nadzemnih dijelova, dovodi do povećanja koncentracije TM-a u ćelijama izdanaka, što direktno utiče na metabolizam izdanaka i indukuje smanjenje rasta (Riyazuddin i sar., 2021 i citirane reference u radu). Teški metali utiču na površinu i debljinu listova, broj listova i njihovu pigmentaciju što negativno utiče na transpiraciju i fotosintezu (Alsokari i sar., 2011). U listovima šećerne trske, niže koncentracije Cr (40 ppm), dovele su do hloroze, dok su više koncentracije (80 ppm) dovele do nekroze listova (Radha i sar., 2000).

Teški metali negativno utiču na procese u svijetloj fazi fotosinteze tj. na apsorpciju svjetlosti, transport elektrona kao i na aktivnost enzima Kalvinovog ciklusa, npr. aktivnost Rubisco - ribulozo 1,5 bis-fosfat karboksilaza/oksigenaza (Slika 43) (Riyazuddin i sar., 2021 i citirane reference u radu). Razlog smanjenja intenziteta fotosinteze može biti i smanjena koncentracija fotosintetičkih pigmenata (uglavnom hlorofila a i b). Teški metali mogu na nekoliko načina dovesti do smanjenja koncentracije hlorofila: 1) povećanjem aktivnosti enzima hlorofilaze, 2) indukcijom nastanka ROS-a koji u oksido/redukcionim reakcijama narušavaju strukturu molekula hlorofila i 3) inhibicijom biosinteze hlorofila jer neki od TM (Hg, Cu, Pb, Ni, Cd i Zn) mogu zamijeniti Mg u porfirinskom prstenu molekula hlorofila (Riyazuddin i sar., 2021 i citirane reference u radu). Na primjer, posljedica toksičnosti Cr je i feofitizacija (u molekulu hlorofila  $Mg^{2+}$  joni su zamijenjeni sa  $H^{+}$  jonima) što je pokazano kod *Eudorina unicocca* i *Chlorella kessleri* (Juarez i sar., 2008). Pored hlorofila, TM indukuju promjene u hloroplastima i tilakoidnim membranama zbog povećane proizvodnje ROS-a (Slika 43). Degradacija unutrašnje membrane hloroplasta i gubitak integriteta tilakoidnih membrana, pokazani su kod *Lemna minor* nakon tretmana Cd (Hou i sar., 2007). Teški metali, indukujući povećane koncentracije ROS-a, dovode do smanjenja unosa esencijalnih elemenata (Mg, K,

Ca, i Fe) potrebnih za sintezu fotosintetskih pigmenata (Rizwan i sar., 2016). Teški metali direktno oštećuju metaloproteine i ćelijske komponente koji mogu vezivati teške metale, kao npr. hlorofil (Küpper i sar., 1996). Metaloproteini kao kofaktori sadrže prelazne metale koji mogu biti zamijenjeni hemijski sličnim metalima (npr. Mg se može zamjeniti sa Ni, Co, Cr) (Jia i sar., 2020).

### 4.7.3 Mehanizmi zaštite biljaka

Postoji nekoliko strategija koje biljke koriste kako bi se „izborile“ s visokim koncentracijama teških metala u zemljištu. Prva strategija je prevencija unosa teških metala korijenjem biljaka.

Ako biljka nije u stanju izbjeći teške metale, aktiviraju se mehanizmi tolerancije i detoksikacije koji podrazumijevaju: sekvestraciju i kompartmentalizaciju u ćelijskom zidu i različitim unutarćelijskim organelama, transport metalnih jona, biosintezu ili akumulaciju osmolita i osmoprotektanata, aktivaciju AOS-a i detoksikaciju povećanih koncentracija ROS-a (Zhao i sar., 2009; Fryzova i sar., 2018). Najjednostavnija strategija zaštite od TM-a je izbjegavanje unosa teških metala iz zemljišta ili vezivanje metala u korijenu i sprečavanje njihovog kretanja u nadzemne dijelove biljke. Sekvestracija je, takođe, čest mehanizam zaštite od TM-a, i može dovesti do poremećaja homeostaze esencijalnih elemenata i izazvati simptome toksičnosti (poremećaj sinteze hlorofila, promjena odnosa hlorofila a i b, promjena fotosintetske aktivnosti, smanjen rast i dr. (Fodor i sar., 2002)). Metali se vezuju za ćelijski zid ćelija korijena i zatim se transportuju kroz plazma membranu ATP-zavisnim protonskim pumpama koje kataliziraju efluks  $H^+$  preko membrane (Singh i sar., 2003). U ćelijskom zidu metali se mogu vezati za pektine. Pektini su porodica heteropolisaharida prisutnih u primarnom ćelijskom zidu i u središnjoj lameli biljnog tkiva (Guo i sar., 2015). Glavne funkcionalne grupe pektina koje mogu vezivati teške metale

su: hidroksilna, karboksilna, amidna i metoksil. Od posebne su važnosti karboksilne grupe (koje omogućavaju vezivanje dvovalentnih i trovalentnih jona teških metala) sa velikim potencijalom za biosorpciju i uklanjanje teških metala (Mata i sar., 2009). Afinitet vezivanja metala za pektin opada u nizu:  $\text{Al}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} = \text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{Cu}^{2+} = \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} = \text{Ca}^{2+}$  (Franco i sar., 2002),  $\text{Pb}^{2+} \gg \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \gg \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$  (Kartel i sar., 1999) ili  $\text{Pb}^{2+} = \text{Cd}^{2+}$  (Debbaudt i sar., 2004), u zavisnosti od kapaciteta pektina. U okruženjima obogaćenim teškim metalima, neke biljne vrste će povećati kapacitet ćelijskog zida da vežu metale povećanjem koncentracije polisaharida (pektina) (Colzi i sar., 2011). Za membranu se najlakše vezuju katjoni  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  (Brunner i sar., 2008; Flouty i Khalaf, 2015). Heliranje metala je najvažniji intracelularni mehanizam za održavanje niskih koncentracija i detoksikaciju slobodnih metala u citoplazmi biljnih ćelija. U procese heliranja uključena su tiolna jedinjenja: GSH, metalotioneini, fitohelatini (FH), kao i ne-tiolna jedinjenja kao što su organske kiseline i aminokiseline. GSH je antioksidant koji ima ključnu ulogu u odbrambenom mehanizmu biljaka i prekursor je za sintezu fitohelatina. Fitohelatini su porodica peptida koji grade komplekse sa teškim metalima ubrzo nakon izlaganja biljaka teškim metalima. Mogu vezati metale koji posjeduju visok afinitet prema sulfhidrilnim grupama. Fitohelatini su peptidi koji se sintetišu iz glutaciona (ponavljajućih  $\gamma$ -glutamilsteinskih jedinica) kao odgovor biljaka na prisustvo teških metala. Sinteza fitohelatina nije uvijek odgovor biljaka na prisustvo teških metala. Metali kao što su Co i Mn ne indukuju sintezu fitohelatina (Grill i sar., 1987). Metalotionini su peptidi male molekulske mase, bogati cisteinom, koji imaju visok afinitet za vezivanje metalnih katjona, a njihova povećana ekspresija može povećati toleranciju biljaka na određene metale.

Kao odgovor na stres izazvan teškim metalima, biljke proizvode različite vrste osmotski kompatibilnih molekula uključujući prolin,

poliole, rastvorljive šećere; i kvaternarna amonijum jedinjenja kao što je glicin betain, prolin betain, alanin betain i poliamini, koji učestvuju u osmotskom prilagođavanju, stabilizaciji makromolekula, heliranju metala i detoksikaciji ROS-a (Zhao i sar., 2008; Liang i sar., 2013). Poliamini, organske kiseline i aminokiseline, heliraju teške metale direktno. Organske kiseline, kao što su tartarat, citrat, oksalat, malonat, akonitat i malat, imaju važnu ulogu u odbrani biljaka od toksičnsti TM-a jer heliraju TM karboksilnim grupama koje deluju kao donori kiseonika u reakciji sa metalnim ligandima (Anjum i sar., 2015). Malat je uključen u sekvencijalnu i heliranje Zn i Cd (Zhao i sar., 2000; Sun i sar., 2006). Oksalna kiselina u vrhu korijena paradajza formira oksalat-Cd kompleks i time smanjuje unos Cd (Zhu i sar., 2011). Hiperakumulator *Thlaspi alpestre* akumulira visoke koncentracije Zn zahvaljujući povećanim koncentracijama malata (Nriagu i sar., 1980; Tolrà i sar., 1996). Aminokiseline, posebno histidin, pokazuju jak afinitet za vezivanje metalnih jona ( $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ ) i uključene su u njihovo direktno heliranje.

Sposobnost sinteze visokih koncentracija histidina povezana je sa kapacitetom *Alyssum* (Brassicaceae) da hiperakumulira Ni i *Thlaspi caerulescens* da je hiperakumulator Zn (Krämer i sar., 1996; Salt i sar., 1999). Povećana sinteza prolina jedan je od odgovora biljnih ćelija na toksičnost teških metala, dok egzogena primjena prolina ima zaštitni efekat na aktivnost enzima i održavanje integriteta membrane kod biljaka tretiranih teškim metalima (Riyazuddin i sar., 2021 i citirane reference u radu).

U odgovoru na prisustvo TM-a biljke sintetišu i povećane koncentracije šećernih alkohola (manitol) i rastvorljivih šećera (glukoza, fruktoza, saharoza) (Dhir 2012; Rahoui i sar., 2015).

Jedan od odgovora biljnih ćelija na prisustvo teških metala je njihovo kompleksiranje sa peptidima bogatim cisteinima MT, koji su

kodirani genima, i FH, koji se enzimski sintetiziraju iz GSH. Vezivanjem teških metala sa metalotioneinima i fitohelatinima nastaju netoksični kompleksi i na taj način se štite ćelijske organele, ćelije i cijele biljke od štetnog djelovanja teških metala (Singh i sar., 2003).

#### **4.8 Oksidativni stres i antioksidativna odbrana kod biljaka izloženih teškim metalima**

Reaktivne vrste kiseonika mogu nastati djelovanjem teških metala, što dalje dovodi do oštećenja biljaka ili dijelova biljaka (Sharma i Dubey, 2007; Maheshwari i Dubey, 2009). ROS, s jedne strane, štetno djeluju indukujući oksidacije važnih biomolekula, a sa druge strane, imaju važnu ulogu u signalizaciji. Toksično djelovanje ROS-a zavisi od njihove koncentracije - ako koncentracija ROS-a prevazilazi kapacitet antioksidativnog sistema odbrane dolazi do oksidativnog stresa (Schutzendubel i Polle 2001; Sharma i sar., 2012).

Teški metali utiču na ćelijsku redoks homeostazu na različite načine:

1. redoks aktivni metali (Fe, Cu) mogu direktno generirati ROS u reakcijama Fenton i Haber-Weiss tipa (Stojs i Bagchis 1995, Sharma i Dietz 2009);
2. metali koji nisu redoks aktivni (Cd, Pb, Zn, Ni) mogu dovesti do nastanka singlet kisika, koji zatim indukuje nastanak superoksid anjon radikala;
3. detoksikacija teških metala zahtijeva utrošak velikih količina ćelijskih antioksidanata (npr. glutationa koji direktno uklanja teške metale ili je prekursor za sintezu fitohelatina);
4. direktnom inhibicijom aktivnosti enzima AOS zamjenom esencijalnih katjona i blokiranjem -SH grupa enzima (Shahid i sar., 2014) i
5. indukcijom aktivnosti NADPH oksidaze (Wildner i Henkel 1979, van Assche i Clijsters 1986).



Aktiviranje AOS-a glavna je strategija za ublažavanje efekata stresa izazvanog teškim metalima, pri čemu efikasnost AOS-a zavisi od vrste i koncentracije TM-a i vremena izlaganja, kao i biljne vrste i njenog razvojnog perioda. Povećane koncentracije ROS-a indukovane teškim metalima, negativno utiču na komponente AOS-a dovodeći do narušavanja njihove strukture i funkcije (Sharma i Dietz, 2009). Tako na primjer, akumulacija Cd indukuje u *Tagets erecta* smanjenje aktivnosti SOD-e, GR-e i CAT-e, dok s druge strane, Cd pri istim koncentracijama u *Avena strigosa* (otporna na Cd) dovodi do povećanja aktivnosti istih enzima (Uraguchi i sar., 2006).

Redoks homeostaza glutationa u ćeliji strogo je kontrolisana, a akumulacija teških metala dovodi do narušavanja redoks homeostaze glutationa. Fiziološki odnos GSH/GSSG je 100 : 1, a promjene u odnosu GSH/GSSG su različite u zavisnosti od biljne vrste i vrste teškog metala (Vandenhove i sar., 2006; Collin i sar., 2008). GSH je uključen i u direktnu detoksikaciju ROS-a i povećane koncentracije ROS-a mogu dovesti do povećane sinteze GSH (Foyer i Noctor 2005, Noctor i sar., 2012). Odnos GSH/GSSG, uglavnom se održava djelovanjem enzima GR. U normalnim, fiziološkim uslovima, GSH i AsA obično su u redukovanom obliku i uključeni su u detoksikaciju oksidanata u skoro svim ćelijskim organelama (Mittler i Zilinskas, 1992; Noctor i sar., 2012). Biljne ćelije mogu da podnesu umjereni disbalans redoks homeostaze glutationa. Međutim, veće koncentracije teških metala mogu značajno poremetiti redoks homeostazu što za posljedicu ima značajne promjene u funkcionisanju biljnih ćelija.

Homeostazu GSH može narušiti i povećana sinteza fitohelatina (Grill i sar., 1985). Chowardhara i sar., (2020) su pokazali da su koncentracije neenzimskih antioksidanata povećane (prolin, askorbat i GSH), kao i aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GST, GR, APX i POX) u uslovima izloženosti povišenim koncentracijama Cd kod tri sorte *Brassica juncea* L. To ukazuje na ključnu ulogu

AOS-a u toleranciji na stres izazvan TM-ma. Aktivnosti SOD-a i GR-e povećavaju se u biljkama u prisustvu Cd, dok se aktivnosti APX-a i POX-a povećavaju pri nižim koncentracijama uz opadajući trend pri višim koncentracijama Cd (Seneviratne i sar., 2017). Srivastava i sar., (2014) su pokazali da su Cd i Pb u sadnicama riže izazvali smanjenje koncentracije neenzimskih antioksidanata (glutaciona i askorbata) dok su, s druge strane, doveli do povećane aktivnosti SOD-a i POX-a. Nakon tretmana *Reynoutria japonica* Pb, Mn i Cd u koncentracijama od 10, 30 i 50 mM u listovima je izmjereno značajno povećanje aktivnosti POX-a u svim tretiranim uzorcima u odnosu na kontrolu (Gvero i sar., 2017). S druge strane, za sve tretirane uzorke lista izmjeren je smanjen sadržaj fenolnih jedinjenja. U listovima su detektovani Pb i Cd samo nakon tretmana biljaka sa Pb i Cd koncentracije 50 mM, dok je Mn detektovan nakon tretmana biljaka sa 30 i 50 mM Mn (Gvero i sar., 2017). Biljke, *Verbascum thapsus* L. tretirane različitim koncentracijama Zn (1, 5 i 10 mM), u listovima su akumulirale Zn progresivno, s povećanjem koncentracije i vremena izlaganja, dostižući 60 puta višu koncentraciju pri tretmanu sa 10 mM Zn u odnosu na kontrolu (Morina i sar., 2008). Kao odgovor na tretman Zn, biljke *V. thapsus* pojačano su sintetisale fenolna jedinjenja u listovima 7. dana od početka tretmana sa 1, 5 i 10 mM Zn, dok se u korijenu sadržaj ukupnih rastvornih fenolnih jedinjenja smanjivao sa vremenom. Za indukciju aktivnosti POX-a u listovima *V. thapsus* bile su potrebne veće koncentracije Zn i duže vrijeme izloženosti, jer je do značajnog povećanja aktivnosti došlo nakon 10 dana tretiranja koncentracijom od 10 mM Zn. Rezultati Morina i sar., (2008) su ukazali da se *V. thapsus* može smatrati otpornim na tretman cinkom, pri čemu doprinos tolerantnosti daju fenolna jedinjenja i peroksidaze klase III kao komponente antioksidativnog odbrambenog sistema.

Razlike u antioksidativnom odgovoru na prisustvo povećanih koncentracija Zn i Cu pokazane su za dvije populacije *V. thapsus* (Morina i sar., 2015). Jedna populacija je poticala sa područja

nezagađenog metalima (Zlatibor), dok je druga populacija bila sa industrijskog područja za odlaganje ostataka od proizvodnje Zn. Izloženost povećanoj koncentraciji Zn (60  $\mu\text{M}$ ) i Cu (20  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od tri sedmice, dovela je do promjena u aktivnostima POX-a u korijenima biljaka obje populacije, pri čemu su efekti Zn i Cu bili različiti. Uočene su razlike u odgovoru POX-a na Zn i Cu u korijenju biljaka osjetljivih (sa nezagađenog područja) i otpornih na metale (sa zagađenog područja), što odražava njihovo porijeklo. Biljke sa nezagađenog područja odlikovale su se većom indukcijom POX aktivnosti kao odgovor na tretman sa Zn nego biljke sa zagađenog područja, dok su biljke sa zagađenog područja imale veći kapacitet za indukciju POX-a nakon tretmana Cu. Zn i Cu su indukovali različite POX izoforme u obje populacije: cinkom su indukovane anjonske (pI 3,6-4,6) i katjonske (pI 8,8-9,3) POX izoforme, dok su bakrom indukovane anjonske (pI 4,2-4,6) POX izoforme i to značajnije kod biljaka sa nezagađenog područja. Pored toga, sa Cu je indukovana nova katjonska izoforma (pI ~ 9) u korijenima biljaka sa zemljišta zagađenog metalima. Rezultati u radu Morina i sar., (2015) ukazuju na važnost POX-a u adaptivnim odgovorima na povećane koncentracije Zn i Cu. Biljke, koje potiču iz područja zagađenog cinkom, razvile su adaptivne mehanizme uključujući efikasnu antioksidativnu zaštitu za regulaciju nivoa ROS-a.

Promjene u antioksidativnom odbrambenom sistemu ispitivane su u listovima *Sempervivum tectorum* L. nakon dugotrajnog izlaganja Cd u koncentracijama od 0,27 i 1,3  $\mu\text{mol/g}$  (Glušac i sar., 2013). Aktivnost POX-a značajno se povećala sa koncentracijom Cd i sa vremenom izlaganja. S druge strane, aktivnosti SOD-a i CAT-e bile su veće pri nižoj koncentraciji Cd i nakon mjesec dana tretmana, da bi se značajno smanjile na kraju eksperimentalnog perioda za obje koncentracije Cd (Glušac i sar., 2013). Fenolna jedinjenja su se u listovima *S. tectorum* akumulirala povećanjem koncentracije Cd i sa vremenom izloženosti,

vjerovatno kao važna karika odbrambene strategije u odgovoru na izloženost povećanim koncentracijama Cd (Glušac i sar., 2013). Akumulacija fenolnih jedinjenja zajedno sa povećanjem POX aktivnosti, mogu biti važni u sintezi lignina kao odgovor na sprečavanje transporta Cd u unutrašnjost ćelije. Pored toga, fenolna jedinjenja mogu biti uključena u heliranje Cd ali i u direktno uklanjanje ROS-a koji su posljedica izloženosti biljnih ćelija teškim metalima (Glusac i sar., 2013).

Indolamin hormon, melatonin, (N-acetil-5-metoksitriptamin) uključen je u regulaciju rasta i razvoja biljke, kao i obranu biljaka od različitih vrsta abiotičkog stresa. Jedna od važnih uloga melatonina je i regulacija redoks homeostaze preko umanjenja oksidativnog stresa. Egzogeno dodati melatonin mijenjao je aktivnost SOD-a i POX-a, u odgovoru na povećane koncentracije Zn i Cu u listovima *Melissa officinalis* L. i *Valeriana officinalis* L. (Hodžić i sar., 2019). Takođe, melatonin je uticao na koncentraciju fenolnih jedinjenja i aktivnost SOD-a i POX-a u listu i korijenu *Melissa officinalis* L. nakon tretmana povećanim koncentracijama Zn i Cd (Hodžić i sar., 2021). Melatonin je pokazao važnu ulogu u odgovoru biljaka na oksidativni stres izazvan teškim metalima, pri čemu promjene u aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentraciji fenolnih jedinjenja zavise od vrste stresa, biljne vrste i faze razvoja biljke.

Enzimski i neenzimski antioksidanti imaju različit odgovor u prisustvu teških metala u biljnim ćelijama i tkivima u različitim uslovima. Ne može se direktno zaključiti da će povećan nivo teških metala uvijek indukovati samo povećanje ili samo smanjenje koncentracije i aktivnosti antioksidanta u biljnim ćelijama. Kao što je već istaknuto to zavisi od koncentracije teškog metala, dužine trajanja stresa, biljne vrste i razvojne faze.

Ispitivanjem toksičnosti gvožđa u obliku  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  na vodenim biljkama, utvrđeno je da je rast trske inhibiran pri koncentraciji 1 mg/L (Phippen i sar., 2008). Kisela zemljišta ograničavaju proizvodnju riže

i zajedno sa nedostatkom Zn izazivaju poremećaj makronutrijenata u močvarnoj riži. Na proizvodnju nizijske riže u velikoj mjeri utiču visoke koncentracije redukovanog  $Fe^{2+}$  u poplavljenim zemljištima. Karakteristike toksičnosti Fe u riži uključuju visok unos  $Fe^{2+}$  putem korijena, translokaciju u listove, tamnjenje listova usljed povećane oksidacije polifenola u reakciji koju katalizuju polifenol oksidaze. Nastali slobodni radikali oksiduju hlorofil i indukuju smanjenje koncentracije hlorofila (Becker i Asch, 2005).

#### **4.8.1 Odnos biljaka prema teškim metalima**

##### **4.8.1.1 Hiperakumulatori**

Sve biljne vrste posjeduju bazalnu toleranciju na teške metale (Viehweger, 2014). Bazalna tolerancija se postiže pokretanjem složenih sistema odbrane koji podrazumijevaju kontrolu unosa/efluksa, transporta/sekvestracije i heliranja teških metala. Prema razvijenosti ovih ključnih sistema, biljke se dijele na hiperakumulatore i neakumulirajuće biljke.

Većina biljaka su neakumulatori teških metala. Međutim, danas je sve veći broj biljaka izložen djelovanju teških metala i da bi preživjele biljke se moraju prilagoditi (Hall, 2002, Clemens, 2006). Hiperakumulatori su biljke koje imaju sposobnost rasta na zemljištima sa povećanim koncentracijama metala. Ove biljke su u stanju da izuzetno akumuliraju velike količine teških metala u nadzemnim organima, bez toksičnih efekata (Rascio i Navari-Izzo, 2011). Adaptivni odgovori biljaka na prisustvo teških metala su procesi koji uključuju mnoge fiziološke, molekularne, genetske i ekološke osobine koje daju određenim vrstama sposobnost preživljavanja ili hiperakumulaciju toksičnih metala (Fryzova i sar., 2018).

Poseban oblik tolerancije na metale je pojava hipertolerancije. Hipertolerancija podrazumijeva da biljke, osim što su sposobne da

hiperakumuliraju metale, imaju sposobnost da isključe metale iz svojih tkiva kako bi koncentracija metala bila na dozvoljenom nivou, posebno u nadzemnim tkivima biljaka (Baker , 1981).

Hiperakumulatori postižu izvarendnu sposobnost akumulacije metala preko sljedećih mehanizama:

1. povećanom ekspresijom transportnih sistema neophodnih za pojačanu sekvestraciju metala,
2. ekspresijom proteina specifičnih za tkivo i
3. visokim koncentracijam heleatora metala (Viehweger, 2014; Fryzova i sar., 2018).

Navedeni mehanizmi hiperakumulatorima omogućavaju: vezivanje teških metala za ćelijski zid/ili ćelijske eksudate, unos metala preko korijena, heliranje u citoplazmi i/ili sekvestracija u vakuolama, bržu translokaciju metala iz korijena prema izdanku, te bolju sposobnost detoksikacije i sekvestracije teških metala u listovima.

Kod usvajanja metala iz zemljišta, razlikujemo faktor biokoncentracije (BCF) koji predstavlja odnos koncentracije metala u korijenu biljke i zemljištu, i translokacioni faktor (TF) koji predstavlja odnos koncentracije metala u listovima i koncentracije metala u korijenu. Biljke sa većim biokoncentracionim faktorom i niskim translokacionim faktorom imaju potencijal za uklanjanje teških metala iz zemljišta (Baker i sar., 1994; Fryzova i sar., 2018). Biljke koje imaju  $TF > 1$  akumuliraju više metala u nadzemnim dijelovima biljaka nego u zemljištu (Barman i sar., 2000). Primjeri biljaka sa TF-om većim od 1 su *Parthenium hysterophorus* i *Spinacia oleracea* koje su hiperakumulatori za Cr, Cu, Ni, Pb i Cd (Kumar i sar., 2013); *Impatiens walleriana* za Cd (Wei i sar., 2012) i *Noccaea caerulea* za Ni (Visioli i sar., 2014). Hiperakumulatori kao što su *N. caerulea* ili *A. halleri* ne koriste GSH ili FH kao mehanizme koji omogućavaju hipertoleranciju teških metala (Schat i sar., 2002; Sun i sar., 2007).

U početku se termin hiperakumulatori odnosio na biljke koje su bile u stanju da akumuliraju više od 1 mg/g Ni u izdanku, s obzirom da u vegetativnim organima većine biljaka toksičnost Ni počinje od 10 do 15 µg/g (Rascio i Navari-Izzo 2011). Hiperakumulatori su biljke koje mogu da akumuliraju >10 mg/g Mn ili Zn; >1 mg/g As, Co, Cr, Cu, Pb, Sb, Se ili Tl i >0,1 mg/g Cd u nadzemnim organima bez toksičnih efekata za biljke (Verbruggen i sar., 2009). Hiperakumulatori se razlikuju od nehiperakumulatora po značajno većem unosu teških metala (100 do 1000 puta većim od onih koje se nalaze u nehiperakumulatorima).

Najviše je biljnih vrsta hiperakumulatora za Ni (više od 75% od ukupnog broja) dok je mali broj hiperakumulatora pronađen za Cd, koji je jedan od najtoksičnijih teških metala (Rascio i Navari-Izzo, 2011). Većina hiperakumulatora endemični su za zemljišta bogata metalima, pri čemu se ponašaju kao „strogi metalofiti“, dok neki “fakultativni metalofiti” mogu živjeti i na zemljištima bez metala, iako su oni češći na staništima obogaćenim metalima (Assunção i sar., 2003).

#### **4.8.2 Redoks signalizacija u uslovima izloženosti teškim metalima**

Procesi redoks signalizacije odvija se u svim ćelijskim kompartmanima. Najvažniji primjer signalizacije posredovane teškim metalima je generisanje ROS-a koji mogu aktivirati kaskade protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) (Gupta i Luan 2003, Rentel i sar., 2004). Ovaj tip signalnih kaskada završava se fosforilacijom transkripcionih faktora koji dovode do ekspresije gena. ROS-MAPK signali uzrokuju nekoliko oštećenja ćelija poput prekida hormonske signalizacije, programiranu ćelijsku smrt u biljkama osjetljivim na djelovanje teških metala. Redoks stanje u ćeliji održava i redoks puferski sistem NAD<sup>+</sup>/NADH, NADP<sup>+</sup>/NADPH (Noctor, 2006). Lokalna promjena ovih redoks sistema može biti korak u transdukciji signala koji dalje utiču na aktivnost enzima ili hormona.





## LITERATURA

1. Abbassy, M. A., Marzouk, M. A., Mansour, S. A., Shaldam, H. A., & Mossa, A. H. (2014). Impact of oxidative stress and lipid peroxidation induced by lambda-cyhalothrin on p450 in male rats: the ameliorating effect of zinc. *J. Environ. Anal. Toxicol*, 4(4), 1-5.
2. Abdallah, F. B., Gargouri, B., Bejaoui, H., Lassoued, S., & Ammar-Keskes, L. (2011). Dimethoate-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. *Environmental toxicology*, 26(3), 287-291.
3. Abhilash, K. P., Arul, J. J., & Bala, D. (2013). Fatal overdose of iron tablets in adults. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 17(5), 311.
4. Abshire, M. K., Devor, D. E., Diwan, B. A., Shaughnessy Jr, J. D., & Waalkes, M. P. (1996). In vitro exposure to cadmium in rat L6 myoblasts can result in both enhancement and suppression of malignant progression in vivo.
5. Abudayyak, M., Ozden, S., Alpertunga, B., & Özhan, G. (2014). Effects of bentazone on lipid peroxidation and antioxidant systems in human erythrocytes in vitro. *Drug and chemical toxicology*, 37(4), 410-414.
6. Acey, R.A., Yoshida, B.N., Edep, M.E., 1989. Metalloproteins in developing *Artemia*, in: Warner, A.H., MacRae, T.H., Bagshaw, J.C. (Eds.), Cell and molecular biology of *Artemia* development. Plenum Press, New York, pp. 203–219.
7. Adams, J. D., Lauterburg, B. H., & Mitchell, J. R. (1983). Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 227(3), 749-754.
8. Åkesson, A., Bjellerup, P., Lundh, T., Lidfeldt, J., Nerbrand, C., Samsioe, G., ... & Vahter, M. (2006). Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women. *Environmental health perspectives*, 114(6), 830-834.
9. Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1-12.
10. Albretsen, J. (2006). The toxicity of iron, an essential element. *VETERINARY MEDICINE-BONNER SPRINGS THEN EDWARDSVILLE*, 101(2), 82.
11. Ali, M., Rizvi, T. F., Perveen, Z., Mishra, G. C., Kumar, R., & Kumar, A. (2014). Lipid peroxidation as a biomarker for exposure of pesticides. *Int J Adv Res*, 2(9), 717-20.

12. Allen, K. G., & Klevay, L. M. (1994). Copper: an antioxidant nutrient for cardiovascular health.
13. Almeida, J. A., Novelli, E. L. B., Silva, M. D. P., & Júnior, R. A. (2001). Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environmental pollution*, 114(2), 169-175.
14. Alsokari, S. S., & Aldesuquy, H. S. (2011). Synergistic effect of polyamines and waste water on leaf turgidity, heavy metals accumulation in relation to grain yield. *J. Appl. Sci. Res*, 7(3), 376-384.
15. Altuntas, I., Delibas, N., & Sutcu, R. (2002). The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Human & experimental toxicology*, 21(12), 681-685.
16. Altuntas, I., Delibas, N., Doguc, D. K., Ozmen, S., & Gultekin, F. A. T. İ. H. (2003). Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. *Toxicology in vitro*, 17(2), 153-157.
17. Altuntas, I., Kilinc, I., Orhan, H., Demirel, R., Koylu, H., & Delibas, N. (2004). The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes in vitro. *Human & experimental toxicology*, 23(1), 9-13.
18. Amdur, M. O., Doull, J., & Klaassen, C. D. (1997). Educational and informational strategies to reduce pesticide risks. *Preventive medicine*, 26(2), 191-200.
19. Amodio-Cocchieri, R. (1996). Lead in human blood from children living in Campania, Italy. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 47(4), 311-320.
20. Andrews, K. W., Savitz, D. A., & Hertz-Picciotto, I. (1994). Prenatal lead exposure in relation to gestational age and birth weight: a review of epidemiologic studies. *American journal of industrial medicine*, 26(1), 13-32.
21. Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 200-214.
22. Angermüller, S., Bruder, G., Völkl, A., Wesch, H., & Fahimi, H. D. (1987). Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *European journal of cell biology*, 45(1), 137-144.
23. Anjum, N. A., Singh, H. P., Khan, M. I. R., Masood, A., Per, T. S., Negi, A., ... & Ahmad, I. (2015). Too much is bad—an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 3361-3382.

24. Ansbaugh, N., Shannon, J., Mori, M., Farris, P. E., & Garzotto, M. (2013). Agent Orange as a risk factor for high-grade prostate cancer. *Cancer*, *119*(13), 2399-2404.
25. Antonowicz, J., Andrzejak, R., & Smolik, R. (1990). Influence of heavy metal mixtures on erythrocyte metabolism. *International archives of occupational and environmental health*, *62*(3), 195-198.
26. Apostoli, P., Kiss, P., Porru, S., Bonde, J. P., & Vanhoorne, M. (1998). Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. ASCLEPIOS Study Group. *Occupational and environmental medicine*, *55*(6), 364-374.
27. Asada, K. (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Photoinhibition*, 227-287.
28. Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, *85*(2), 235-241.
29. Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*, *50*(1), 601-639.
30. Aschner, J. L., & Aschner, M. (2005). Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular aspects of medicine*, *26*(4-5), 353-362.
31. Assunção, A. G., Schat, H., & Aarts, M. G. (2003). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, *159*(2), 351-360.
32. Asubiojo, O. I., Nkono, N. A., Ogunsua, A. O., Oluwole, A. F., Ward, N. I., Akanle, O. A., & Spyrou, N. M. (1997). Trace elements in drinking and groundwater samples in Southern Nigeria. *Science of the total environment*, *208*(1-2), 1-8.
33. Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I. O., & Rivera, H. F. (2013). Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. *Environmental science: Processes & impacts*, *15*(1), 225-233.
34. ATSDR, 1992. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Case Studies in Environmental Medicine - Lead Toxicity. Atlanta: Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services; 1992.
35. ATSDR, 1999. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Public Health Service. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 1999. Toxicological Profile for Lead.
36. ATSDR, 2004. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Interaction profiles for Lead, Manganese, Zinc, and Copper, Appendices, 2004. <https://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ip-metals2/ip06-a.pdf>

37. Atwood, D., & Paisley-Jones, C. (2017). Pesticides industry sales and usage: 2008–2012 market estimates. *US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 20460*, 2017-01. Retrieved May 29, 2019, from [https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016\\_o.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_o.pdf)
38. Azadmanesh, J., & Borgstahl, G. E. (2018). A review of the catalytic mechanism of human manganese superoxide dismutase. *Antioxidants*, 7(2), 25.
39. Bagdonas, E., & Vosylienė, M. Z. (2006). A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biologija*, 52(1).
40. Bai, J., & Cederbaum, A. I. (2001). Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Neurosignals*, 10(3-4), 189-199.
41. Baker, A. J. (1981). Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of plant nutrition*, 3(1-4), 643-654.
42. Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Sidoli, C. M. D., & Reeves, R. D. (1994). The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation and Recycling*, 11(1-4), 41-49.
43. Baldisserotto, B., Kamunde, C., Matsuo, A., & Wood, C. M. (2004). A protective effect of dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 67(1), 57-73.
44. Bánfalvi, G. (2011). *Cellular effects of heavy metals* (pp. 3-28). New York, NY, USA: Springer.
45. Banuelos, G. S., & Ajwa, H. A. (1999). Trace elements in soils and plants: an overview. *Journal of Environmental Science & Health Part A*, 34(4), 951-974.
46. Baranwal, A. K., & Singhi, S. C. (2003). Acute iron poisoning: management guidelines. *Indian pediatrics*, 40(6), 534-540.
47. Barata, C., Markich, S. J., Baird, D. J., Taylor, G., & Soares, A. M. (2002). Genetic variability in sublethal tolerance to mixtures of cadmium and zinc in clones of *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, 60(1-2), 85-99.
48. Barman, S. C., Sahu, R. K., Bhargava, S. K., & Chatterjee, C. (2000). Distribution of heavy metals in wheat, mustard, and weed grown in field irrigated with industrial effluents. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64, 489-496.
49. Baselt, R. C., & Cravey, R. H. (1982). *Disposition of toxic drugs and chemicals in man* (Vol. 8). Davis, CA: Biomedical publications.
50. Basu, S. (2004). Review isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free radical research*, 38(2), 105-122.

51. Bechara, E. J., Medeiros, M. H., Monteiro, H. P., Hermes-Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., ... & Di Mascio, P. (1993). A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quim Nova*, 16(1), 385-392.
52. Becker, K., Kaus, S., Krause, C., Lepom, P., Schulz, C., Seiwert, M., & Seifert, B. (2002). German Environmental Survey 1998 (GerES III): environmental pollutants in blood of the German population. *International journal of hygiene and environmental health*, 205(4), 297-308.
53. Becker, M., & Asch, F. (2005). Iron toxicity in rice—conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 558-573.
54. Behra, R. (1993). In vitro effects of cadmium, zinc and lead on calmodulin-dependent actions in *Oncorhynchus mykiss*, *Mytilus* sp., and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 24, 21-27.
55. Benhar, M., Engelberg, D., & Levitzki, A. (2002). ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO reports*, 3(5), 420-425.
56. Benipal, B., & Lash, L. H. (2011). Influence of renal compensatory hypertrophy on mitochondrial energetics and redox status. *Biochemical pharmacology*, 81(2), 295-303.
57. Bernard, A. (2008). Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 557-564.
58. Bertolote, J. M., Fleischmann, A., Eddleston, M., & Gunnell, D. (2006). Deaths from pesticide poisoning: a global response. *The British Journal of Psychiatry*, 189(3), 201-203.
59. Bethsass, J., & Colangelo, A. (2006). European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *International journal of occupational and environmental health*, 12(3), 260-267.
60. Beyersmann, D., & Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of toxicology*, 82(8), 493-512.
61. Bhatt, I., & Tripathi, B. N. (2011). *Plant peroxiredoxins: Catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. Biotechnology Advances*, 29(6), 850–859.
62. Bhatti, J. S., Sidhu, I. P. S., & Bhatti, G. K. (2011). Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes. *Molecular and cellular biochemistry*, 353, 139-149.
63. Biggart, N. W., & Costa, M. (1986). Assessment of the uptake and mutagenicity of nickel chloride in salmonella tester strains. *Mutation Research Letters*, 175(4), 209-215.

64. Blazhenko, O. V., Zimmermann, M., Kang, H. A., Bartosz, G., Penninckx, M. J., Ubiyvovk, V. M., & Sibirny, A. A. (2006). Accumulation of cadmium ions in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *BioMetals*, *19*, 593-599.
65. Bleier L, Dröse S. 2013. Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim. Biophys. Acta* *1827*:1320–31.
66. Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., & Jackson-Lewis, V. R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in neuroanatomy*, *9*, 91.
67. Blom, A., Harder, W., & Matin, A. (1992). Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, *58*(1), 331-334.
68. Bloomer, S. A., & Brown, K. E. (2019). Iron-induced liver injury: a critical reappraisal. *International journal of molecular sciences*, *20*(9), 2132.
69. Boersma, L., Lindstrom, F. T., McFarlane, C., & McCoy, E. L. (1988). Uptake of organic chemicals by plants: a theoretical model. *Soil Science*, *146*(6), 403-417.
70. Boffetta, P. (1993). Carcinogenicity of trace elements with reference to evaluations made by the International Agency for Research on Cancer. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, *19*, 67–70.
71. Bonaventura, C., Henkens, R., Alayash, A. I., Banerjee, S., & Crumbliss, A. L. (2013). Molecular controls of the oxygenation and redox reactions of hemoglobin. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*(17), 2298-2313.
72. Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J. F., & Margaritis, I. (2016). Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *35*, 107-115.
73. Boveris, A., Oshino, N., & Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, *128*(3), 617-630.
74. Bradl, H. (Ed.). (2005). *Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation*. Elsevier.
75. Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology*, *45*(7-8), 466-472.
76. Briner, W. (2014). The Alchemist's approach to metal poisoning: transforming the metal burden. *Toxics*, *2*(3), 364-376.
77. Brioukhanov, A. L., Netrusov, A. I., & Eggen, R. I. (2006). The catalase and superoxide dismutase genes are transcriptionally up-regulated upon oxidative stress in the strictly anaerobic archaeon *Methanosarcina barkeri*. *Microbiology*, *152*(6), 1671-1677.

78. Brody DJ, Pirkle JL, Kramer RA, et al. 1994. Blood lead levels in the US population: Phase I of the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III, 1968-1991). *J Am Med Assoc* 272(4):277-283.
79. Brohi, R. D., Wang, L., Talpur, H. S., Wu, D., Khan, F. A., Bhattarai, D., ... & Huo, L. J. (2017). Toxicity of nanoparticles on the reproductive system in animal models: a review. *Frontiers in pharmacology*, 8, 606.
80. Brouwer, M., Huss, A., van der Mark, M., Nijssen, P. C., Mulleners, W. M., Sas, A. M., ... & Vermeulen, R. C. (2017). Environmental exposure to pesticides and the risk of Parkinson's disease in the Netherlands. *Environment international*, 107, 100-110.
81. Brown Jr, G. E., Foster, A. L., & Ostergren, J. D. (1999). Mineral surfaces and bioavailability of heavy metals: a molecular-scale perspective. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3388-3395.
82. Brown, H. M. (1990). Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science*, 29(3), 263-281.
83. Brunner, I., Luster, J., Günthardt-Goerg, M. S., & Frey, B. (2008). Heavy metal accumulation and phytostabilisation potential of tree fine roots in a contaminated soil. *Environmental Pollution*, 152(3), 559-568.
84. Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 300(2), 535-543.
85. Bukowska, B., Goszczyńska, K., & Duda, W. (2003). Effect of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2, 4-dimethylphenol on human erythrocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77(3), 92-98.
86. Bukowska, B., Kopka, A., Michałowicz, J., & Duda, W. (2006). Comparison of the effect of Aminopielik D pesticide and its active components on human erythrocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(2), 189-193.
87. Burk, R. F., & Hill, K. E. (2010). Glutathione peroxidases. *Comprehensive Toxicology*, Elsevier Ltd, 229-242.
88. Cadenas, E. (2004). Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Molecular aspects of medicine*, 25(1-2), 17-26.
89. Caldwell, C., & Phillips, K. A. (1998). Hematological effects in rainbow trout subjected to a chronic sublethal concentration of lead. In *Fish Response to Toxic Environments: Symposium Proceedings International Congress on the Biology of F. Bethesda, MD: American Fisheries Society* (pp. 61-62).
90. Casalino, E., Sblano, C., & Landriscina, C. (1997). Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 346(2), 171-179.

91. Casarett, L. J. (2008). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons* (Vol. 71470514). New York: McGraw-Hill.
92. Casida, J. E., & Lykken, L. (1969). Metabolism of organic pesticide chemicals in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 20(1), 607-636.
93. Castagnetto, J. M., Hennessy, S. W., Roberts, V. A., Getzoff, E. D., Tainer, J. A., & Pique, M. E. (2002). MDB: the metalloprotein database and browser at the Scripps Research Institute. *Nucleic acids research*, 30(1), 379-382.
94. Castro, B., Citterico, M., Kimura, S., Stevens, D. M., Wrzaczek, M., & Coaker, G. (2021). Stress-induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling. *Nature plants*, 7(4), 403-412.
95. Catalgol, B. K., Ozden, S., & Alpertunga, B. (2007). Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. *Toxicology in vitro*, 21(8), 1538-1544.
96. Çavaş, T. (2008). In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 352-358.
97. Cavas, T., Garanko, N. N., & Arkhipchuk, V. V. (2005). Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*, 43(4), 569-574.
98. CDC, 2001. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Managing Elevated Blood Lead Levels Among Young Children: Recommendations From the Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. Atlanta: 2001.
99. CDC. 1991. Preventing lead poisoning in young children. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention.
100. CDC. 2009. Fourth national report on human exposure to environmental chemicals. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/exposurereport>. April 20, 2014.
101. CDC. 2011. State-based prevalence data of ADHD diagnosis. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/ncbddd/adhd/prevalence.html>. February 18, 2020.
102. CDC. 2012. CDC response to Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. Recommendations in "Low level lead exposure harms children: A renewed call for primary prevention." Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. [https://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/cdc\\_response\\_lead\\_exposure\\_recs.pdf](https://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/cdc_response_lead_exposure_recs.pdf). December 8, 2017.
103. CDC. 2018b. Lead. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/nceh/lead/default.htm>. February 5, 2019.



104. Cederbaum, A. I. (2017). Cytochrome P450 and oxidative stress in the liver. In *Liver pathophysiology* (pp. 401-419). Academic Press.
105. Chakraborty, S., Dutta, A. R., Sural, S., Gupta, D., & Sen, S. (2013). Ailing bones and failing kidneys: a case of chronic cadmium toxicity. *Annals of clinical biochemistry*, 50(5), 492-495.
106. Charney, E., Sayre, J., & Coulter, M. (1980). Increased lead absorption in inner city children: where does the lead come from?. *Pediatrics*, 65(2), 226-231.
107. Chaurasia, S. S., Gupta, P., Kar, A., & Maiti, P. K. (1996). Lead induced thyroid dysfunction and lipid peroxidation in the fish *Clarias batrachus* with special reference to hepatic type I-5'-monodeiodinase activity. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 56, 649-654.
108. Checa, J., & Aran, J. M. (2020). Reactive oxygen species: drivers of physiological and pathological processes. *Journal of Inflammation research*, 13, 1057.
109. Chehregani, A., & Malayeri, B. E. (2007). Removal of heavy metals by native accumulator plants. *International Journal of Agriculture and Biology (Pakistan)*.
110. Chen, S. X., & Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. *European journal of biochemistry*, 260(3), 726-735.
111. Chen, Y., Du, L., Li, L., Ma, J., Geng, X., Yao, X., ... & Sun, X. (2017). Cancer risk of sulfonyleureas in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review. *Journal of Diabetes*, 9(5), 482-494.
112. Cheng, K., Tian, H. Z., Zhao, D., Lu, L., Wang, Y., Chen, J., ... & Huang, Z. (2014). Atmospheric emission inventory of cadmium from anthropogenic sources. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(3), 605-616.
113. Chowardhara, B., Borgohain, P., Saha, B., Awasthi, J. P., & Panda, S. K. (2020). Differential oxidative stress responses in *Brassica juncea* (L.) Czern and Coss cultivars induced by cadmium at germination and early seedling stage. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42, 1-12.
114. Cı̇ık, B., & Engin, K. (2005). The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29(1), 113-117.
115. Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212, 475-486.
116. Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88(11), 1707-1719.

117. Collin, V. C., Eymery, F., Genty, B., Rey, P., & Havaux, M. (2008). Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress. *Plant, cell & environment*, *31*(2), 244-257.
118. Colzi, I., Doumett, S., Del Bubba, M., Fornaini, J., Arnetoli, M., Gabbrielli, R., & Gonnelli, C. (2011). On the role of the cell wall in the phenomenon of copper tolerance in *Silene paradoxa* L. *Environmental and Experimental Botany*, *72*(1), 77-83.
119. Commoner, B., Townsend, J., & Pake, G. E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature*, *174*, 689-691.
120. Coogan, T. P., Bare, R. M., & Waalkes, M. P. (1992). Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicology and applied pharmacology*, *113*(2), 227-233.
121. Cooper, A. J., Pulsinelli, W. A., & Duffy, T. E. (1980). Glutathione and ascorbate during ischemia and postischemic reperfusion in rat brain. *Journal of neurochemistry*, *35*(5), 1242-1245.
122. Corpas, I., Gaspar, I., Martínez, S., Codesal, J., Candelas, S., & Antonio, M. T. (1995). Testicular alterations in rats due to gestational and early lactational administration of lead. *Reproductive Toxicology*, *9*(3), 307-313.
123. Couture, P., & Kumar, P. R. (2003). Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology*, *64*(1), 107-120.
124. Couture, P., & Rajotte, J. (2003). Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquat. Toxicol*, *64*, 107.
125. Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., & Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *59*(4), 627-647.
126. Cruz, K. J. C., de Oliveira, A. R. S., & do Nascimento Marreiro, D. (2015). Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. *World journal of diabetes*, *6*(2), 333.
127. Cyboran-Mikołajczyk, S. M., Kleszczyńska, H., Oszmiański, J., & Paślowski, R. (2019). *Allium ursinum* L. leaves components modified the physico-chemical properties of red blood cells protecting them from the effects of oxidative stress. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, *76*(3), 483-491.
128. Cycoń, M., & Piotrowska-Seget, Z. (2015). Biochemical and microbial soil functioning after application of the insecticide imidacloprid. *Journal of Environmental Sciences*, *27*, 147-158.
129. Dally, H., & Hartwig, A. (1997). Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, *18*(5), 1021-1026.

130. Davidović-Plavšić, B., Čolić, S., Vidović, N. i Kukavica, B (2017): Uticaj pesticida na lipidnu peroksidaciju membrana humanih eritrocita. ZBORNIK RADOVA XII SIMPOZIJUM «SAVREMENE TEHNOLOGIJE I PRIVREDNI RAZVOJ» str.11-14. <https://eprints.ugd.edu.mk/19439/1/Investigation%20of%20seam%20performance%20using%20two%20different%20methods.pdf>
131. Davidović-Plavšić, B., Kukavica, B., Škondrić, S., Jimenez-Gallardo, C., & Žabić, M. (2021). Wild garlic extract reduces lipid peroxidation in terbuthylazine-treated human erythrocytes. *Biomarkers*, 26(7), 617-624.
132. Davidović-Plavšić, B., Lukić, N., Nikolić-Kokić, A., & Kukavica, B. (2019). Effects of hemazin SC 500 (terbuthylazine) on antioxidative enzymes in human erythrocytes in vitro. *Journal of the serbian chemical society*, 84(5), 455-465.
133. Davison, A. G., Taylor, A. N., Darbyshire, J., Chettle, D. R., Guthrie, C. J. G., O'Malley, D., ... & Gompertz, D. (1988). Cadmium fume inhalation and emphysema. *The Lancet*, 331(8587), 663-667.
134. De Feo, C. J., Aller, S. G., & Unger, V. M. (2007). A structural perspective on copper uptake in eukaryotes. *Biometals*, 20(3), 705-716.
135. De Matos, A. T., Fontes, M. P. F., Da Costa, L. M., & Martinez, M. A. (2001). Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristics of Brazilian soils. *Environmental pollution*, 111(3), 429-435.
136. Debbaudt, A. L., Ferreira, M. L., & Gschaidner, M. E. (2004). Theoretical and experimental study of M<sup>2+</sup> adsorption on biopolymers. III. Comparative kinetic pattern of Pb, Hg and Cd. *Carbohydrate Polymers*, 56(3), 321-332.
137. Deeba, F., Raza, I., Muhammad, N., Rahman, H., ur Rehman, Z., Azizullah, A., ... & Daud, M. K. (2017). Chlorpyrifos and lambda cyhalothrin-induced oxidative stress in human erythrocytes: in vitro studies. *Toxicology and industrial health*, 33(4), 297-307.
138. Deidda, I., Russo, R., Bonaventura, R., Costa, C., Zito, F., & Lampiasi, N. (2021). Neurotoxicity in marine invertebrates: an update. *Biology*, 10(2), 161.
139. DeLeve, L. D., & Kaplowitz, N. (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacology & therapeutics*, 52(3), 287-305.
140. Deng, Q., Liu, J., Li, Q., Chen, K., Liu, Z., Shen, Y., ... & Yang, X. (2013). Interaction of occupational manganese exposure and alcohol drinking aggravates the increase of liver enzyme concentrations from a cross-sectional study in China. *Environmental Health*, 12(1), 1-6.
141. Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3217-3266.

142. Sujatha Devi, S., Sethu, M., Lalithambigai, P., & Gomathi Priya, P. (2017). Study on the effect of *Artemia franciscana* on the uptake of Zn (II) and Cu (II). *Journal of Water Chemistry and Technology*, 39, 40-46.
143. Dhir, B., Nasim, S. A., Samantary, S., & Srivastava, S. (2012). Assessment of osmolyte accumulation in heavy metal exposed *Salvinia natans*. *International Journal of Botany*, 8(3), 153-158.
144. Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
145. Dietz, KJ. (2007). The Dual Function of Plant Peroxiredoxins in Antioxidant Defence and Redox Signaling. In: Flohé, L., Harris, J.R. (eds) Peroxiredoxin Systems. Subcellular Biochemistry, vol 44. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9_13)
146. DiPaolo, J. A., Nelson, R. L., & Casto, B. C. (1978). In vitro neoplastic transformation of Syrian hamster cells by lead acetate and its relevance to environmental carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 38(3), 452.
147. Draber, W., & Fujita, T. (1992). *Rational approaches to structure, activity, and ecotoxicology of agrochemicals*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 277-397.
148. Drakesmith, H., & Prentice, A. M. (2012). Hecpidin and the iron-infection axis. *science*, 338(6108), 768-772.
149. DSouza, U. J. A. (2017). PESTICIDE TOXICITY AND OXIDATIVE STRESS –A Review. *Borneo Journal of Medical Sciences (BJMS)*, 11(2), 3-3.
150. Duke, S. O., & Dayan, F. E. (2011). 4.03-Bioactivity of herbicides. *Comprehensive biotechnology*, 23-35.
151. Dunlop, E. S., McLaughlin, R., Adams, J. V., Jones, M., Birceanu, O., Christie, M. R., ... & Wilkie, M. P. (2018). Rapid evolution meets invasive species control: the potential for pesticide resistance in sea lamprey. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 75(1), 152-168.
152. Durak, D., Uzun, F. G., Kalender, S., Ogutcu, A., Uzunhisarcikli, M., & Kalender, Y. (2009). Malathion-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 24(3), 235-242.
153. Durak, İ., Aytaç, B., Atmaca, Y., Devrim, E., Avcı, A., Erol, Ç., & Oral, D. (2004). Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. *Life sciences*, 75(16), 1959-1966.

154. Durnam, D. M., & Palmiter, R. D. (1981). Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *Journal of Biological Chemistry*, 256(11), 5712-5716.
155. Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C., & Egwurugwu, J. N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of physical sciences*, 2(5), 112-118.
156. El-Demerdash, F. M. (2007). Lambda-cyhalothrin-induced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidants. *Toxicology in vitro*, 21(3), 392-397.
157. Elinder, C. G., & Järup, L. (1996). Cadmium exposure and health risks: recent findings. *Ambio*, 370-373.
158. Englard, S., & Seifter, S. (1986). The biochemical functions of ascorbic acid. *Annual review of nutrition*, 6(1), 365-406.
159. English, B. A., & Webster, A. A. (2012). Acetylcholinesterase and its inhibitors. In *Primer on the autonomic nervous system* (pp. 631-633). Academic Press.
160. Ensibi, C., & Yahia, M. N. D. (2017). Toxicity assessment of cadmium chloride on planktonic copepods *Centropages ponticus* using biochemical markers. *Toxicology Reports*, 4, 83-88.
161. EPA. 1989. National primary drinking water regulations. U.S. Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations. 40 CFR 141,142.
162. EPA. 1996. Prohibition on gasoline containing lead or lead additives for highway use. U.S. Environmental Protection Agency. Fed Regist 61(23):3832.
163. EPA. 2007. National primary drinking water regulations for lead and copper: Short-term regulatory revisions and clarifications. U.S. Environmental Protection Agency. Fed Regist 72(195):57782-57820. <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2007-10-10/pdf/E7-19432.pdf>. June 28, 2017.
164. Ercal, N., Aykin-Burns, N., & Gurer-Orhan, H. (2001, January). Assessment of lead toxicity in PC-12 cells. In *FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE* (Vol. 31, pp. S116-S116). THE BOULEVARD, LANGFORD LANE, KIDLINGTON, OXFORD OX5 1GB, ENGLAND: PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD.
165. Erdman Jr, J. W., Macdonald, I. A., & Zeisel, S. H. (Eds.). (2012). *Present knowledge in nutrition*. John Wiley & Sons.
166. Eroglu, S., Pandir, D., Uzun, F. G., & Bas, H. (2013). Protective role of vitamins C and E in diclorvos-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. *Biological research*, 46(1), 33-38.
167. Factor-Litvak, P., Slavkovich, V., Liu, X., Popovac, D., Preteni, E., Capuni-Paracka, S., ... & Graziano, J. (1998). Hyperproduction of

- erythropoietin in nonanemic lead-exposed children. *Environmental Health Perspectives*, 106(6), 361-364.
168. Fang, X., Weintraub, N. L., Rios, C. D., Chappell, D. A., Zwacka, R. M., Engelhardt, J. F., ... & Spector, A. A. (1998). Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. *Circulation research*, 82(12), 1289-1297.
169. Farfel, M. R., & Chisolm Jr, J. J. (1991). An evaluation of experimental practices for abatement of residential lead-based paint: report on a pilot project. *Environmental Research*, 55(2), 199-212.
170. Ferianc, P., Farewell, A., & Nyström, T. (1998). The cadmium-stress stimulon of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, 144(4), 1045-1050.
171. Fernandes, A. P., & Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6(1), 63-74.
172. Fernandez-Checa, J. C., & Kaplowitz, N. (2005). Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(3), 263-273.
173. Fernandez-Twinn, D. S., & Ozanne, S. E. (2010). Early life nutrition and metabolic programming. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1212(1), 78-96.
174. Ferreres, F., Figueiredo, R., Bettencourt, S., Carqueijeiro, I., Oliveira, J., Gil-Izquierdo, A., ... & Sottomayor, M. (2011). Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> affair?. *Journal of experimental botany*, 62(8), 2841-2854.
175. Filipič, M., Fatur, T., & Vudrag, M. (2006). Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Human & experimental toxicology*, 25(2), 67-77.
176. Fine, J. S. (2000). Iron poisoning. *Current problems in pediatrics*, 30(3), 71-90.
177. Flora, S. J. S., Kumar, D., & Gupta, S. D. (1991). Interaction of zinc, methionine or their combination with lead at gastrointestinal or post-absorptive level in rats. *Pharmacology & toxicology*, 68(1), 3-7.
178. Flora, S. J. S., Mittal, M., & Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 501.
179. Flora, S. J. S., Saxena, G., Gautam, P., Kaur, P., & Gill, K. D. (2007). Response of lead-induced oxidative stress and alterations in biogenic amines in different rat brain regions to combined administration of DMSA and MiADMSA. *Chemico-biological interactions*, 170(3), 209-220.

180. Flora, S. J. S., Singh, S., & Tandon, S. K. (1989). Thiamine and zinc in prevention or therapy of lead intoxication. *Journal of international medical research*, 17(1), 68-75.
181. Flora, S. J., Flora, G., & Saxena, G. (2006). Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning. In *Lead* (pp. 158-228). Elsevier Science BV.
182. Florence, T. M. (1983). Trace element speciation and aquatic toxicology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2(7), 162-166.
183. Flouty, R., & Khalaf, G. (2015). Role of Cu and Pb on Ni bioaccumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*: validation of the biotic ligand model in binary metal mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 79-86.
184. Fodor F, Prasad MNV, Strzalka K (2002) Physiological responses of vascular plants to heavy metals. In: Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p 149.
185. Foyer, C. H., & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21-25.
186. Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 1056-1071.
187. Franciscato, C., Moraes-Silva, L., Duarte, F. A., Oliveira, C. S., Ineu, R. P., Flores, E. M. M., ... & Pereira, M. E. (2011). Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(3), 480-486.
188. Franco, C. R., Chagas, A. P., & Jorge, R. A. (2002). Ion-exchange equilibria with aluminum pectinates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204(1-3), 183-192.
189. Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., & Apanasets, O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1363-1373.
190. Freire, C., Koifman, R. J., Sarcinelli, P. N., Rosa, A. C. S., Clapauch, R., & Koifman, S. (2013). Long-term exposure to organochlorine pesticides and thyroid status in adults in a heavily contaminated area in Brazil. *Environmental research*, 127, 7-15.
191. Friscic, J., Manojlovic, M., Dekic, R., Haskovic, E., & Kukavica, B. (2014). Effect of pesticides on rat (*Rattus norvegicus*) erythrocytes antioxidant enzymes in vitro. *Journal of Experimental and Molecular Biology*, 15(3), 15.

192. Fritz, R., Bol, J., Hebling, U., Angermüller, S., Völkl, A., Fahimi, H. D., & Mueller, S. (2007). Compartment-dependent management of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by peroxisomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(7), 1119-1129.
193. Fromenty, B., Robin, M. A., Igoudjil, A., Mansouri, A., & Pessayre, D. (2004). The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes & metabolism*, 30(2), 121-138.
194. Fryzova, R., Pohanka, M., Martinkova, P., Cihlarova, H., Brtnicky, M., Hladky, J., & Kynicky, J. (2018). Oxidative stress and heavy metals in plants. *Reviews of environmental contamination and toxicology volume 245*, 129-156.
195. Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of environmental management*, 92(3), 407-418.
196. Fu, Z., & Xi, S. (2020). The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology mechanisms and methods*, 30(3), 167-176.
197. Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 15(6), 1583-1606.
198. Fulekar, M. H., Singh, A., & Bhaduri, A. M. (2009). Genetic engineering strategies for enhancing phytoremediation of heavy metals. *African Journal of Biotechnology*, 8(4).
199. Gagné, F., Cejka, P., André, C., Hausler, R., & Blaise, C. (2007). Neurotoxicological effects of a primary and ozonated treated wastewater on freshwater mussels exposed to an experimental flow-through system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(4), 460-470.
200. Gallagher, C. M., Kovach, J. S., & Meliker, J. R. (2008). Urinary cadmium and osteoporosis in US women ≥ 50 years of age: NHANES 1988–1994 and 1999–2004. *Environmental health perspectives*, 116(10), 1338-1343.
201. García, G., Clemente-Moreno, M. J., Díaz-Vivancos, P., García, M., & Hernández, J. A. (2020). The apoplastic and symplastic antioxidant system in onion: Response to long-term salt stress. *Antioxidants*, 9(1), 67.
202. Gargiulo, G., De Girolamo, P., Ferrara, L., Soppelsa, O., Andreozzi, G., Antonucci, R., & Battaglini, P. (1996). Action of cadmium on the gills of *Carassius auratus* L. in the presence of catabolic NH<sub>3</sub>. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 30, 235-240.
203. Garry, V. F., Harkins, M., Lyubimov, A., Erickson, L., & Long, L. (2002). Reproductive outcomes in the women of the Red River Valley of the north. I. The spouses of pesticide applicators: pregnancy loss, age at menarche, and exposures to pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 65(11), 769-786.



204. Ghosh, L., Adhikari, S., & Ayyappan, S. (2007). Assessment of toxic interactions of heavy metals and their effects on accumulation in tissues of freshwater fish. *Res J Environ Toxicol*, *1*, 37-44.
205. Giaginis, C., Gatzidou, E., & Theocharis, S. (2006). DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, *213*(3), 282-290.
206. Gibson, R. S. (1990). *Principles of nutritional assessment*. Oxford university press.
207. Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, *48*(12), 909-930.
208. Glover, M., Hebert, V. Y., Nichols, K., Xue, S. Y., Thibeaux, T. M., Zavec, J. A., & Dugas, T. R. (2014). Overexpression of mitochondrial antioxidant manganese superoxide dismutase (MnSOD) provides protection against AZT-or 3TC-induced endothelial dysfunction. *Antiviral research*, *111*, 136-142.
209. Glusac, J., Morina, F., Veljovic-Jovanovic, S., Boroja, M., & Kukavica, B. (2013). Changes in the antioxidative metabolism induced by drought and Cd excess in the leaves of houseleek (*Sempervivum tectorum* L.). *Fresenius Environ. Bull*, *22*(6), 1770-1776.
210. Goldstein, G. W. (1993). Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. *Neurotoxicology*, *14*(2-3), 97-101.
211. Gorelova, S. V., & Frontasyeva, M. V. (2017). The use of higher plants in biomonitoring and environmental bioremediation. In *Phytoremediation* (pp. 103-155). Springer, Cham.
212. Goyer, R. A. (1993). Lead toxicity: current concerns. *Environmental health perspectives*, *100*, 177-187.
213. Goyer, R. A., & Clarkson, T. W. (1996). Toxic effects of metals. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*, *5*, 691-736.
214. Grahovac, N. L. (2016). *Praćenje ostataka sulfonilurea u zemljištu u realnim uslovima primenom visoko-pritisne tečne hromatografije* (Doctoral dissertation, University of Novi Sad (Serbia)).
215. Grammou, A., Papadimitriou, C., Samaras, P., Vasara, E., & Papadopoulos, A. I. (2011). Effect of municipal waste water effluent upon the expression of Glutathione S-transferase isoenzymes of brine shrimp *Artemia*. *Chemosphere*, *84*(1), 105-109.
216. Grazuleviciene, R., Nadisauskiene, R., Buinauskiene, J., & Grazulevicius, T. (2009). Effects of elevated levels of manganese and iron in drinking water on birth outcomes. *Polish Journal of Environmental Studies*, *18*(5).
217. Greger, J. L. (1999). Nutrition versus toxicology of manganese in humans: evaluation of potential biomarkers. *Neurotoxicology*, *20*(2-3), 205-212.

218. Grenni, P., Rodríguez-Cruz, M. S., Herrero-Hernández, E., Marín-Benito, J. M., Sánchez-Martín, M. J., & Barra Caracciolo, A. (2012). Effects of wood amendments on the degradation of terbuthylazine and on soil microbial community activity in a clay loam soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(8), 5401-5412.
219. Griffith, O. W., & Meister, A. (1979). Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(11), 5606-5610.
220. Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1985) Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* 230:674-676.
221. Grill, E., Winnacker, E. L., & Zenk, M. H. (1987). Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(2), 439-443.
222. Grosell, M., McDonald, M. D., Walsh, P. J., & Wood, C. M. (2004). Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) II: copper accumulation, drinking rate and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in osmoregulatory tissues. *Aquatic Toxicology*, 68(3), 263-275.
223. Guével, R. L., Petit, F. G., Goff, P. L., Métivier, R., Valotaire, Y., & Pakdel, F. (2000). Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. *Biology of Reproduction*, 63(1), 259-266.
224. Gulson, B., Mizon, K., Taylor, A., Korsch, M., Stauber, J., Davis, J. M., ... & Antin, L. (2008). Longitudinal monitoring of selected elements in blood of healthy young children. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 22(3), 206-214.
225. Gultekin, F. A. T. İ. H., Ozturk, M., & Akdogan, M. (2000). The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). *Archives of toxicology*, 74, 533-538.
226. Gunnell, D., & Eddleston, M. (2003). Suicide by intentional ingestion of pesticides: a continuing tragedy in developing countries. *International journal of epidemiology*, 32(6), 902-909.
227. Gunther, M. R., Sampath, V., & Caughey, W. S. (1999). Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(11-12), 1388-1395.
228. Guo, X., Meng, H., Zhu, S., Zhang, T., & Yu, S. (2015). Purifying sugar beet pectins from non-pectic components by means of metal precipitation. *Food hydrocolloids*, 51, 69-75.
229. Gupta, R., & Luan, S. (2003). Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiology*, 132(3), 1149-1152.

230. Gupta, R., Shukla, R. K., Chandravanshi, L. P., Srivastava, P., Dhuriya, Y. K., Shanker, J., ... & Khanna, V. K. (2017). Protective role of quercetin in cadmium-induced cholinergic dysfunctions in rat brain by modulating mitochondrial integrity and MAP kinase signaling. *Molecular neurobiology*, *54*, 4560-4583.
231. Gupta, V. K., Kumar, A., Pereira, M. D. L., Siddiqi, N. J., & Sharma, B. (2020). Anti-inflammatory and antioxidative potential of Aloe vera on the cartap and malathion mediated toxicity in Wistar rats. *International journal of environmental research and public health*, *17*(14), 5177.
232. Guzzi, G., & La Porta, C. A. (2008). Molecular mechanisms triggered by mercury. *Toxicology*, *244*(1), 1-12.
233. Gvero Miloš, Dino Hasanagić, Ljiljana Topalić-Trivunović, Goran Vučić, Biljana Kukavica (2017) UTICAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA Pb, Mn i Cd NA AKTIVNOST PEROKSIDAZA I KONCENTRACIJU FENOLA U LISTOVIMA Reynoutria japonica Houtt. Savremene tehnologije i privredni razvoj. 21-25.
234. Hajar, E. W. I., Sulaiman, A. Z. B., & Sakinah, A. M. (2014). Assessment of heavy metals tolerance in leaves, stems and flowers of Stevia rebaudiana plant. *Procedia Environmental Sciences*, *20*, 386-393.
235. Hall, J. Á. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany*, *53*(366), 1-11.
236. Hall, J. C., Hoagland, R. E., & Zablotowicz, R. M. (2001). Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences. Washington, DC: American Chemical Society. 432 p.
237. Halliwell, B. (1999), Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning), *Free radical research*, *31*(4), 261-272.
238. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, *186*, 1-85.
239. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
240. Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press.
241. Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C., 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Clarendon Press, Oxford, UK
242. Hamelink, J., Landrum, P. F., Bergman, H., & Benson, W. H. (1994). *Bioavailability: physical, chemical, and biological interactions*. CRC press.
243. Hanna-Attisha, Mona, et al. "Elevated blood lead levels in children associated with the Flint drinking water crisis: a spatial analysis of risk

- and public health response." *American journal of public health* 106.2 (2016): 283-290.
244. Harvey, B. (2002). Managing elevated blood lead levels among young children: Recommendations from the Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention.
  245. Harvey, L. J., & McArdle, H. J. (2008). Biomarkers of copper status: a brief update. *British Journal of Nutrition*, 99(S3), S10-S13.
  246. Hatzios, K. K. 2001. Functions and regulations of glutathione S-transferases. In *Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences*, [Hall, J. C., R. E. Hoagland, and R. M. Zoblutowicz, Editors]. ACS symposium series 777, Washington, D. C. pp 218-239.
  247. Hauptmann, N., Grimsby, J., Shih, J. C., & Cadenas, E. (1996). The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Archives of biochemistry and biophysics*, 335(2), 295-304.
  248. Hawkins, N. J., Bass, C., Dixon, A., & Neve, P. (2019). The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews*, 94(1), 135-155.
  249. Hay, J. V. (1990). Chemistry of sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science*, 29(3), 247-261.
  250. He, Z. L., Yang, X. E., & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace elements in Medicine and Biology*, 19(2-3), 125-140.
  251. Heal, K. A. V. (2001). Manganese and land-use in upland catchments in Scotland. *Science of the Total Environment*, 265(1-3), 169-179.
  252. Hellman, N. E., & Gitlin, J. D. (2002). Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual review of nutrition*, 22, 439.
  253. Henson, M. C., & Chedrese, P. J. (2004). Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Experimental biology and medicine*, 229(5), 383-392.
  254. Herawati, N., Suzuki, S., Hayashi, K., Rivai, I. F., & Koyama, H. (2000). Cadmium, copper, and zinc levels in rice and soil of Japan, Indonesia, and China by soil type. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 64(1), 33-39.
  255. Hermes-Lima, M., Pereira, B., & Bechara, E. J. H. (1991). Are free radicals involved in lead poisoning?. *Xenobiotica*, 21(8), 1085-1090.
  256. Hershko, C. (2007). Mechanism of iron toxicity. *Food and nutrition bulletin*, 28(4\_suppl4), S500-S509.
  257. Hertz-Picciotto, I. (2000). The evidence that lead increases the risk for spontaneous abortion. *American journal of industrial medicine*, 38(3), 300-309.

258. Hillman, R. (1990). Hematopoietic agents: growth factors, minerals, and vitamins. *The pharmacological basis of therapeutics*.
259. Hilmy, A. M., Shabana, M. B., & Daabees, A. Y. (1985). Effects of cadmium toxicity upon the in vivo and in vitro activity of proteins and five enzymes in blood serum and tissue homogenates of Mugil cephalus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 81(1), 145-153.
260. Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., & Yodoi, J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), 3633-3638.
261. Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., & Yodoi, J. (1999). Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus: a two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27891-27897.
262. Hoagland, R. E., & Zablutowicz, R. M. (2001). The role of plant and microbial hydrolytic enzymes in pesticide metabolism. In *ACS symposium series* (Vol. 777, pp. 58-88). Washington, DC; American Chemical Society; 1999.
263. Hoagland, R. E., Hall, J. C., & Zablutowicz, R. M. (2000). *Pesticide biotransformation in plants and micro-organisms*. American Chemical Society.
264. Hoagland, R. E., Zablutowicz, R. M., & Hall, J. C. (2001). Pesticide metabolism in plants and microorganisms: an overview.
265. Hoagland, R. E., & Zablutowicz, R. M. (2001). The role of plant and microbial hydrolytic enzymes in pesticide metabolism. In *ACS symposium series* (Vol. 777, pp. 58-88). Washington, DC; American Chemical Society; 1999.
266. Hodžić, E., Balaban, M., Šuškalović, N., Galijašević, S., Hasanagić, D., & Kukavica, B. (2019). Antioxidative response of *Melissa officinalis* L. and *Valeriana officinalis* L. leaves exposed to exogenous melatonin and excessive zinc and cadmium levels. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 84(1), 11-25.
267. Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *Journal of Biological Chemistry*, 264(24), 13963-13966.
268. Holmgren, A., & Sengupta, R. (2010). The use of thiols by ribonucleotide reductase. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1617-1628.
269. Hontela, A., Daniel, C., & Ricard, A. C. (1996). Effects of acute and subacute exposures to cadmium on the interrenal and thyroid function in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic toxicology*, 35(3-4), 171-182.

270. Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., & Chang, C. C. (2007). Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant physiology and biochemistry*, 45(1), 62-69.
271. Howe, P., Malcolm, H., & Dobson, S. (2004). *Manganese and its compounds: environmental aspects* (No. 63). World Health Organization.
272. Hsu, Y. T., & Kao, C. H. (2007). Cadmium-induced oxidative damage in rice leaves is reduced by polyamines. *Plant and Soil*, 291, 27-37.
273. Huang, W. J., Zhang, X. I. A., & Chen, W. W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical reports*, 4(5), 519-522.
274. Huel, G., Tubert, P., Frery, N., Moreau, T., & Dreyfus, J. (1992). Joint effect of gestational age and maternal lead exposure on psychomotor development of the child at six years. *Neurotoxicology*, 13(1), 249-254.
275. Huseynova, I., Balakishiyeva, G., Aliyeva, D., Gurbanova, U., Bayramova, J., Mustafayev, N., & Aliyev, J. (2017). Changes in the activities of metabolic enzymes and antioxidant defense system in 'Candidatus phytoplasma solani' infected pepper (*Capsicum annum* L.) plants. *Net Journal of Agricultural Science*, 5(2), 58-65.
276. Hwua, Y. S., & Yang, J. L. (1998). Effect of 3-aminotriazole on anchorage independence and mutagenicity in cadmium-and lead-treated diploid human fibroblasts. *Carcinogenesis*, 19(5), 881-888.
277. Ilyukha, V. A. (2001). Superoxide dismutase and catalase in the organs of mammals of different ecogenesis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 37, 241-245.
278. Irfan, M., Hayat, S., Ahmad, A., & Alyemeni, M. N. (2013). Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi journal of biological sciences*, 20(1), 1-10.
279. Izawa, S., Maeda, K., Sugiyama, K. I., Mano, J. I., Inoue, Y., & Kimura, A. (1999). Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28459-28465.
280. Izzet, T., Osman, K., Ethem, U., Nihat, Y., Ramazan, K., Mustafa, D., ... & Gonul, S. (2005). Oxidative stress in portal hypertension-induced rats with particular emphasis on nitric oxide and trace metals. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(23), 3570.
281. Jacobs, D. E., Clickner, R. P., Zhou, J. Y., Viet, S. M., Marker, D. A., Rogers, J. W., ... & Friedman, W. (2002). The prevalence of lead-based paint hazards in US housing. *Environmental health perspectives*, 110(10), A599-A606.
282. Jamieson, J. A., Taylor, C. G., & Weiler, H. A. (2006). Marginal zinc deficiency exacerbates bone lead accumulation and high dietary zinc

- attenuates lead accumulation at the expense of bone density in growing rats. *Toxicological sciences*, 92(1), 286-294.
283. Jarosz, M., Olbert, M., Wyszogrodzka, G., Młyniec, K., & Librowski, T. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- $\kappa$ B signaling. *Inflammopharmacology*, 25(1), 11-24.
284. Järup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G., & Vanter, M. (1998). Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 1-51.
285. Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., Trebše, P., Roš, M., & Sepčić, K. (2007). The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144(4), 303-309.
286. Jezierska, B., & Witeska, M. (2001). Metal toxicity to fish. *Monografie. University of Podlasie (Poland)*.
287. Jia, H., Wang, X., Shi, C., Guo, J., Ma, P., Ren, X., ... & Li, J. (2020). Hydrogen sulfide decreases Cd translocation from root to shoot through increasing Cd accumulation in cell wall and decreasing Cd<sup>2+</sup> influx in *Isatis indigotica*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 605-612.
288. Jiang, Q. C., Dilixiati, A., Zhang, C., Liu, X. Z., Huang, W. T., Lv, L. L., ... & Yang, J. X. (2013). Metabolic and antioxidant responses in juveniles of *Cherax quadricarinatus* under acute cadmium stress. *Journal of Crustacean Biology*, 33(4), 552-556
289. Jiun, Y. S., & Hsien, L. T. (1994). Lipid peroxidation in workers exposed to lead. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 49(4), 256-259.
290. Jo, K. M., Heo, N. Y., Park, S. H., Moon, Y. S., Kim, T. O., Park, J., ... & Lee, J. (2019). Serum aminotransferase level in rhabdomyolysis according to concurrent liver disease. *The Korean Journal of Gastroenterology*, 74(4), 205-211.
291. Johns, M., Fyalka, R., Shea, J. A., Neumann, W. L., Rausaria, S., Msengi, E. N., ... & Kwon, G. (2015). SR-135, a peroxyinitrite decomposing catalyst, enhances  $\beta$ -cell function and survival in B6D2F1 mice fed a high fat diet. *Archives of biochemistry and biophysics*, 577, 49-59.
292. Johnson, D. L., & Bretsch, J. K. (2002). Soil lead and children's blood lead levels in Syracuse, NY, USA. *Environmental Geochemistry and Health*, 24, 375-385.
293. Jokanović, M. (2001). *Toksikologija*. Elit-Medica.
294. Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65-87.
295. Jones, I., Kille, P., & Sweeney, G. (2001). Cadmium delays growth hormone expression during rainbow trout development. *Journal of Fish Biology*, 59(4), 1015-1022.

296. Juarez, A. B., Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Vesentini, N., Conforti, V., & Gualtieri, P. (2008). In vivo microspectroscopy monitoring of chromium effects on the photosynthetic and photoreceptive apparatus of *Eudorina unicocca* and *Chlorella kessleri*. *Journal of Environmental Monitoring*, 10(11), 1313-1318.
297. Jurado, A. S., Fernandes, M. A., Videira, R. A., Peixoto, F. P., & Vicente, J. A. (2011). Herbicides: the face and the reverse of the coin. An in vitro approach to the toxicity of herbicides in non-target organisms. *Herbicides and environment*, 1-44.
298. Kaelin Jr, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*, 30(4), 393-402.
299. Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K., Muller, H. M., Botella-Munoz, J., ... & Becker, K. (2001). Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 291(5504), 643-646.
300. Kartel, M. T., Kupchik, L. A., & Veisov, B. K. (1999). Evaluation of pectin binding of heavy metal ions in aqueous solutions. *Chemosphere*, 38(11), 2591-2596.
301. Kasperczyk, A., Machnik, G., Dobrakowski, M., Sypniewski, D., Birkner, E., & Kasperczyk, S. (2012). Gene expression and activity of antioxidant enzymes in the blood cells of workers who were occupationally exposed to lead. *Toxicology*, 301(1-3), 79-84.
302. Kasperczyk, S., Birkner, E., Kasperczyk, A., & Kasperczyk, J. (2005). Lipids, lipid peroxidation and 7-ketocholesterol in workers exposed to lead. *Human & experimental toxicology*, 24(6), 287-295.
303. Kaul, B., Sandhu, R. S., Depratt, C., & Reyes, F. (1999). Follow-up screening of lead-poisoned children near an auto battery recycling plant, Haina, Dominican Republic. *Environmental health perspectives*, 107(11), 917-920.
304. Khalifa, F. K., & Alkhalaf, M. I. (2020). Effects of black seed and thyme leaves dietary supplements against malathion insecticide-induced toxicity in experimental rat model. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 914-919.
305. Khaliq, M. A., James, B., Chen, Y. H., Saqib, H. S. A., Li, H. H., Jayasuriya, P., & Guo, W. (2019). Uptake, translocation, and accumulation of Cd and its interaction with mineral nutrients (Fe, Zn, Ni, Ca, Mg) in upland rice. *Chemosphere*, 215, 916-924.
306. Khanna, K., Kohli, S. K., Bali, S., Kaur, P., Saini, P., Bakshi, P., ... & Bhardwaj, R. (2018). Role of micro-organisms in modulating antioxidant defence in plants exposed to metal toxicity. In *Plants Under Metal and Metalloid Stress* (pp. 303-335). Springer, Singapore.



307. Kim, B. E., Nevitt, T., & Thiele, D. J. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature chemical biology*, 4(3), 176-185.
308. Kinnula, V. L., & Crapo, J. D. (2003). Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 167(12), 1600-1619.
309. Kirkhorn, S. R., & Schenker, M. B. (2002). Current health effects of agricultural work: respiratory disease, cancer, reproductive effects, musculoskeletal injuries, and pesticide-related illnesses. *Journal of Agricultural Safety and Health*, 8(2), 199.
310. Kiruthiga, P. V., Shafreen, R. B., Pandian, S. K., & Devi, K. P. (2007). Silymarin protection against major reactive oxygen species released by environmental toxins: exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure in erythrocytes. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 100(6), 414-419.
311. Klaassen, C. D., & Watkins, J. B. (2015). Casarett and Doull's essentials of toxicology. *Developmental toxicology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 150-1.
312. Klementova, S., & Keltnerova, L. (2015). Triazine herbicides in the environment. *Herbicides, Physiology of Action, and Safety*, 71-96.
313. Klevay, L. M. (2011). Is the Western diet adequate in copper?. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25(4), 204-212.
314. Knowles, S. O., & Donaldson, W. E. (1990). Dietary modification of lead toxicity: effects on fatty acid and eicosanoid metabolism in chicks. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 95(1), 99-104.
315. Kochian, L. V., Pineros, M. A., & Hoekenga, O. A. (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, 274(1), 175-195.
316. Koffler, B. E., Bloem, E., Zellnig, G., & Zechmann, B. (2013). High resolution imaging of subcellular glutathione concentrations by quantitative immunoelectron microscopy in different leaf areas of Arabidopsis. *Micron*, 45, 119-128.
317. Koh, E. S., Kim, S. J., Yoon, H. E., Chung, J. H., Chung, S., Park, C. W., ... & Shin, S. J. (2014). Association of blood manganese level with diabetes and renal dysfunction: a cross-sectional study of the Korean general population. *BMC endocrine disorders*, 14(1), 1-8.
318. Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), 472-479.
319. Kojima, H., Sata, F., Takeuchi, S., Sueyoshi, T., & Nagai, T. (2011). Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using in vitro reporter gene assays. *Toxicology*, 280(3), 77-87.

320. Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of biological chemistry*, 257(10), 5751-5754.
321. Korc, M. U. R. R. A. Y. (1983). Manganese action on pancreatic protein synthesis in normal and diabetic rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 245(5), G628-G634.
322. Korte, F., Kvesitadze, G., Ugrekhelidze, D., Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Buadze, O., ... & Coulston, F. (2000). Organic toxicants and plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 47(1), 1-26.
323. Krämer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J., & Smith, J. A. C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379, 635-638.
324. Krauth-Siegel, R. L., & Comini, M. A. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(11), 1236-1248.
325. Kriebardis, A. G., Antonelou, M. H., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H., & Papassideri, I. S. (2007). Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 11(1), 148-155.
326. Kucka, M., Pogrmić-Majkić, K., Fa, S., Stojilković, S. S., & Kovacević, R. (2012). Atrazine acts as an endocrine disrupter by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase-4. *Toxicology and applied pharmacology*, 265(1), 19-26.
327. Kuehl Jr, F. A., & Egan, R. W. (1980). Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science*, 210(4473), 978-984.
328. Kukavica, B., Davidović-Plavšić, B., Savić, A., Dmitrović, D., Šukalo, G., Đurić-Savić, S., & Vučić, G. (2023). Oxidative stress and neurotoxicity of cadmium and zinc on *Artemia franciscana*. *Biological Trace Element Research*, 201(5), 2636-2649.
329. Kukavica, B., Mojović, M., Vucčinić, Ž., Maksimović, V., Takahama, U., & Jovanović, S. V. (2009). Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall, and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant and Cell Physiology*, 50(2), 304-317.
330. Kumar, C., Igbaria, A., d'Autréaux, B., Planson, A. G., Junot, C., Godat, E., ... & Toledano, M. B. (2011). Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *The EMBO journal*, 30(10), 2044-2056.
331. Kumar, N., Baudh, K., Kumar, S., Dwivedi, N., Singh, D. P., & Barman, S. C. (2013). Accumulation of metals in weed species grown on the soil contaminated with industrial waste and their phytoremediation potential. *Ecological engineering*, 61, 491-495.

332. Küpper, H., Küpper, F., & Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*, *47*(2), 259-266.
333. Kuvelja, A., Davidović-Plavšić, B., Lukić, D., Gajić, N., Žabić, M., Škondrić, S., & Kukavica, B. (2021). Impact of nicosulfuron on biochemical markers of oxidative stress in maize leaves and roots. *Biljni lekar*, *49*(2), 201-217.
334. Kwong, L. K., & Sohal, R. S. (1998). Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*, *350*(1), 118-126.
335. Laidlaw, M. A., & Filippelli, G. M. (2008). Resuspension of urban soils as a persistent source of lead poisoning in children: a review and new directions. *Applied geochemistry*, *23*(8), 2021-2039.
336. Laidlaw, M. A., Mielke, H. W., Filippelli, G. M., Johnson, D. L., & Gonzales, C. R. (2005). Seasonality and children's blood lead levels: developing a predictive model using climatic variables and blood lead data from Indianapolis, Indiana, Syracuse, New York, and New Orleans, Louisiana (USA). *Environmental Health Perspectives*, *113*(6), 793-800.
337. Laidlaw, M. A., Zahran, S., Mielke, H. W., Taylor, M. P., & Filippelli, G. M. (2012). Re-suspension of lead contaminated urban soil as a dominant source of atmospheric lead in Birmingham, Chicago, Detroit and Pittsburgh, USA. *Atmospheric environment*, *49*, 302-310.
338. Lambeth, J. D., & Neish, A. S. (2014). Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *9*, 119-145.
339. Lane, T. W., Saito, M. A., George, G. N., Pickering, I. J., Prince, R. C., & Morel, F. M. (2005). A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, *435*(7038), 42-42.
340. Lanphear, B. P., Burgoon, D. A., Rust, S. W., Eberly, S., & Galke, W. (1998a). Environmental exposures to lead and urban children's blood lead levels. *Environmental Research*, *76*(2), 120-130.
341. Lash, L. H. (2009). Renal glutathione transport: Identification of carriers, physiological functions, and controversies. *Biofactors*, *35*(6), 500-508.
342. Lauterburg, B. H., Adams, J. D., & Mitchell, J. R. (1984). Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology*, *4*(4), 586-590.
343. LeBaron, H. M., McFarland, J. E., & Burnside, O. C. (2008). The triazine herbicides: a milestone in the development of weed control technology. *The triazine herbicides*, *50*, 1-12.
344. Lee, T. H., Kim, S. U., Yu, S. L., Kim, S. H., Park, D. S., Moon, H. B., ... & Yu, D. Y. (2003). Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood*, *101*(12), 5033-5038.

345. Li, L., & Yang, X. (2018). The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: links and interactions. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
346. Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., & Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & redox signaling*, 19(9), 998-1011.
347. Lin, R. H., Lee, C. H., Chen, W. K., & Lin-Shiau, S. Y. (1994). Studies on cytotoxic and genotoxic effects of cadmium nitrate and lead nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Environmental and molecular mutagenesis*, 23(2), 143-149.
348. Liu, D., Liu, L., Hu, Z., Song, Z., Wang, Y., & Chen, Z. (2018). Evaluation of the oxidative stress-related genes ALOX5, ALOX5AP, GPX1, GPX3 and MPO for contribution to the risk of type 2 diabetes mellitus in the Han Chinese population. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 15(4), 336-339.
349. Liu, S., He, Y., Tian, H., Yu, C., Tan, W., Li, Z., & Duan, L. (2019). Application of brassinosteroid mimetics improves growth and tolerance of maize to nicosulfuron toxicity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 701-712.
350. Löffler, M., Becker, C., Wegerle, E., & Schuster, G. (1996). Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria. *Histochemistry and cell biology*, 105(2), 119-128.
351. López-Revuelta, A., Sánchez-Gallego, J. I., Hernández-Hernández, A., Sánchez-Yagüe, J., & Llanillo, M. (2006). Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chemico-biological interactions*, 161(1), 79-91.
352. Lovaković, B. T., Pizent, A., Kašuba, V., Kopjar, N., Micek, V., Mendaš, G., ... & Želježić, D. (2017). Effects of sub-chronic exposure to terbuthylazine on DNA damage, oxidative stress and parent compound/metabolite levels in adult male rats. *Food and chemical toxicology*, 108, 93-103.
353. Lundberg, M., Johansson, C., Chandra, J., Enoksson, M., Jacobsson, G., Ljung, J., ... & Holmgren, A. (2001). Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26269-26275.
354. Luo, D., Zhou, T., Tao, Y., Feng, Y., Shen, X., & Mei, S. (2016). Exposure to organochlorine pesticides and non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis of observational studies. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.

355. Lushchak, O. V., & Lushchak, V. I. (2008). Catalase modifies yeast *Saccharomyces cerevisiae* response towards S-nitrosoglutathione-induced stress. *Redox Report*, 13(6), 283-291.
356. Maher, P. (2005). The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing research reviews*, 4(2), 288-314.
357. Maheshwari, N., & Mahmood, R. (2020). Protective effect of catechin on pentachlorophenol-induced cytotoxicity and genotoxicity in isolated human blood cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(12), 13826-13843.
358. Maheshwari, R., & Dubey, R. S. (2009). Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant growth regulation*, 59, 37-49.
359. Malecki, E. A. (2001). Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons. *Brain Research Bulletin*, 55(2), 225-228.
360. MANNERVIK, B. (1987). The enzymes of glutathione metabolism: an overview. *Biochemical Society Transactions*, 15(4), 717-718.
361. Mannino, D. M., Holguin, F., Greves, H. M., Savage-Brown, A., Stock, A. L., & Jones, R. L. (2004). Urinary cadmium levels predict lower lung function in current and former smokers: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Thorax*, 59(3), 194-198.
362. Maret, W., & Sandstead, H. H. (2006). Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 20(1), 3-18.
363. Marjanović Čermak, A. M., Pavičić, I., & Želježić, D. (2018). Redox imbalance caused by pesticides: a review of OPENTOX-related research. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 69(2), 126-134.
364. Marshall, G., Ferreccio, C., Yuan, Y., Bates, M. N., Steinmaus, C., Selvin, S., ... & Smith, A. H. (2007). Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(12), 920-928.
365. Martin, M. H. (2012). *Biological monitoring of heavy metal pollution: land and air*. Springer Science & Business Media.
366. Martin-Montañez, E., Pavia, J., Santin, L. J., Boraldi, F., Estivill-Torres, G., Aguirre, J. A., & Garcia-Fernandez, M. (2014). Involvement of IGF-II receptors in the antioxidant and neuroprotective effects of IGF-II on adult cortical neuronal cultures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(7), 1041-1051.
367. Maruta, T., & Ishikawa, T. (2018). *Ascorbate Peroxidase Functions in Higher Plants: The Control of the Balance Between Oxidative Damage and Signaling*. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, 41-59.

368. Mascagni, P., Consonni, D., Bregante, G., Chiappino, G., & Toffoletto, F. (2003). Olfactory function in workers exposed to moderate airborne cadmium levels. *Neurotoxicology*, *24*(4-5), 717-724.
369. Mata, Y. N., Blázquez, M. L., Ballester, A., González, F., & Muñoz, J. A. (2009). Sugar-beet pulp pectin gels as biosorbent for heavy metals: preparation and determination of biosorption and desorption characteristics. *Chemical Engineering Journal*, *150*(2-3), 289-301.
370. Matsui, Minoru, et al. "Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene." *Developmental biology* *178*.1 (1996): 179-185.
371. Matsuo, Y., Akiyama, N., Nakamura, H., Yodoi, J., Noda, M., & Kizaka-Kondoh, S. (2001). Identification of a novel thioredoxin-related transmembrane protein. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(13), 10032-10038.
372. Matsuo, Y., Nishinaka, Y., Suzuki, S., Kojima, M., Kizaka-Kondoh, S., Kondo, N., ... & Yodoi, J. (2004). TMX, a human transmembrane oxidoreductase of the thioredoxin family: the possible role in disulfide-linked protein folding in the endoplasmic reticulum. *Archives of biochemistry and biophysics*, *423*(1), 81-87.
373. Mazur, C. S., Marchitti, S. A., & Zastre, J. (2015). P-glycoprotein inhibition by the agricultural pesticide propiconazole and its hydroxylated metabolites: Implications for pesticide–drug interactions. *Toxicology letters*, *232*(1), 37-45.
374. McCord, J. M. (1988). Free radicals and myocardial ischemia: overview and outlook. *Free Radical Biology and Medicine*, *4*(1), 9-14.
375. McCutcheon, S. C. and J. L. Schnoor (Editors). 2003. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, Wiley, New York. 987 p.
376. Mehes-Smith, M., Nkongolo, K. K., Narendrula, R., & Cholewa, E. (2013). Mobility of heavy metals in plants and soil: a case study from a mining region in Canada. *American Journal of Environmental Sciences*, *9*(6), 483-493.
377. Mehta, K., Van Thiel, D. H., Shah, N., & Mobarhan, S. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutrition reviews*, *60*(9), 289-293.
378. Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of biological chemistry*, *263*(33), 17205-17208.
379. Memon, A. R., AKTOPRAKLIGİL, D., ÖZDEMİR, A., & Vertii, A. (2001). Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. *Turkish Journal of Botany*, *25*(3), 111-121.
380. Méndez-Armenta, M., Villeda-Hernández, J., Barroso-Moguel, R., Nava-Ruí z, C., Jiménez-Capdeville, M. E., & Rí os, C. (2003). Brain regional

- lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. *Toxicology Letters*, 144(2), 151-157.
381. Merian, E., & Clarkson, T. W. (1991). *Metals and their compounds in the environment*. Vch.
  382. Mhamdi, A., & Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 145(15), dev164376.
  383. Mikkelsen, S. U., Gillberg, L., Lykkesfeldt, J., & Grønbaek, K. (2021). The role of vitamin C in epigenetic cancer therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 170, 179-193.
  384. Mildvan, A. S. (1970). 9 Metals in Enzyme Catalysis. In *The enzymes* (Vol. 2, pp. 445-536). Academic Press.
  385. Mills, G. C. (1957). Hemoglobin catabolism: I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, 229(1), 189-197.
  386. Miranda, T., Vieira, L. R., & Guilhermino, L. (2019). Neurotoxicity, behavior, and lethal effects of cadmium, microplastics, and their mixtures on *Pomatoschistus microps* juveniles from two wild populations exposed under laboratory conditions—implications to environmental and human risk assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(16), 2857.
  387. Miranda-Vizuete, A., Sadek, C. M., Jiménez, A., Krause, W. J., Sutovsky, P., & Oko, R. (2004). The mammalian testis-specific thioredoxin system. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6(1), 25-40.
  388. Mitra, R. S. (1984). Protein synthesis in *Escherichia coli* during recovery from exposure to low levels of Cd<sup>2+</sup>. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(5), 1012-1016.
  389. Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
  390. Mittler, R., & Zilinskas, B. A. (1992). Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21802-21807.
  391. Mocchegiani, E., Muzzioli, M., & Giacconi, R. (2000). Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology*, 1(2), 133-143.
  392. Modaihsh, A. S., Ai-Swailem, M. S., & Mahjoub, M. O. (2004). Heavy metals content of commercial inorganic fertilizers used in the Kingdom of Saudi Arabia. *Journal of Agricultural and Marine Sciences [JAMS]*, 9(1), 21-25.
  393. Mohamed, A. H., Sheir, S. K., Osman, G. Y., & Abd-El Azeem, H. H. (2014). Toxic effects of heavy metals pollution on biochemical activities of the adult brine shrimp, *Artemia salina*. *Can J Pure App Sci*, 8, 3019-3028.

394. Mohiseni, M., Farhangi, M., Agh, N., Mirvaghefi, A., & Talebi, K. (2017). Toxicity and bioconcentration of cadmium and copper in *Artemia urmiana* nauplii. *Iranian Journal of Toxicology*, 11(1), 33-41.
395. Mohod, C. V., & Dhote, J. (2013). Review of heavy metals in drinking water and their effect on human health. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2(7), 2992-2996.
396. Mojović, M., Vuletić, M., Bačić, G. G., & Vučinić, Ž. (2004). Oxygen radicals produced by plant plasma membranes: an EPR spin-trap study. *Journal of experimental botany*, 55(408), 2523-2531.
397. Moreira, E. G., Vassilieff, I., & Vassilieff, V. S. (2001). Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. *Neurotoxicology and Teratology*, 23(5), 489-495.
398. Morina, F., Jovanović, L., Kukavica, B., & Veljović-Jovanović, S. (2008). Peroxidase, phenolics, and antioxidative capacity of common mullein (*Verbascum thapsus* L.) grown in a zinc excess. *Archives of Biological Sciences*, 60(4), 687-695.
399. Morina, F., Vidović, M., Kukavica, B., & Veljović-Jovanović, S. (2015). Induction of peroxidase isoforms in the roots of two *Verbascum thapsus* L. populations is involved in adaptive responses to excess Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>. *Botanica Serbica*, 39(2), 151-158.
400. Mossa, A. T. H., Heikal, T. M., & Mohafrash, S. M. M. (2014). Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by aspirin and diazinon: the protective role of selenium. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 4, S603-S609.
401. Mougín, C. P., Corio-Costet, M. F., & Werek-Reichhart, D. (2001). Plant and fungal cytochrome P-450s: their role in pesticide transformation. In *Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences*, [Hall, J. C., R. E. Hoagland, and R. M. Zoblotowicz, Editors]. ACS symposium series 777, Washington, D. C. pp 166-181.
402. Moyano, P., de Frias, M., Lobo, M., Anadon, M. J., Sola, E., Pelayo, A., ... & Del Pino, J. (2018). Cadmium induced ROS alters M1 and M3 receptors, leading to SN56 cholinergic neuronal loss, through AChE variants disruption. *Toxicology*, 394, 54-62.
403. Mudgal, V., Madaan, N., Mudgal, A., Singh, R. B., & Mishra, S. (2010). Effect of toxic metals on human health. *The open Nutraceuticals journal*, 3(1).
404. Mudipalli, A. (2007). Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian Journal of Medical Research*, 126(6), 518-527.
405. Munusamy, S., & MacMillan-Crow, L. A. (2009). Mitochondrial superoxide plays a crucial role in the development of mitochondrial



- dysfunction during high glucose exposure in rat renal proximal tubular cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(8), 1149-1157.
406. MUSICCO, M., SANT, M., MOLINARI, S., FILIPPINI, G., GATTA, G., & BERRINO, F. (1988). A case-control study of brain gliomas and occupational exposure to chemical carcinogens: the risk to farmers. *American journal of epidemiology*, 128(4), 778-785.
  407. Nagababu, E., Chrest, F. J., & Rifkind, J. M. (2003). Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1620(1-3), 211-217.
  408. Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubeze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J. F., & Moukrim, A. (1997). Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 901-908.
  409. Nakagawa, H., Sato, T., & Kubo, H. (1995). Evaluation of chronic toxicity of water lead for carp *Cyprinus carpio* using its blood 5-aminolevulinic acid dehydratase. *Fisheries science*, 61(6), 956-959.
  410. Nakamura, H. (2004). Thioredoxin as a key molecule in redox signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6(1), 15-17.
  411. Nakamura, H. (2005). Thioredoxin and its related molecules: update 2005. *Antioxidants & redox signaling*, 7(5-6), 823-828.
  412. Nakbi, A., Tayeb, W., Grissa, A., Issaoui, M., Dabbou, S., Chargui, I., ... & Hammami, M. (2010). Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutrition & metabolism*, 7, 1-11.
  413. Nandipati, S., & Litvan, I. (2016). Environmental exposures and Parkinson's disease. *International journal of environmental research and public health*, 13(9), 881.
  414. Neumann, C. A., Krause, D. S., Carman, C. V., Das, S., Dubey, D. P., Abraham, J. L., ... & Van Etten, R. A. (2003). Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature*, 424(6948), 561-565.
  415. Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health*, 4, 148.
  416. Nikolić-Kokić, A., Blagojević, D., & Spasić, M. B. (2010). Complexity of free radical metabolism in human erythrocytes. *Journal of Medical Biochemistry*, 29(3), 189-195.
  417. Nikolić-Kokić, A., Stević, Z., Blagojević, D., Davidović, B., Jones, D. R., & Spasić, M. B. (2006). Alterations in anti-oxidative defence enzymes in erythrocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis (SALS) and

familial ALS patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 44(5), 589-593.

418. Njus, D., Kelley, P. M., Tu, Y. J., & Schlegel, H. B. (2020). Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 159, 37-43.
419. Noctor, G. (2006). Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell & Environment*, 29(3), 409-425.
420. Noctor, G., & Foyer, C. H. (2016). Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiology*, 171(3), 1581-1592.
421. Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B. E. L. E. N., ... & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell & environment*, 35(2), 454-484.
422. Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., & Foyer, C. H. (2011). Glutathione. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9.
423. Nohl, H., & Gille, L. (2005). Lysosomal ROS formation. *Redox Report*, 10(4), 199-205.
424. Nolan, K. R. (1983). Copper toxicity syndrome. *Journal of Orthomolecular Psychiatry*, 12(4), 270-282.
425. Nonn, L., Williams, R. R., Erickson, R. P., & Powis, G. (2003). The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Molecular and cellular biology*, 23(3), 916-922.
426. Nordberg, G. F., Fowler, B. A., & Nordberg, M. (Eds.). (2014). *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic press.
427. Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
428. Norman, C. (1974). EPA halts dieldrin production. *Nature*.
429. Nriagu, J. O. (1989). A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338(6210), 47-49.
430. Nriagu, J.O. *Zinc in the Environment. Part II: Health Effects*; John Wiley Sons: New York, NY, USA, 1980; p. 10016.
431. Nunes, B., Carvalho, F., & Guilhermino, L. (2006). Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 62(4), 581-594.
432. Oakley, F. D., Abbott, D., Li, Q., & Engelhardt, J. F. (2009). Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes. *Antioxidants & redox signaling*, 11(6), 1313-1333.

433. Ognjanović, B. I., Marković, S. D., Đorđević, N. Z., Trbojević, I. S., Štajn, A. Š., & Saičić, Z. S. (2010). Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reproductive Toxicology*, 29(2), 191-197.
434. O'Halloran, T. V., & Culotta, V. C. (2000). Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25057-25060.
435. Ohta, H., & Cherian, M. G. (1991). Gastrointestinal absorption of cadmium and metallothionein. *Toxicology and applied pharmacology*, 107(1), 63-72.
436. Ong, C. N., Phoon, W. O., Law, H. Y., Tye, C. Y., & Lim, H. H. (1985). Concentrations of lead in maternal blood, cord blood, and breast milk. *Archives of disease in childhood*, 60(8), 756-759.
437. Onyango, A. N. (2016). Endogenous generation of singlet oxygen and ozone in human and animal tissues: mechanisms, biological significance, and influence of dietary components. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
438. Ookhtens, M. U. R. A. D., Mittur, A. V., & Erhart, N. A. (1994). Changes in plasma glutathione concentrations, turnover, and disposal in developing rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 266(3), R979-R988.
439. Orr, A. L., Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., & Brand, M. D. (2012). A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42921-42935.
440. Ortega, P., Vitorino, H. A., Moreira, R. G., Pinheiro, M. A., Almeida, A. A., Custódio, M. R., & Zanotto, F. P. (2017). Physiological differences in the crab *Ucides cordatus* from two populations inhabiting mangroves with different levels of cadmium contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(2), 361-371.
441. Osman, A. G., Mekki, I. A., Verreth, J., & Kirschbaum, F. (2007). Effects of lead nitrate on the activity of metabolic enzymes during early developmental stages of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Fish Physiology and Biochemistry*, 33, 1-13.
442. Osweiler, G. D., Carson, T. L., Buck, W. B., & Van Gelder, G. A. (1985). *Clinical and diagnostic veterinary toxicology*. Kendall/Hunt Publishing Company.
443. Oteiza, P. I. (2012). Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(9), 1748-1759.
444. Owen Jr, C. A. (1982). *Biochemical aspects of copper: copper proteins, ceruloplasmin, and copper protein binding*. Noyes Publications.

445. Pacheco, G. K. Ñ., Maldonado, N. S. S., Alta, R. Y. P., & Vitorino, H. A. (2021). Short exposure of *Artemia salina* to group-12 metals: Comparing hatchability, mortality, lipid peroxidation, and swimming speed. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112052.
446. Paglia, D. E., Valentine, W. N., & Dahlgren, J. (1975). Effects of low-level lead exposure on pyrimidine 5'-nucleotidase and other erythrocyte enzymes. Possible role of pyrimidine 5'-nucleotidase in the pathogenesis of lead-induced anemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 56(5), 1164-1169.
447. Paksy, K., Rajczy, K., Forgács, Z., Lázár, P., Bernard, A., Gáti, I., & Kaáli, G. S. (1997, September). Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. In *Journal of Applied Toxicology: An International Forum Devoted to Research and Methods Emphasizing Direct Clinical, Industrial and Environmental Applications* (Vol. 17, No. 5, pp. 321-327). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd..
448. Pang, Y., Jones, M. R., Tellez-Plaza, M., Guallar, E., Vaidya, D., Post, W. S., ... & Navas-Acien, A. (2016). Association of geography and ambient air pollution with urine metal concentrations in six US cities: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *International journal of environmental research and public health*, 13(3), 324.
449. Pannacci, E., & Onofri, A. (2016). Alternatives to terbutylazine for chemical weed control in maize. *Communications in Biometry and Crop Science*, 11(1), 51-63.
450. Parlak, V. (2018). Evaluation of apoptosis, oxidative stress responses, AChE activity and body malformations in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to deltamethrin. *Chemosphere*, 207, 397-403.
451. Paschal, D. C., Burt, V., Caudill, S. P., Gunter, E. W., Pirkle, J. L., Sampson, E. J., ... & Jackson, R. J. (2000). Exposure of the US population aged 6 years and older to cadmium: 1988–1994. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 38(3), 377-383.
452. Patlolla, A. K., Barnes, C., Hackett, D., & Tchounwou, P. B. (2009a). Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *International journal of environmental research and public health*, 6(2), 643-653.
453. Patlolla, A. K., Barnes, C., Yedjou, C., Velma, V. R., & Tchounwou, P. B. (2009b). Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 24(1), 66-73.
454. Patočka, J., & Černý, K. (2003). Inorganic lead toxicology. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 46(2), 65-72.

455. Pelgrom, S. M. G. J., Lamers, L. P. M., Lock, R. A. C., Balm, P. H. M., & Bonga, S. W. (1995). Interactions between copper and cadmium modify metal organ distribution in mature tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Environmental Pollution*, *90*(3), 415-423.
456. Permpongpaiboon, T., Nagila, A., Pidetcha, P., Tuangmungsakulchai, K., Tantrarongroj, S., & Porntadavity, S. (2011). Decreased paraoxonase 1 activity and increased oxidative stress in low lead- exposed workers. *Human & experimental toxicology*, *30*(9), 1196-1203.
457. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, *30*, 11-26.
458. Phippen, B., Horvath, C., Nordin, R., & Nagpal, N. (2008). MINISTRY OF ENVIRONMENT PROVINCE OF BRITISH COLUMBIA
459. Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., ... & Remacle, J. (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of ageing and development*, *51*(3), 283-297.
460. Pirkle, J. L., Brody, D. J., Gunter, E. W., Kramer, R. A., Paschal, D. C., Flegal, K. M., & Matte, T. D. (1994). The decline in blood lead levels in the United States: the National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES). *Jama*, *272*(4), 284-291.
461. Pirkle, J. L., Kaufmann, R. B., Brody, D. J., Hickman, T., Gunter, E. W., & Paschal, D. C. (1998). Exposure of the US population to lead, 1991-1994. *Environmental health perspectives*, *106*(11), 745-750.
462. Pirsahab, M., Azadi, N. A., Miglietta, M. L., Sayadi, M. H., Blahova, J., Fathi, M., & Mansouri, B. (2019). Toxicological effects of transition metal-doped titanium dioxide nanoparticles on goldfish (*Carassius auratus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, *215*, 904-915.
463. Plum, L. M., Rink, L., & Haase, H. (2010). The essential toxin: impact of zinc on human health. *International journal of environmental research and public health*, *7*(4), 1342-1365.
464. Podsiedlik, M., Markowicz-Piasecka, M., & Sikora, J. (2020). Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery. *Chemico-Biological Interactions*, *332*, 109305.
465. Ponka, P., Schulman, H. M., Woodworth, R. C., & Richter, G. W. (1990). *Iron transport and storage*. CRC Press.
466. Prasad, M. N. V. (2004). Phytoremediation of metals and radionuclides in the environment: the case for natural hyperaccumulators, metal transporters, soil-amending chelators and transgenic plants. *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*, 345-391.

467. Prast-Nielsen, S., Huang, H. H., & Williams, D. L. (2011). Thioredoxin glutathione reductase: its role in redox biology and potential as a target for drugs against neglected diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1810*(12), 1262-1271.
468. Pulford, I. D., & Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environment international*, *29*(4), 529-540.
469. Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L., & Brand, M. D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox biology*, *1*(1), 304-312.
470. Rachek, L. I., Musiyenko, S. I., LeDoux, S. P., & Wilson, G. L. (2007). Palmitate induced mitochondrial deoxyribonucleic acid damage and apoptosis in l6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology*, *148*(1), 293-299.
471. Rada, B., & Leto, T. L. (2008). Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Trends in Innate Immunity*, *15*, 164-187.
472. Radha, J., Srivastava, S., & Madan, V. K. (2000). Influence of chromium on growth and cell division of sugarcane. *Indian Journal of Plant Physiology*, *5*(3), 228-231.
473. Rafiee, P., Matthews, C. O., Bagshaw, J. C., & MacRae, T. H. (1986). Reversible arrest of *Artemia* development by cadmium. *Canadian Journal of Zoology*, *64*(8), 1633-1641.
474. Rahman I. & Biswas S. K. (2006). OXIDANTS AND ANTIOXIDANTS / Antioxidants, Enzymatic, in Encyclopedia of Respiratory Medicine, 258-266 p
475. Rahoui, S., Chaoui, A., Ben, C., Rickauer, M., Gentzbittel, L., & El Ferjani, E. (2015). Effect of cadmium pollution on mobilization of embryo reserves in seedlings of six contrasted *Medicago truncatula* lines. *Phytochemistry*, *111*, 98-106.
476. Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., & Kim, K. H. (2019). Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment international*, *125*, 365-385.
477. Rajmohan, K. S., Chandrasekaran, R., & Varjani, S. (2020). A review on occurrence of pesticides in environment and current technologies for their remediation and management. *Indian journal of microbiology*, *60*(2), 125-138.
478. Ramírez-Bajo, M. J., de Atauri, P., Ortega, F., Westerhoff, H. V., Gelpí, J. L., Centelles, J. J., & Cascante, M. (2014). Effects of cadmium and mercury on the upper part of skeletal muscle glycolysis in mice. *PLoS one*, *9*(1), e80018.

479. Randall, C. (2014). Pest management. *National pesticide applicator certification core manual, 2nd edn. National Association of State Departments of Agriculture Research Foundation, Washington.* (<https://www.nasda.org/foundation/pesticide-applicator-certification-and-training>)
480. Rani, A., Kumar, A., Lal, A., & Pant, M. (2014). Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International journal of environmental health research, 24*(4), 378-399.
481. Rao, K. V. R., & Norenberg, M. D. (2004). Manganese induces the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *Journal of Biological Chemistry, 279*(31), 32333-32338.
482. Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant science, 180*(2), 169-181.
483. Raskin, I., Kumar, P. N., Dushenkov, S., & Salt, D. E. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in biotechnology, 5*(3), 285-290.
484. Recknagel, R. O., Glende Jr, E. A., Dolak, J. A., & Waller, R. L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & therapeutics, 43*(1), 139-154.
485. Reddy, R. S., Jinna, R. R., Uzodinma, J. E., & Desaiyah, D. (1988). In vitro effect of mercury and cadmium on brain Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the catfish *Ictalurus punctatus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology, 41*, 324-328.
486. Regoli, L. (2005). The relative contributions of different environmental sources to human exposure and the EU cadmium risk assessment meeting of UNECE task force on heavy metals. *Presentation for the UNECE Long-Range-Trans-boundary Air Pollutants–Task Force on Heavy Metals*, 16-18.
487. Reimer, P. S. (1999). Environmental effects of manganese and proposed freshwater guidelines to protect aquatic life in British Columbia. *Department of Chemical & Bio-Resource Engineering, University of British Columbia.*
488. Rentel, M. C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S. L., Petersen, L., Okamoto, H., ... & Knight, M. R. (2004). OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. *Nature, 427*(6977), 858-861.
489. Revin, V. V., Gromova, N. V., Revina, E. S., Samonova, A. Y., Tychkov, A. Y., Bochkareva, S. S., ... & Kuzmenko, T. P. (2019). The influence of oxidative stress and natural antioxidants on morphometric parameters of red blood cells, the hemoglobin oxygen binding capacity, and the activity of antioxidant enzymes. *BioMed research international, 2019.*

490. Rhodes, D. G., Adler, M. E., Clemens, J. C., & Moshfegh, A. J. (2017). What we eat in America food categories and changes between survey cycles. *Journal of Food Composition and Analysis*, *64*, 107-111.
491. Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, *2*(4), 152-159.
492. Richter, P., Faroon, O., & Pappas, R. S. (2017). Cadmium and cadmium/zinc ratios and tobacco-related morbidities. *International journal of environmental research and public health*, *14*(10), 1154.
493. Rifkind, J. M., Mohanty, J. G., & Nagababu, E. (2015). The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Frontiers in physiology*, *5*, 500.
494. Riyazuddin, R., Nisha, N., Ejaz, B., Khan, M. I. R., Kumar, M., Ramteke, P. W., & Gupta, R. (2021). A comprehensive review on the heavy metal toxicity and sequestration in plants. *Biomolecules*, *12*(1), 43.
495. Rizwan, M., Meunier, J. D., Davidian, J. C., Pokrovsky, O. S., Bovet, N., & Keller, C. (2016). Silicon alleviates Cd stress of wheat seedlings (*Triticum turgidum* L. cv. Claudio) grown in hydroponics. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*, 1414-1427.
496. Roberts, T. (Editor). 2000. Metabolism of Agrochemicals in Plants. Wiley, New York. 300 pp.
497. Rodrigues, S. M., Henriques, B., Reis, A. T., Duarte, A. C., Pereira, E., & Römken, P. F. A. M. (2012). Hg transfer from contaminated soils to plants and animals. *Environmental chemistry letters*, *10*(1), 61-67.
498. Rokka, A., Antonenkov, V. D., Soininen, R., Immonen, H. L., Pirilä, P. L., Bergmann, U., ... & Hiltunen, J. K. (2009). Pxmp2 is a channel-forming protein in mammalian peroxisomal membrane. *PloS one*, *4*(4), e5090.
499. Rosenberg, C. E., Salibián, A., & Fink, N. E. (2002). An enzyme-linked immunosorbent assay for measuring anti-sheep red blood cells antibodies in lead-exposed toads. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, *47*(2), 121-128.
500. Ross, A. C., Caballero, B., Cousins, R. J., & Tucker, K. L. (2020). *Modern nutrition in health and disease*. Jones & Bartlett Learning.
501. Rossman, T. G., Roy, N. K., & Lin, W. C. (1992). Is cadmium genotoxic?. *IARC Scientific Publications*, (118), 367-375.
502. Rotter, I., Kosik-Bogacka, D., Dołęgowska, B., Safranow, K., Lubkowska, A., & Laszczyńska, M. (2015). Relationship between the concentrations of heavy metals and bioelements in aging men with metabolic syndrome. *International journal of environmental research and public health*, *12*(4), 3944-3961.
503. Roy, N. K., & Rossman, T. G. (1992). Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, *298*(2), 97-103.



504. Russell, R., Beard, J. L., Cousins, R. J., Dunn, J. T., Ferland, G., Hambidge, K., ... & Yates, A. A. (2001). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *A report of the panel on micronutrients, subcommittees on upper reference levels of nutrients and of interpretation and uses of dietary reference intakes, and the standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes food and nutrition board Institute of medicine*, 797.
505. S.G. Gilbert *Chapter Principles of Toxicology in Small Dose of Toxicology 3rd edition* FREE E-book (2020) <https://static1.squarespace.com/static/5a6e162f64b05f4a0d859674/t/6008cb17c4c7b6682a99d91c/1611189048499/A+Small+DoseofToxCH1-29ED3.1+01.20.21.pdf>
506. Sabarwal, A., Kumar, K., & Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environmental toxicology and pharmacology*, 63, 103-114.
507. Sabolić, I., Breljak, D., Škarica, M., & Herak-Kramberger, C. M. (2010). Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals*, 23, 897-926.
508. Sadek, C. M., Jiménez, A., Damdimopoulos, A. E., Kieselbach, T., Nord, M., Gustafsson, J. Å., ... & Miranda-Vizuete, A. (2003). Characterization of Human Thioredoxin-like 2: A NOVEL MICROTUBULE-BINDING THIOREDOXIN EXPRESSED PREDOMINANTLY IN THE CILIA OF LUNG AIRWAY EPITHELIUM AND SPERMATID MANCHETTE AND AXONEME\* 210. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 13133-13142.
509. Sadowska-Woda, I., Wójcik, N., Karowicz-Bilińska, A., & Bieszczad-Bedrejczuk, E. (2010). Effect of selected antioxidants in  $\beta$ -cyfluthrin-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, 24(3), 879-884.
510. Sahnoun, D., Ksouri, W. M., Younes, I., Hammami, M., Bettaieb, I., Saada, M., ... & Serairi, R. B. (2017). Antioxidant activity and biochemical composition of fresh bulbs and leaves of wild garlic *Allium ursinum*. *Journal of new sciences*, 44, 2392-2399.
511. Salama, A. K., Osman, K. A., & Omran, O. A. (2013). Pesticides-induced oxidative damage: Possible in vitro protection by antioxidants. *J Toxicol Environ Health Sci*, 5, 79-85.
512. Salt, D. E., Prince, R. C., Baker, A. J., Raskin, I., & Pickering, I. J. (1999). Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 33(5), 713-717.
513. Samadi, A., Martínez, L. A., Miranda, M. A., & Morera, I. M. (2001). Mechanism of Lipid Peroxidation Photosensitized by Tiaprofenic Acid:

- Product Studies Using Linoleic Acid and 1, 4-Cyclohexadienes as Model Substrates. *Photochemistry and photobiology*, 73(4), 359-365.
514. Sandermann Jr, H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in biochemical sciences*, 17(2), 82-84.
515. Sandrini, J. Z., Regoli, F., Fattorini, D., Notti, A., Inácio, A. F., Linde-Arias, A. R., ... & Monserrat, J. M. (2006). Short-term responses to cadmium exposure in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): Subcellular distribution and oxidative stress generation. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(5), 1337-1344.
516. Santi, A., Menezes, C., Duarte, M., Leitemperger, J., Lópes, T., & Loro, V. (2011). Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (). *Interdisciplinary toxicology*, 4(3), 149-153.
517. Sarabia, R., Del Ramo, J., Varo, I., Diaz-Mayans, J., & Torreblanca, A. (2002). Comparing the acute response to cadmium toxicity of nauplii from different populations of *Artemia*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(2), 437-444.
518. Sarasamma, S., Audira, G., Juniardi, S., Sampurna, B. P., Liang, S. T., Hao, E., ... & Hsiao, C. D. (2018). Zinc chloride exposure inhibits brain acetylcholine levels, produces neurotoxic signatures, and diminishes memory and motor activities in adult zebrafish. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3195.
519. Satarug, S., Baker, J. R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P. E., Williams, D. J., & Moore, M. R. (2003). A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology letters*, 137(1-2), 65-83.
520. Satoh, M., Koyama, H., Kaji, T., Kito, H., & Tohyama, C. (2002). Perspectives on cadmium toxicity research. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 196(1), 23-32.
521. Sauer, G. R., & Watabe, N. (1988). The effects of heavy metals and metabolic inhibitors on calcium uptake by gills and scales of *Fundulus heteroclitus* in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 91(2), 473-478.
522. Saugstad, O. D. (2001). Update on oxygen radical disease in neonatology. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 13(2), 147-153.
523. Saxena, R., Garg, P., & Jain, D. K. (2011). In vitro anti-oxidant effect of vitamin E on oxidative stress induced due to pesticides in rat erythrocytes. *Toxicology international*, 18(1), 73.
524. Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian journal of medical and biological research*, 38, 995-1014.

525. Scarpa, M., Stevanato, R., Viglino, P., & Rigo, A. (1983). Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen. Effect of superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 258(11), 6695-6697.
526. Schanne, F. A., Long, G. J., & Rosen, J. F. (1997). Lead induced rise in intracellular free calcium is mediated through activation of protein kinase C in osteoblastic bone cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1360(3), 247-254.
527. Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., & Bleeker, P. M. (2002). The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of experimental botany*, 53(379), 2381-2392.
528. Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12), 1755-1766.
529. Schürmann, P., & Jacquot, J. P. (2000). Plant thioredoxin systems revisited. *Annual review of plant biology*, 51(1), 371-400. doi:10.1146/annurev.arplant.51.1.371
530. Schutte, R., Nawrot, T. S., Richart, T., Thijs, L., Vanderschueren, D., Kuznetsova, T., ... & Staessen, J. A. (2008). Bone resorption and environmental exposure to cadmium in women: a population study. *Environmental health perspectives*, 116(6), 777-783.
531. Schutzendubel, A., & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1351-1365.
532. Schwartz, J., & Pitcher, H. (1989). The Relationship Between Gasoline Lead and. *Journal of Qflcial Slqixties Vol*, 5(4), 421-431.
533. Seneviratne, M., Rajakaruna, N., Rizwan, M., Madawala, H. M. S. P., Ok, Y. S., & Vithanage, M. (2019). Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. *Environmental geochemistry and health*, 41, 1813-1831.
534. Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., & Pinelli, E. (2014). Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 232*, 1-44.
535. Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A., & Morel, J. L. (1998). Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Science of the total environment*, 209(2-3), 133-142.
536. Shannon, R. D. (1976). Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta crystallographica section A: crystal physics, diffraction, theoretical and general crystallography*, 32(5), 751-767.

537. Sharma, B., Singh, S., & Siddiqi, N. J. (2014). Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. *BioMed research international*, 2014.
538. Sharma, I., & Ahmad, P. (2014). Catalase: a versatile antioxidant in plants. In *Oxidative damage to plants* (pp. 131-148). Academic Press.
539. Sharma, P., & Dubey, R. S. (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant cell reports*, 26, 2027-2038.
540. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.
541. Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in plant science*, 14(1), 43-50.
542. Shikama, K. (1998). The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: a venerable puzzle. *Chemical Reviews*, 98(4), 1357-1374.
543. Shukla, A., Shukla, G. S., & Srimal, R. C. (1996). Cadmium-induced alterations in blood-brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. *Human & experimental toxicology*, 15(5), 400-405.
544. Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 916-921.
545. Silbergeld, E. K., Waalkes, M., & Rice, J. M. (2000). Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *American journal of industrial medicine*, 38(3), 316-323.
546. Simons, T. J. (1993). Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity. *Neurotoxicology*, 14(2-3), 77-85.
547. Singh, M., Sandhir, R., & Kiran, R. (2006). Erythrocyte antioxidant enzymes in toxicological evaluation of commonly used organophosphate pesticides.
548. Singh, M., Sandhir, R., & Kiran, R. (2008). Atrazine-induced alterations in rat erythrocyte membranes: Ameliorating effect of vitamin E. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 22(5), 363-369.
549. Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., & Jain, R. K. (2003). Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied microbiology and biotechnology*, 61, 405-412.
550. Singhal, R. L., Merali, Z., & Hrdina, P. D. (1976, January). Aspects of the biochemical toxicology of cadmium. In *Federation proceedings* (Vol. 35, No. 1, pp. 75-80).
551. Sloman, K. A. (2003). Copper, cortisol and the common carp. *Journal of Experimental Biology*, 206(19), 3309-3309.

552. Smirnoff, N., & Wheeler, G. L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical reviews in plant sciences*, 19(4), 267-290.
553. Smith, J. B., Dwyer, S. D., & Smith, L. (1989). Lowering extracellular pH evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. *Journal of Biological Chemistry*, 264(15), 8723-8728.
554. Song, Z., Cawthon, D., Beers, K., & Bottje, W. G. (2000). Hepatic and extra-hepatic stimulation of glutathione release into plasma by norepinephrine in vivo. *Poultry Science*, 79(11), 1632-1639.
555. Sosnowska, B., Huras, B., Nowacka-Krukowska, H., & Bukowska, B. (2013). Oxidative damage to human red blood cells treated with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide (in vitro). *Biologia*, 68(4), 773-778.
556. Spector, D., Labarre, J., & Toledano, M. B. (2001). A genetic investigation of the essential role of glutathione: mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast. *Journal of biological chemistry*, 276(10), 7011-7016.
557. Sriram, K., Lin, G. X., Jefferson, A. M., Roberts, J. R., Wirth, O., Hayashi, Y., ... & Antonini, J. M. (2010). Mitochondrial dysfunction and loss of Parkinson's disease-linked proteins contribute to neurotoxicity of manganese-containing welding fumes. *The FASEB Journal*, 24(12), 4989-5002.
558. Srivastava, R. K., Pandey, P., Rajpoot, R., Rani, A., & Dubey, R. S. (2014). Cadmium and lead interactive effects on oxidative stress and antioxidative responses in rice seedlings. *Protoplasma*, 251, 1047-1065.
559. Stadtman, E. R. (1986). Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, ageing and neutrophil function. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(1), 11-12.
560. Stankovic, S., Kalaba, P., & Stankovic, A. R. (2014). Biota as toxic metal indicators. *Environmental chemistry letters*, 12, 63-84.
561. Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S., & Beal, M. F. (2004). Mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience*, 24(36), 7779-7788.
562. Stegemann, R., & Buchner, D. A. (2015). Transgenerational inheritance of metabolic disease. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 43, pp. 131-140). Academic Press.
563. Stern, B. R. (2010). Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 73(2-3), 114-127.
564. Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology and medicine*, 18(2), 321-336.

565. Stohs, S. J., Bagchi, D., Hassoun, E., & Bagchi, M. (2001). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology*, 20(2).
566. Stolz, D. B., Zamora, R., Vodovotz, Y., Loughran, P. A., Billiar, T. R., Kim, Y. M., ... & Watkins, S. C. (2002). Peroxisomal localization of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Hepatology*, 36(1), 81-93.
567. Sträter, E., Westbeld, A., & Klemm, O. (2010). Pollution in coastal fog at Alto Patache, northern Chile. *Environmental Science and Pollution Research*, 17, 1563-1573.
568. Succop P, Bornschein R, Brown K, et al. 1998. An empirical comparison of lead exposure pathway models. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 6:1577-1583.
569. Sun, Q. A., Kirnarsky, L., Sherman, S., & Gladyshev, V. N. (2001). Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 3673-3678.
570. Sun, Q., Ye, Z. H., Wang, X. R., & Wong, M. H. (2007). Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatins in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Journal of plant physiology*, 164(11), 1489-1498.
571. Sun, R. L., Zhou, Q. X., & Jin, C. X. (2006). Cadmium accumulation in relation to organic acids in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Plant and soil*, 285, 125-134.
572. Suszkiw, J., Toth, G., Murawsky, M., & Cooper, G. P. (1984). Effects of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> on acetylcholine release and Ca<sup>2+</sup> movements in synaptosomes and subcellular fractions from rat brain and Torpedo electric organ. *Brain research*, 323(1), 31-46.
573. Sutton, D. J., & Tchounwou, P. B. (2007). Mercury induces the externalization of phosphatidyl-serine in human renal proximal tubule (HK-2) cells. *International journal of environmental research and public health*, 4(2), 138-144.
574. Sutton, D. J., Tchounwou, P. B., Ninashvili, N., & Shen, E. (2002). Mercury Induces Cytotoxicity Transcriptionally Activates Stress Genes in Human Liver Carcinoma (HepG2) Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 3(9), 965-984.
575. Szent-Györgyi, A. (1928). Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex: Description of a new carbohydrate derivative. *Biochemical Journal*, 22(6), 1387.
576. Takahama, U. (1992). Hydrogen peroxide scavenging systems in vacuoles of mesophyll cells of *Vicia faba*. *Phytochemistry*, 31(4), 1127-1133.
577. Takahama, U. (1993). Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid: different effects of ascorbic acid on the

- oxidation of coniferyl alcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from epicotyls of *Vigna angularis*. *Plant and cell physiology*, 34(6), 809-817.
578. Takahama, U. (2004). Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews*, 3, 207-219.
579. Tamás, M. J., Sharma, S. K., Ibstedt, S., Jacobson, T., & Christen, P. (2014). Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules*, 4(1), 252-267.
580. Tanaka, T., Hosoi, F., Yamaguchi-Iwai, Y., Nakamura, H., Masutani, H., Ueda, S., ... & Yodoi, J. (2002). Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *The EMBO journal*, 21(7), 1695-1703.
581. Tchounwou, P. B., Newsome, C., Williams, J., & Glass, K. (2008). Copper-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells. In *Metal ions in biology and medicine: proceedings of the... International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine held...= Les ions métalliques en biologie et en médecine: Symposium international sur les ions métalliques*. (Vol. 10, p. 285). NIH Public Access.
582. Tchounwou, P. B., Ayensu, W. K., Ninashvili, N., & Sutton, D. (2003a). Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 18(3), 149-175.
583. Tchounwou, P. B., Centeno, J. A., & Patlolla, A. K. (2004a). Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis—a health risk assessment and management approach. *Molecular and cellular biochemistry*, 255(1), 47-55.
584. Tchounwou, P. B., Ishaque, A. B., & Schneider, J. (2001). Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to cadmium chloride. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222(1), 21-28.
585. Tchounwou, P. B., Patlolla, A. K., & Centeno, J. A. (2003b). Invited reviews: carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure—a critical review. *Toxicologic pathology*, 31(6), 575-588.
586. Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Foxx, D. N., Ishaque, A. B., & Shen, E. (2004b). Lead-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 255(1), 161-170.
587. Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, clinical and environmental toxicology*, 133-164.

588. Thall, A., & Acey, R. (1985, January). CADMIUM BINDING-PROTEINS IN DEVELOPING ARTEMIA. In *FEDERATION PROCEEDINGS* (Vol. 44, No. 5, pp. 1461-1461). 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL.
589. Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028.
590. Thevenod, F., & Jones, S. W. (1992). Cadmium block of calcium current in frog sympathetic neurons. *Biophysical journal*, 63(1), 162-168.
591. Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., & Satayavivad, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and chemical toxicology*, 59, 129-136.
592. Tiwari, S., & Lata, C. (2018). Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: an overview. *Frontiers in plant science*, 9, 452.
593. Tolrà, R. P., Poschenrieder, C., & Barceló, J. (1996). Zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. II. Influence on organic acids. *Journal of Plant Nutrition*, 19(12), 1541-1550.
594. Tomovic, M. T., Krivokapic, M. Z., Jakovljevic, V. L., Sovrlic, M. M., Bradic, J. V., Petkovic, A. M., ... & Kocovic, A. G. (2020). Biological activities of different extracts from *Allium ursinum* leaves. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 77(1), 121-129.
595. Toohey, J. I., & Cooper, A. J. (2014). Thiosulfoxide (sulfane) sulfur: new chemistry and new regulatory roles in biology. *Molecules*, 19(8), 12789-12813.
596. Topolovec, D. (2008). Herbicidi i mehanizam djelovanja III. *Glasnik Zaštite Bilja*, 31(5), 98-101.
597. Trevisan, R., Flesch, S., Mattos, J. J., Milani, M. R., Bainy, A. C. D., & Dafre, A. L. (2014). Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 159, 22-30.
598. Trinchella, F., Riggio, M., Filosa, S., Volpe, M. G., Parisi, E., & Scudiero, R. (2006). Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144(3), 272-278.
599. Tsuchihashi, M., 1923. Zur Kenntnis der Blutkatalase *Biochem. Z* 140.
600. Tsuzuki, K., Sugiyama, M., & Haramaki, N. (1994). DNA single-strand breaks and cytotoxicity induced by chromate (VI), cadmium (II), and



- mercury (II) in hydrogen peroxide-resistant cell lines. *Environmental health perspectives*, 102(suppl 3), 341-342.
601. Turkez, H., Togar, B., & Polat, E. (2012). Olive leaf extract modulates permethrin induced genetic and oxidative damage in rats. *Cytotechnology*, 64, 459-464.
602. Ueno, M., Masutani, H., Arai, R. J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., ... & Nikaido, T. (1999). Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 35809-35815.
603. Uraguchi, S., Watanabe, I., Yoshitomi, A., Kiyono, M., & Kuno, K. (2006). Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in novel Cd-accumulating crops, *Avena strigosa* and *Crotalaria juncea*. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 2955-2965.
604. US Department of Health and Human Services. (1999). Agency for Toxic Substances and Disease Registry-ATSDR.
605. USEPA, 2002. United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Lead Compounds. Technology Transfer Network- Air Toxics Website. 2002. Online at: <http://www.epa.gov/cgi-bin/epaprintonly.cgi>
606. Valko, M. M. H. C. M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161-1208.
607. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
608. Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
609. Van Assche, F., & Clijsters, H. (1986). Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of plant physiology*, 125(3-4), 355-360.
610. Van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M., & Hall, J. C. (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed science*, 51(4), 472-495.
611. Vandenhove, H., Cuypers, A., Van Hees, M., Koppen, G., & Wannijn, J. (2006). Oxidative stress reactions induced in beans (*Phaseolus vulgaris*) following exposure to uranium. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11-12), 795-805.
612. Vašák, M., & Hasler, D. W. (2000). Metallothioneins: new functional and structural insights. *Current opinion in chemical biology*, 4(2), 177-183.

613. Veljović Jovanović, S., Kukavica, B., Vidović, M., Morina, F., & Menckhoff, L. (2018). Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes. In *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants* (pp. 269-300). Springer, Cham.
614. Verbost, P. M., Van Rooij, J., Flik, G., Lock, R. A. C., & Bonga, S. W. (1989). The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *Journal of experimental biology*, *145*(1), 185-197.
615. Verbruggen, N., Hermans, C., & Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New phytologist*, *181*(4), 759-776.
616. Vidović, M., Morina, F., & Jovanović, S. V. (2017). Stimulation of various phenolics in plants under ambient UV-B radiation. *UV-B Radiation: From Environmental Stressor to Regulator of Plant Growth*, 9-56.
617. Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, *55*(1), 1-12.
618. Vijverberg, H. P., Oortgiesen, M., Leinders, T., & Van Kleef, R. G. (1994). Metal interactions with voltage- and receptor-activated ion channels. *Environmental health perspectives*, *102*(suppl 3), 153-158.
619. Violante, A. U. D. N., Cozzolino, V. U. D. N., Perelomov, L. P. S. U., Caporale, A. G., & Pigna, M. U. D. N. (2010). Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *Journal of soil science and plant nutrition*, *10*(3), 268-292.
620. Visioli, G., D'Egidio, S., Vamerali, T., Mattarozzi, M., & Sanangelantoni, A. M. (2014). Culturable endophytic bacteria enhance Ni translocation in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Chemosphere*, *117*, 538-544.
621. Vuori, K. M. (1995). Direct and indirect effects of iron on river ecosystems. In *Annales Zoologici Fennici* (pp. 317-329). Finnish Zoological and Botanical Publishing
622. Waalkes, M. P. (2000). Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of inorganic biochemistry*, *79*(1-4), 241-244.
623. Waalkes, M. P., Diwan, B. A., Ward, J. M., Devor, D. E., & Goyer, R. A. (1995). Renal tubular tumors and atypical hyperplasias in B6C3F1 mice exposed to lead acetate during gestation and lactation occur with minimal chronic nephropathy. *Cancer research*, *55*(22), 5265-5271.
624. Waalkes, M. P., Liu, J., & Diwan, B. A. (2007). Transplacental arsenic carcinogenesis in mice. *Toxicology and applied pharmacology*, *222*(3), 271-280.
625. Wakimoto, P., & Block, G. (2001). Dietary intake, dietary patterns, and changes with age: an epidemiological perspective. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *56*(suppl\_2), 65-80.

626. Wang, A., Cockburn, M., Ly, T. T., Bronstein, J. M., & Ritz, B. (2014). The association between ambient exposure to organophosphates and Parkinson's disease risk. *Occupational and environmental medicine*, 71(4), 275-281.
627. Wang, J., Zhong, X., Li, F., & Shi, Z. (2018). Effects of nicosulfuron on growth, oxidative damage, and the ascorbate-glutathione pathway in paired nearly isogenic lines of waxy maize (*Zea mays* L.). *Pesticide biochemistry and physiology*, 145, 108-117.
628. Wang, J., Zhu, X., Huang, X., Gu, L., Chen, Y., & Yang, Z. (2016). Combined effects of cadmium and salinity on juvenile *Takifugu obscurus*: cadmium moderates salinity tolerance; salinity decreases the toxicity of cadmium. *Scientific Reports*, 6(1), 1-9.
629. Wang, L., Li, J., Li, J., & Liu, Z. (2010). Effects of lead and/or cadmium on the oxidative damage of rat kidney cortex mitochondria. *Biological trace element research*, 137(1), 69-78.
630. Wang, M. H., & Wang, G. Z. (2009). Biochemical response of the copepod *Tigriopus japonicus* Mori experimentally exposed to cadmium. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 57, 707-717.
631. Wang, S., & Shi, X. (2001). Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Molecular and cellular biochemistry*, 222(1), 3-9.
632. Wang, X. F., Guan, C. H., Fan, Z. W., & Zhen, H. J. (2011). Application and development of sulfonylurea herbicides. *Agrochemicals*, 50(1), 9-15.
633. Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., & Rao, K. M. K. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(11), 1434-1443.
634. Waszczak, C., Carmody, M., & Kangasjärvi, J. (2018). Reactive oxygen species in plant signaling. *Annual review of plant biology*, 69, 209-236.
635. Wätjen, W., & Beyersmann, D. (2004). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals*, 17(1), 65-78.
636. Wei, J. L., Lai, H. Y., & Chen, Z. S. (2012). Chelator effects on bioconcentration and translocation of cadmium by hyperaccumulators, *Tagetes patula* and *Impatiens walleriana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 173-178.
637. Welbourn, E. M., Wilson, M. T., Yusof, A., Metodiev, M. V., & Cooper, C. E. (2017). The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radical Biology and Medicine*, 103, 95-106.
638. WHO, World Health Organization. (1996). *Trace elements in human nutrition and health*. World Health Organization.
639. WHO, World Health Organization. (2012). Report: priorities in the assessment of vitamin A and iron status and in populations, Panama City, Panama, 15-17 September 2010.

640. Wiklund, K., Dich, J., & Holm, L. E. (1987). Risk of malignant lymphoma in Swedish pesticide applicators. *British Journal of Cancer*, 56(4), 505-508.
641. Wildner, G. F., & Henkel, J. (1979). The effect of divalent metal ions on the activity of Mg<sup>++</sup> depleted ribulose-1, 5-bisphosphate oxygenase. *Planta*, 146, 223-228.
642. Williams, P. L., Sergeev, O., Lee, M. M., Korrick, S. A., Burns, J. S., Humblet, O., ... & Hauser, R. (2010). Blood lead levels and delayed onset of puberty in a longitudinal study of Russian boys. *Pediatrics*, 125(5), e1088-e1096.
643. Wise, J. P., Orenstein, J. M., & Patierno, S. R. (1993). Inhibition of lead chromate clastogenesis by ascorbate: relationship to particle dissolution and uptake. *Carcinogenesis*, 14(3), 429-434.
644. Wittman, R., & Hu, H. (2002). Cadmium exposure and nephropathy in a 28-year-old female metals worker. *Environmental health perspectives*, 110(12), 1261-1266.
645. Wolin, M. S. (2000). Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(6), 1430-1442.
646. Wong, C. K., & Wong, M. H. (2000). Morphological and biochemical changes in the gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 517-527.
647. Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Notices*, 2011.
648. Xia, J., Lu, L., Jin, C., Wang, S., Zhou, J., Ni, Y., ... & Jin, Y. (2018). Effects of short term lead exposure on gut microbiota and hepatic metabolism in adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 209, 1-8.
649. Xu, N., Wu, Z., Li, X., Yang, M., Han, J., Lu, B., ... & Wang, J. (2022). Effects of nicosulfuron on plant growth and sugar metabolism in sweet maize (*Zea mays* L.). *Plos one*, 17(10), e0276606.
650. Xue, F., Wang, G., Pang, Z., Liu, C., & Liang, T. (2008). Protective Effect of Glutathione Against Liver Warm Ischemia-Reperfusion Injury in Rats is Associated with Regulation of P-Selectin and Neutrophil Infiltration. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 291(8), 1016-1022.
651. Yabuta, Y., Maruta, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2004). Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Plant and Cell Physiology*, 45(11), 1586-1594.

652. Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., & Jones, K. C. (2015). Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of the Total Environment*, 511, 123-137.
653. Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African journal of botany*, 76(2), 167-179.
654. Yan, D., Zhang, Y., Liu, L., & Yan, H. (2016). Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
655. Yang, J. L., Wang, L. C., Chang, C. Y., & Liu, T. Y. (1999). Singlet oxygen is the major species participating in the induction of DNA strand breakage and 8-hydroxydeoxyguanosine adduct by lead acetate. *Environmental and molecular mutagenesis*, 33(3), 194-201.
656. Yedjou, C. G., & Tchounwou, P. B. (2006). Oxidative stress in human leukemia (HL-60), human liver carcinoma (HepG2), and human (Jurkat-T) cells exposed to arsenic trioxide. In *Metal ions in biology and medicine: proceedings of the... International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine held...= Les ions metalliques en biologie et en medecine:... Symposium international sur les ions metalliques...* (Vol. 9, p. 298). NIH Public Access.
657. Yedjou, C. G., & Tchounwou, P. B. (2007a). In-vitro cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia (HL-60) cells using the MTT and alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assays. *Molecular and cellular biochemistry*, 301(1), 123-130.
658. Yedjou, C. G., & Tchounwou, P. B. (2007b). N-acetyl-l-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *International journal of environmental research and public health*, 4(2), 132-137.
659. Yedjou, C. G., Milner, J. N., Howard, C. B., & Tchounwou, P. B. (2010). Basic apoptotic mechanisms of lead toxicity in human leukemia (HL-60) cells. *International journal of environmental research and public health*, 7(5), 2008-2017.
660. Yim, M. B., Chock, P. B., & Stadtman, E. R. (1993). Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *Journal of Biological Chemistry*, 268(6), 4099-4105.
661. Young, R. A. (2005). Toxicity profiles: toxicity summary for cadmium, risk assessment information system. *RAIS, University of Tennessee*.
662. Younus, H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International journal of health sciences*, 12(3), 88.

663. Yu, Q. Q., Lu, F. F., Ma, L. Y., Yang, H., & Song, N. H. (2021). Residues of reduced herbicides terbuthylazine, ametryn, and atrazine and toxicology to maize and the environment through salicylic acid. *ACS omega*, 6(41), 27396-27404.
664. Yuen, H. W., & Becker, W. (2021). Iron toxicity. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
665. Yun, S. W., & Hoyer, S. (2000). Effects of low-level lead on glycolytic enzymes and pyruvate dehydrogenase of rat brain in vitro: relevance to sporadic Alzheimer's disease?. *Journal of neural transmission*, 107(3), 355-368.
666. Zadorozhnaja, T. D., Little, R. E., Miller, R. K., Mendel, N. A., Taylor, R. J., Presley, B. J., & Gladen, B. C. (2000). Concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, mercury, and zinc in human placentas from two cities in Ukraine. *Journal of toxicology and Environmental Health Part A*, 61(4), 255-263.
667. Zama, D., Meraihi, Z., Tebibel, S., Benayssa, W., Benayache, F., Benayache, S., & Vlietinck, A. J. (2007). Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: The protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L. *Indian Journal of Pharmacology*, 39(3), 145.
668. Zartarian, V., Xue, J., Tornero-Velez, R., & Brown, J. (2017). Children's lead exposure: A multimedia modeling analysis to guide public health decision-making. *Environmental health perspectives*, 125(9), 097009.
669. Zeeshan, H. M. A., Lee, G. H., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2016). Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 327.
670. Zhang, L., Yu, L., & Yu, C. A. (1998). Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 273(51), 33972-33976.
671. Zhang, Y. L., Zhao, Y. C., Wang, J. X., Zhu, H. D., Liu, Q. F., Fan, Y. G., ... & Fan, T. Q. (2004). Effect of environmental exposure to cadmium on pregnancy outcome and fetal growth: a study on healthy pregnant women in China. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 39(9), 2507-2515.
672. Zhang, Y., Lu, X., Wang, N., Xin, M., Geng, S., Jia, J., & Meng, Q. (2016). Heavy metals in aquatic organisms of different trophic levels and their potential human health risk in Bohai Bay, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17), 17801-17810.
673. Zhao, F. J., Ma, J. F., Meharg, A. A., & McGrath, S. P. (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, 181(4), 777-794.
674. Zhao, F.J.; Lombi, E.; Brendon, T. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ.* 2000, 23, 507-514.

675. Zhao, H., & Yang, H. (2008). Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia horticulturae*, 116(4), 442-447.
676. Zheng, Y. X., Chan, P., Pan, Z. F., Shi, N. N., Wang, Z. X., Pan, J., ... & He, F. S. (2002). Polymorphism of metabolic genes and susceptibility to occupational chronic manganism. *Biomarkers*, 7(4), 337-346.
677. Zhou, Z. H., Lei, Y. X., & Wang, C. X. (2012). Analysis of aberrant methylation in DNA repair genes during malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by cadmium. *Toxicological Sciences*, 125(2), 412-417.
678. Zhu, X. F., Zheng, C., Hu, Y. T., Jiang, T. A. O., Liu, Y. U., Dong, N. Y., ... & Zheng, S. J. (2011). Cadmium-induced oxalate secretion from root apex is associated with cadmium exclusion and resistance in *Lycopersicon esulentum*. *Plant, cell & environment*, 34(7), 1055-1064.
679. Давидовић-Плавшић, Б., Милетић, Н., Кукрић, З., Чолић, С., & Кукавица, Б. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА АНТИОКСИДАТИВНОГ МЕТАБОЛИЗМА СРИЈЕМУША.

CIP - Каталогизација у публикацији  
Народна и универзитетска библиотека  
Републике Српске, Бања Лука

615.9:612.06-008 (0.034.2)

ДАВИДОВИЋ Плавшић, Биљана, 1973-

Abiotički stres i redoks homeostaza ćelije [Електронски  
извор] / Biljana Davidović Plavšić, Biljana Kukavica. - Онлајн изд.  
- Ел. књига. - Вања Лука : Prirodno-matematički fakultet, 2023

Način pristupa (URL): <https://pmf.unibl.org/wp-content/uploads/2023/09/abioticki-stres-i-redoks-homeostaza-celije.pdf>. - Ел. публикација у ПДФ формату опсега 247 стр. -  
Насл. са насл. екрана. - Опис извора дана 19.09.2023. -  
Скраћенице: стр. 9-12. - Библиографија: стр. 193-247.

ISBN 978-99976-86-14-5

COBISS.RS-ID 139093505