

UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
FAKULTET:



РЕПУБЛИКА СРБИЈА
УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Број: 19-3099/13

Датум: 15.11.2013. год
БАЊА ЛУКА

IZVJEŠTAJ

o ocjeni podobnosti teme i kandidata za izradu doktorske teze

PODACI O KOMISIJI

Na osnovu odluke Naučno-nastavnog vijeća Prirodno-matematičkog fakulteta br. 19/3.2377/13 od 18.09.2013. godine imenovana je komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata za izradu doktorske disertacije pod nazivom „Ekotoksikološka istraživanja intoksikacije olovo-acetatom i alloxan-om Wistar pacova inficiranih ešerihijom (*Escherichia coli*)“ u slijedećem sastavu:

1. dr. Dragojla Golub, docent, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, uža naučna oblast: Zoologija – predsjednik.
2. dr. Ivica Radović, redovni profesor, Fakultet za bezbednost Univerziteta u Beogradu, uža naučna oblast: Ekologija, biogeografija i zaštita životne sredine, član.
3. dr. Radoslav Dekić, docent, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, uža naučna oblast: Fiziologija životinja, član.

1. BIOGRAFSKI PODACI, NAUČNA I STRUČNA DJELATNOST KANDIDATA

➤ Biografski podaci

Maja Manojlović rođena je 22.12.1977. godine u Banjaluci. Završila je Osnovnu školu „Filip Macura“ školske 1991/92 godine. Nižu Muzičku školu „Vlado Milošević“ završila je školske 1992/93 godine. Gimnaziju je završila školske 1995/96 godine. Godine 1997. upisala se na Prirodno – matematički fakultet u Banja Luci. Odsjek za biologiju, nastavni smjer. Diplomski rad pod naslovom „Gajenje egzotičnih vrsta riba iz familije *Cichlidae* (grgečiči) u akvarijumskim uslovima“ pod mentorstvom prof. dr. Milenka Radevića odbranila je 13. oktobra 2004. godine i time stekla zvanje profesora biologije. Školske 2004/2005. godine upisala je postdiplomske (magistarske) studije na smjeru Ekologija Odsjeka Biologija na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci, koje je završila sa prosječnom ocjenom 10.00. Odbranom magistarskog rada 10.06.2011. godine pod nazivom „Uticaj olova na potomstvo kod primigravidnih Wistar pacova“ je stekla zvanje Magistar bioloških nauka. Kao apsolvent obavljala je poslove demonstratora na predmetima Zoologija hordata i Ekologija životinja školske 2003/04.godine. Istovremeno je učestvovala u održavanju predavanja prilikom organizovanih posjeta Javnomakvarijum u Banjaluci, PMF. Za vrijeme studija stipendirana je od strane Heinrich Böll Fondacije.

potom Gradske uprave Grada Banja Luka – Fondacije „Petar Kočić“. Bila je predsjednica i jedan od osnivača studentske ekološke organizacije Republike Srpske SEKORS, u okviru koje je učestvovala u realizaciji većeg broja projekata. Učestvovala je na više seminara na temu ekologije i zaštite životne sredine u različitom trajanju. Zaposlena na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci od novembra 2004. godine kao asistent na predmetu Ekologija životinja sa zoogeografijom. U toku rada bila joj je povjerena nastava (izvođenje vježbi) iz predmeta: Zoologija hordata, Ekologija i raznovrsnost hordata, Zaštita biodiverziteta, Terestrična ekologija, Ihtiologija i Biologija gljiva i lišajeva. Izabrana je na mjesto višeg asistenta u martu 2012. godine, na predmetima Ekologija životinja sa zoogeografijom, Terestrična ekologija I i Terestrična ekologija II. Istovremeno izvodi vježbe i iz Ekotoksikologije, Modela i simulacija u ekologiji i Zoološkog praktikuma. Završila je početni stereološki kurs na Univerzitetu u Nišu 2005. godine. Kao član Udruženja Javnog zdravlja RS prisustvovala je godišnjem sastanku Svjetske federacije asocijacija javnog zdravlja u Ženevi, maja 2008. godine. Služi se engleskim i njemačkim jezikom. Udana je, majka troje djece.

➤ Bibliografski podaci

Radovi štampani u cjelini

1. Dekić, R., Ivanc, A., Lolić, S., Manojlović, M., Janjić, N., Erić, Ž., Četković, D. (2012): Parametri eritrocitne loze *Telestes metohiensis* iz vodotoka Pribitul. Skup. Vol. 4 (2), Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, str. 153-160.
2. Lolić, S., Boroja, M., Dekić, R., Kovačević, Z., Manojlović, M., Kukavica, B. (2011): Analiza kvaliteta vode izvora na području planine Manjača. Skup 4, Zbornik radova II Simpozijuma biologa Republike Srpske i I Simpozijuma ekologa Republike Srpske, Banja Luka 4-6.11.2010. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, str. 287-293.
3. Vujanović, T., Radević, M., Manojlović, M., Ivanc, A., Dekić, R. (2011): Dužinsko-težinski odnosi kod skobalja (*Chondrostoma nasus*). Skup 3, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, str. 57-66.
4. Radević, M., Pavlović, N., Đurđević, S., Balaban, M., Boroja, M., Manojlović, M., Filipović, S. (2008): Kvalitet vode za piće Banjaluke sa mikrobiološkog i fizičko-hemijskog aspekta. VODA 2008: Zbornik radova 37. godišnje konferencije o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda. Mataruška Banja, str. 489-492.
5. Pavlović, N., Radević, M., Filipović, S., Balaban, M., Boroja, M., Đurđević, S., Manojlović, M., (2008): Stanje zoobentsa Vrbasa uzvodno od fabrike vode Novoselija. VODA 2008: Zbornik radova 37. godišnje konferencije o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda. Mataruška Banja, str. 77-80.
6. Radević, M., Janjić, N., Manojlović, M. (2008) : Značaj ekološke sekcije u osnovnim i srednjim školama. Skup 2: Zbornik radova I Simpozijuma biologa Republike Srpske, Banja Luka 10-12.11.2005., str. 149-154.
7. Radević, M., Janjić, N., Manojlović, M. (2008) : Pravilno ocjenjivanje učenika, značajan indikator u vrednovanju rada nastavnika u osnovnim i srednjim školama. Skup 2: Zbornik radova I Simpozijuma biologa Republike Srpske, Banja Luka, 10-12.11.2005., str. 155-162.
8. Radević, M., Janjić, N., Manojlović, M. (2008) : Nastava biologije u reformisanom sistemu obrazovanja. Skup 2: Zbornik radova I Simpozijuma biologa Republike Srpske, Banja Luka, 10-12.11.2005., str. 163-170.

9. Radević, M., Manojlović, M. (2007): Kvalitet vode kao indikator bolje proizvodnje riba u pojedinim bazenima ribnjaka Bardača. Zbornik radova sa naučnog skupa „Srbija i Republika Srpska u regionalnim i globalnim procesima“, Beograd – Banjaluka, 2007. str. 281-288.

Publikacije:

Radević, M., Manojlović, M. (2009) : Ekologija životinja sa zoogeografijom (praktikum), Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci.

Učešće u realizaciji naučno - istraživačkih projekata (saradnik):

1. Biohemijski i fiziološki status pacova Wistar soja inficiranih ešerihijom (*Escherichia coli*) u različitom postaplikacionom periodu. (2012-2013) Ministarstvo nauke i tehnologije, koordinator prof. dr Aleksandar Ivanc.
2. Određivanje koncentracije olova i uticaj elektromagnetnog zračenja na populaciju životinja. (2009-2011) Ministarstvo nauke i tehnologije, koordinator prof. dr Mitar Novaković.
3. Utvrđivanje koncentracije olova u hidrološkom području Manjače i rijeci Krupi. (2010) Ministarstvo nauke i tehnologije, koordinator doc. dr Biljana Kukavica.
4. Kvalitet vode za piće stanovništva Banje Luke, (2007) Ministarstvo nauke i tehnologije, koordinator prof. dr Milenko Radević.

2. ZNAČAJ I NAUČNI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

➤ Značaj istraživanja

U današnje vrijeme, problem opterećenja životne sredine različitim polutantima i toksičnim materijama sve je više izražen. Brojni i heterogeni polutanti mogu izazvati raznovrsne negativne efekte u živim organizmima. Dejstvo toksina se mijenja u interakciji sa drugim polutantima, kao i biotoksinima. U tom smislu, pored određivanja letalne i najveće doze polutanta, izuzetno je značajno utvrditi efekte zajedničkog dejstva dva ili više polutanata na sisteme organa, reprodukciju i ponašanje jedinki. Zbog svega navedenog, u ovom istraživanju pratiće se efekat intoksikacije olovo-acetatom, alloxan-om (*diabete mellitus* tip 1) i toksinima *Escherichia coli* na morfometriju i hematološki status Wistar soja pacova čija morfologija i fiziologija dovoljno nalikuju onima kod čovjeka i koji pruža najbolje funkcionalne karakteristike sisarskog modela sistema. Poseban značaj ogleda se u interpretaciji dejstva kako abiotičkih (olovo-acetat i alloxan) tako i biotičkih (biotoksini *Escherichia coli*) faktora na žive sisteme.

➤ Pregled istraživanja

Ekotoksikologija prati i proučava promjene u ekosistemima (prirodnim i antropogenim) i biosferi u cjelini, koje su se dogodile i događaju se pod uticajem antropogenih aktivnosti (toksikološki pristup) i destruktivne promjene na nivou ekosistema i njegovu degradaciju i stabilizaciju (ekološki pristup) (Jablanović *et al.*, 2003). Termin ekotoksikologija, spoj ekologije i toksikologije, se u literaturi javlja krajem šesdesetih godina (Truhaut, 1977). Toksikologija istražuje efekte trovanja koji se ispoljavaju na nivou individue. Oboljenja koja izazivaju zagađujuće supstance u ljudskoj populaciji često su masovna i imaju epidemijski karakter. Klasična ekologija, kao biološka disciplina, proučava odnose biotičkih i abiotičkih komponenata u ekosistemima, ne zanemarujući jedinke. Izmjena samo jedne od komponenti (prvenstveno pojavom različitih polutanata) izaziva lančane promjene u cijelom ekosistemu. Ekotoksikologija, „kćerka“ ekologije i toksikologije, se bavi

izvorima i vrstama zagađivanja ekosistema, odnosno životne sredine, prati njihovu sudbinu u ekosistemima (monitoring) i proučava štetne efekte zagađenja na fizičku sredinu i biološke sisteme, planira i sprovodi aktivnosti predviđanja mogućih posljedica, pronalazi mogućnosti zaštite životne sredine, koristeći različita sredstva i metode (Jablanović *et al.*, 2003). U okviru ekotoksikoloških istraživanja koriste se brojni testovi (**OECD metode** - 201 Alga, Growth Inhibition Test, 202 Daphnia sp, Acute Immobilisation Test, 203 Fish, Acute Toxicity Test, 204 Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study, 205 Avian Dietary Toxicity Test, 206 Avian Reproduction Test, 207 Earthworm, Acute Toxicity Tests, 208 Terrestrial Plants, Growth Test, 209 Activated Sludge, Respiration Inhibition Test, 210 Fish, Early-Life Stage Toxicity Test.... **EU test metode**- C.1. ACUTE TOXICITY FOR FISH, C.2. *DAPHNIA* SP. ACUTE IMMOBILISATION TEST, C.3. ALGAL INHIBITION TEST, C.4. DETERMINATION OF "READY" BIODEGRADABILITY i mnogi drugi). Uobičajeni ekotoksikološki testovi prvenstveno imaju za cilj utvrditi letalnu dozu toksikanta, kao i najveću dozvoljenu dozu za dnevni unos. U opsegu između ove dvije doze, javljaju se brojne biohemijske i fiziološke promjene u organizmu intoksikovane jedinke. Ove promjene variraju u zavisnosti od visine doze, kao i od vrste organizma.

Za ovaj eksperiment su odabrani **olovo-acetat, alloxan (diabete mellitus tip 1) i Escherichia coli**, čiji će se uticaj pratiti na Wistar pacovima. Radi utvrđivanja efekata intoksikacije radiće se hematološke i morfometrijske analize, uz stalno posmatranje jedinki i praćenje uticaja ovih polutanata na njihovo ponašanje i uzimanje hrane i vode.

Olovo, sveprisutan i raznovrstan metal, počelo se koristiti još u praistoriji, tako da je danas izuzetno široko distribuirano u životnoj sredini (Tong *et al.*, 2000). Znanje o njegovim opštim toksičnim efektima se proteže unazad tri milenijuma, a ipak izloženost olovu nastavlja da bude jedan od glavnih globalnih problema, posebno u razvijenim urbanim centrima i zemljama trećeg svijeta. Olovo je jedan od najranije otkrivenih otrova (Lidsky, Schneider, 2003). Olovo se emituje u atmosferu iz prirodnih i antropogenih izvora. Prirodna emisija obuhvata resuspenziju vjetrom, erupcije vulkana, šumske požare, morski aerosol i biogene izvore (Nriagu, 1989). Prema Nriagu (1988) ova emisija olova u atmosferu nije u potpunosti prirodna, jer joj doprinosi antropogeno olovo nataloženo kroz istoriju. Globalno gledano, glavni emisijski izvori olova uključuju sagorijevanje fosilnih goriva, proizvodnja obojenih metala, željeza i čelika. Znatna količina olova se emituje i proizvodnjom cementa, kao i odlaganjem industrijskog i urbanog otpada (Pacyna & Pacyna, 2001). Dugo vremena najveći izvor antropogenog olova je predstavljao olovni benzin, tako da organizmi koji naseljavaju rubna područja autoputeva predstavljaju svojevrsne determinante izlaganja olovu (Strömberg *et al.*, 2003.), kao i organizmi koji naseljavaju uže područje oko fabričkih i rudničkih postrojenja. Olovo se u atmosferi nalazi isključivo vezano sa drugim elementima čineći partikule veličine 0,1-1 µm. Najčešće se emituje u vidu sulfata, hlorida i oksida. Sagorijevanje benzina oslobađa olovo u obliku olovo - oksida (PbO), obojena metalurgija olovosulfat (PbSO₄) i olovo - oksid, a sagorijevanje uglja olovo dihlorid (PbCl₂) (AMAP, 1998). Olovo iz atmosfere dospijeva u zemljište ili vodu putem mokre i suve depozicije, često veoma daleko od izvora emisije. Kao i većina teških metala, olovo se u atmosferi zadržava dugo, pri čemu može preći stotine, pa čak i hiljade kilometara. Ova pojava je najuočljivija u polarnim krajevima, daleko od urbanih sredina, gdje se olovo nalazi u različitim koncentracijama na različitim dubinama leda (AMAP, 2001). Olovo dospijeva u površinske i podzemne vode i primjenom đubriva bogatih olovom, iz kanalizacionog mulja na okolnom zemljištu, izlivanjem kanalizacionih u tekuće vode i slično. Od izuzetnog značaja su i veliki industrijski i rudarski centri koji svoje otpadne vode bez prethodnog prečišćavanja ispuštaju u okolne riječne tokove (Kastori, 1997). Rijeke se dodatno bogate olovom prolaskom kroz velike urbane sredine (Tedeschi, 1990). Značajan izvor olova u stajaćim vodama predstavlja olovna municija koja se koristi pri lovu na barske ptice, stoga je zabranjena uporeba olovne sačme. Vodotoci u blizini deponija su direktno ugroženi brojnim kontaminantima, samim tim i olovom. Koncentracije olova detektovane u ovim tokovima su znatno veće od dozvoljenih (Odukoya, Abimbola, 2010). Olovo u vodi za piće se javlja i u krajevima sa izraženim aciditetom vode, koji koriste stare olovne cijevi. Ukoliko je pH vode neutralan ili alkalnan ne dolazi do rastvaranja olova iz vodovodnih cijevi. Pošto organske komponente zemljišta imobilišu olovo, deponovano olovo se nalazi u gornjem sloju zemljišta dubine 2-5 cm (CDC, 1991). Količina prirodnog olova u zemljištu se najčešće kreće između 10 i 30 mg/kg zemljišta. Ukupna koncentracija olova u gornjem sloju zemljišta zavisi od depozicije i akumulacije olova iz antropogenih izvora. U Evropi koncentracija olova u zemljištu je prostorno heterogena i kreće se od 10 do preko 70 mg/kg. Srednja vrijednost je procijenjena na 22,6 mg/kg. Generalno, koncentracija olova u zemljištu opada porastom udaljenosti od izvora kontaminacije. Koncentracije olova u zemljištu udaljenom do 25 metara od saobraćajnica su za 30 - 2000 mg/kg veće od prirodnih, dok im vrijednost eksponencijalno opada na udaljenosti većoj od 25 m. U zemljištu pored topionica obojenih metala olovo je zastupljeno u koncentracijama od nekoliko hiljada do čak 60000 mg/kg (ATSDR, 2005). Zemljišta bogata olovom pokazuju signifikantan pad produktiviteta. Brojni su i izuzetno kompleksni efekti olova na biljke (Sengar *et al.*, 2008, Kastori, 1993), životinje (Čupić, 1999, Modrall,

Pokras 2010), kao i čovjeka (Järup, 2003, WHO, 1995). Biljke apsorbuju olovo u velikoj mjeri preko korjenovog sistema i u veoma maloj količini putem lišća. U biljkama se olovo akumulira prvenstveno u korijenu, ali znatna količina može biti translocirana i u nadzemne dijelove. Sposobnost apsorpcije olova od strane biljaka zavisi od pH vrijednosti zemljišta, fizičko - hemijskog sastava zemljišta, kao i od površine korjenovog sistema i mikorizne transpiracije. Manja količina olova se transportuje od korjena u ostale organe zahvaljujući prirodnoj barijeri korjenovog endoderma. U letalnim koncentracijama dolazi do prodora barijere, pri čemu olovo dospijeva u ostala biljna tkiva. U biljkama olovo gradi depozite različitih veličina, prvenstveno u intercelularima, ćelijskim zidovima i vakuolama. Manje nakupine olova su uočene i u endoplazmatskom retikulumu, diktiozomima i diktiozomskim vezikulama. Po ulasku u ćeliju, olovo inhibira mnoge enzime, remeteći mineralnu ishranu i vodni balans, utiče na hormonalni status, kao i na permeabilnost ćelijske membrane narušavajući njenu strukturu. Vidljivi nespecifični simptomi olovne toksikoze su smanjen rast, hloroze i zatamnjen korjenov sistem. Olovo smanjuje fotosintetsku produktivnost biljaka remeteći strukturu hloroplasta, smanjujući sintezu hlorofila, remeteći transport elektrona i inhibirajući aktivnost enzima Kalvinovog ciklusa (Sengar *et al.*, 2008). Olovo djeluje izuzetno negativno na brojne organske sisteme (Todd *et al.*, 1996). Brojni eksperimenti na laboratorijskim životinjama pokazali su da olovo alterira morfološke odlike jajnika, izaziva promjene u funkciji placente, razvoju ploda i slično (Silbergeld, 1986). Tokom graviditeta olovo posebno ispoljava svoj negativan efekat, prolazeći kroz placentalu barijeru (Lagerkvist, *et al.*, 1996; Silbergeld, 1983), ali se njegovo dejstvo nastavlja i tokom laktacije, kada olovo eksponiranih majki mlijekom dospijeva u organizam sisančeta (Mornjaković *et al.*, 1995; Mornjaković, 1994). Ekspozicija olovu tokom gestacije i laktacije dovodi do brojnih neuroloških poremećaja, kao što su deficit memorije, neurološke abnormalnosti (Soodi *et al.*, 2008), promjene uobičajenih obrazaca ponašanja (Sedik *et al.*, 2010), smanjenje tjelesne dužine i mase (Mornjaković, 2000), povećanje mase pojedinih unutrašnjih organa (Soodi *et al.*, 2008) i slično. Kod domaćih životinja trovanje olovom (plumbizam) je najčešće akutnog tipa, a najosjetljiviji su preživari potom konji, živina i svinje (Neathery, Miller, 1975). Kod domaćih životinja trovanje olovom izaziva poremećaje nervnog sistema, gastrointestinalnog trakta, mišićnu koordinaciju i remeti sintezu hema. Kod stoke se uočavaju depresija, sljepilo, propadanje zuba, grčenje mišića, učestalo treperenje kapaka i konvulzivni napadi. Kod ovaca su zastupljene depresija, anoreksija, abdominalna bolidijareja. Anemija je karakteristična za hroničnu izloženost olovu. U okolini rudnika kod ovaca su uočene osteoporoze kod mladih jedinki, kao i učestali abortusi. Kod konja simptomi olovne intoksikacije uključuju anemiju, depresiju, stuporilaringealnu paralizu koja otežava disanje (Neathery, Miller, 1975; Čupić, 1999). Divlje životinje takođe nose posljedice narušavanja ekosistema. Trovanja olovom su zabilježena kod mnogih vrsta. U Esperanci, Australija, krajem 2006. godine došlo je do velikog pomora ptica. Istraživanja su otkrila da je uzrok smrti preko 9000 ptica različitih vrsta bilo akutno trovanje olovom, usljed transporta velike količine olovo karbonata otvorenim kamionima iz obližnjeg rudnika. Akutno trovanje olovom jedan je od glavnih uzroka ugroženosti Kalifornijskog kondora, bjeloglavog orla, kao i drugih vrsta. Ingestija i trovanje olovom su dokumentovani kod najmanje 63 ptičje vrste od kojih je 10 ugroženih. Brojni su i primjeri hroničnog trovanja divljih životinja antropogenim olovom. Posebno su ugrožene one životinje koje žive u blizini urbanih centara, kao što su nepalski majmuni koji naseljavaju okolinu hramova, ptići pacifičkih ostrvskih albatrosa koji žive u blizini zgrada i urbani psi Indije. Kod mnogih vrsta su pronađene subletalne koncentracije olova u krvi. Simptomi koji se razvijaju kod intoksikovanih životinja odgovaraju onima kod ljudi. Agresivno ponašanje se javlja kod ljudi, mačaka i drugih vrsta, hipertenzija je prisutna kod ljudi i pasa, poremećaji ponašanja i koncentracije kod ljudi i galebova, gubitak kose/krzna kod ljudi i majmuna. Kao i kod ljudi, najugroženije su mlade jedinke životinjskog svijeta (Modrall, Pokras 2010). Ni krupni sisari nisu pošteđeni pogubnog djelovanja olova. Dokumentovana je intoksikacija olovom leoparda, pantera i eibetke u sjeveroistočnoj Indiji (Sudip *et al.*, 1999). Čovječanstvo je izloženo atmosferskom olovu i olovu iz hrane u približno jednakim proporcijama. Prema nekim podacima poluživot olova u krvi iznosi oko 1 mjesec, a u kostima 20-30 godina (Järup, 2003). Olovo nema prirodnu funkciju u ljudskom tijelu. Može direktno, kao i većina ostalih teških metala, oštetiti meka tkiva, posebno jetre, bubrega i nervnog sistema. Takođe, poznato je da olovo utiče na nervne sinapse. Osim toga, olovo smanjuje kapacitet tijela da metabolizuje vitamin D. Kako olovo najčešće dospijeva u organizam u obliku veoma sličnom kalcijumu, najviše se nakuplja u kostima i zubima. Pošto neometano ulazi u krvotok utiče i na stvaranje zdravih eritrocita (remeti sintezu hema – inhibicija dehidrataze DALK) koji gube funkcionalnost u vezanju atoma kiseonika i njegovom prenosu od pluća prema drugim tkivima. Iako je olovo opasnost za cjelokupnu populaciju, posebno su u opasnosti djeca došeste godine, jer se njihov nervni sistem još razvija (Goyer, 1993). Takođe, skeletni sistem raste i razvija se te mnogi naučnici smatraju da znatna količina olova unesena u organizam u djetinjstvu ostaje pohranjena u kostima tokom cijelog života. Kod odraslih, neorgansko olovo ne prodire kroz krvno – moždanu barijeru, dok je ova prepreka manje razvijena kod djece. Visok gastrointestinalni unos i propustljiva krvno – moždana barijera čine djecu posebno osjetljivom na izloženost olovu što često dovodi domoždanih oštećenja. Olovo u sklopu organskih jedinjenja prodire kroz ćelijske membrane. Tetrametil – olovo i tetractil – olovo prodire lako u

kožu. Ova jedinjenja mogu da predu barijeru krv – mozak i kod odraslih, što kod akutnog trovanja rezultuje pojavom encefalopatije. Simptomi akutnog trovanja olovom (akutni saturnizam) su glavobolja, razdražljivost, bol u stomaku i razni simptomi vezani za nervni sistem. Olovna encefalopatija se odlikuje nesanicom i uznemirenošću. Kod djece se mogu javiti poremećaji u ponašanju, učenju i teškoće pri koncentraciji. U teškim slučajevima olovne encefalopatije, osoba može patiti od akutne psihoze, kontuzije smanjenesvijesti. Ljudi koji su bili izloženi olovu duže vremena mogu da pate od propadanja memorije, produženog vremena reakcije i smanjene sposobnosti shvatanja. Pojedinci sa prosječnom koncentracijom olova u krvi ispod 3 $\mu\text{mol/l}$ mogu odavati znakove poremećaja perifernih nerava, koji se očituju smanjenom nervnom provodljivošću i smanjenim dermalnim senzibilitetom. Kod ozbiljnih neuropatija lezije mogu biti trajne. U takvim slučajevima se uočava tamnoplava olovo – sulfidna linija na ivicama desni. U manje ozbiljnim slučajevima, najočigledniji znak trovanja olovom je poremećaj sinteze hemoglobina, koji dugoročno može dovesti do anemije (Järup, 2003; WHO, 1995). Novija istraživanja pokazuju da dugotrajna izloženost niskim koncentracijama olova dovodi do smanjenja inteligencije kod djece. Akutna izloženost olovu dovodi do oštećenja proksimalnih tubula bubrega (WHO, 1995). Dugoročna izloženost dovodi do ozbiljnijih oštećenja bubrega, koja su u direktnoj korelaciji sa dužinom izloženosti (Mortada *et al.* 2001). Dostupna koncentracija olova u krvi djece, prema Svjetskom centru za kontrolu i prevenciju bolesti iz Atlante (CDC), do 10 $\mu\text{mg/dl}$ smatrala prihvatljivom. Međutim, novija istraživanja ukazuju da se mogu pojaviti toksikološki efekti i pri nižim koncentracijama. Uočeno je da genetički, kao i faktori sredine mogu povećati efekte na neuralni razvoj djece izložene niskim koncentracijama olova, što ukazuje na činjenicu da su pojedina djeca osjetljivija na olovnu neurotoksičnost (Lidsky, Schneider, 2003). Sumnja se i da je olovo mogući karcinogen. Međutim, još uvijek nema čvrstih podataka iz studija na ljudskim populacijama. Postoji vjerovatnoća da olovo uzrokuje rak pluća, želuca i gliom (Steenland, Boffeta, 2000). Evidentirana je i intoksikacija olovom preko kože, ali u veoma malim koncentracijama. Izloženost koži olovu se prvenstveno dovodi u vezu sa činjenicom da olovo sa kontaminiranih ruku doprinosi oralnom unosu olova u organizam (Askin and Volkmann, 1997; Kranz *et al.* 2004). Izlaganje organizma olovu se povezuje i sa upotrebom kontaminirane kozmetike (Al-Ashban *et al.* 2004).

Prema dosadašnjim istraživanjima efekti olovo-acetata na krvnu sliku pacova ogledaju se prije svega u smanjenom broju eritrocita u krvi (anemija), povećanom broju leukocita (leukocitoza), monocitozi, eozinopeniji, neutrofiliji i trombocitozi. Smatra se da se mikrocišćna hipohromna anemija može povezati sa interakcijom olova sa metabolizmom željeza i bakra, a povećan broj leukocita se dovodi u vezu sa inflamatornim efektom olova na limfatične organe (Noori Mugahi *et al.*, 2003). Povećanje odnosa masa organa:masa tijela je dokumentovano za bubrege i jetru pacova tretiranih olovo-acetatom (Abdel-Moncim *et al.*, 2011).

Alloxan je oksigenisani pirimidinski derivat, izolovan 1818. godine. Javlja se kao hidrat u vodenim rastvorima. Toksikant je koji primjenjen kod glodara i drugih organizama selektivno uništava beta- ćelije zasluzne za proizvodnju insulina. Na taj način izaziva dijabetes zavisao od insulina kod eksperimentalnih životinja, analogan *diabetes mellitus* tip 1 kod ljudi. Alloxan je selektivno toksičan, jer se primarno nagomilava u beta-ćelijama u koje dopjeva putem GLUT2 transportera glukoze. Podijeljena su mišljenja o dijabetesu izazvanom alloxan-om kod ljudi i nivou ovog toksikanta u plazmi, prvenstveno djece (Lenzen, 2008). Veoma često se koristi u laboratorijama za izazivanje vještačkog dijabetesa kod eksperimentalnih životinja, radi dobijanja modela pogodnog za izučavanje *diabetes mellitus*-a kod ljudi. Smatra se da ne izaziva promjene na beta-ćelijama ljudi, radi različitog mehanizma uzimanja glukoze (Tyrberg *et al.*, 2001; Eizirik *et al.*, 1994), ali dokazano izaziva velika oštećenja na bubrežima i jetri, a znatno veći nivo alloxan-a u plazmi je konstatovan kod djece uzrasta 6-15 godina oboljelih od *diabetes mellitus*-a tip 1 (Mrozikiewicz *et al.*, 1994). **Diabetes mellitus tip 1** je katabolički poremećaj gdje je cirkulišući insulin veoma nizak ili odsutan, plazmaglukagon povišen, a pankreasne beta ćelije gube sposobnost odgovora na insulinu stimulaciju. Faktori spoljašnje sredine koji hipotetički mogu učestvovati u oštećenju beta ćelija su virusi (npr, mumps, rubella, Coxsackie B4), toksične hemikalije, kao i upotreba kravljeg mlijeka u ranom odojačkom dobu i citotoksini. *Diabetes mellitus* (DM) tip 1 je autoimuno oboljenje, stanje hronične hiperglikemije i poremećaj metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina koje nastaje kao posljedica apsolutnog i-ili relativnog nedostatka dejstva insulina. Prve promjene se javljaju mnogo ranije nego što se javne kliničke manifestacije ove bolesti. Javljaju se u vidu zapaljenskih promjena u Langerhansovim ostrvcima pankreasa. Ovo dalje vodi razaranju ćelija koje luče insulin i na kraju završava insulinškim deficitom. Tokom trajanja DM, hronična hiperglikemija narušava imuni sistem, izaziva oštećenja i disfunkcije različitih organa, a posebno oka, bubrega, nerava, srca i krvnih sudova (Badr, 2012). Nakon infekcije *Escherichia coli* 2011. godine, koja je započela u Njemačkoj, postalo je jasno da ova bakterija može da izazove teške dijareje, često praćene ozbiljnijim komplikacijama. Evidentirano je da je u nekim težim slučajevima kod pacijenata došlo do renalnih komplikacija u vidu hemolitičkog uremijskog sindroma (HUS) (Wiwanitkit, 2011, Suri, 2009).

HUS je poznat po povezanosti sa diabetesom. Usljed oštećenja pankreasa (Wiwanitkit, 2011, Robitaille, 1997), kod pedijatrijskih pacijenata zaraženih *Escherichia coli* uočena je povećana incidenca inzulinski zavisnog diabetes mellitus-a. Obično je povezana sa otkazivanjem renalnih funkcija, kao posljedica hemolitičkog uremijskog sindroma (Taylor, 1986; al Herbish, 1992; Robitaille, 1997; Suri, 2005; Suri, 2009, Wiwanitkit, 2011). Suri i ostali govore kako "je kod pacijenata koji su prebolovali HUS praćen dijarejom povećan broj slučajeva dijabetesa usljed potpune deficijencije insulina, te se može vratiti nekoliko godina nakon početne infekcije" (Suri *et al.*, 2009). Suri predlaže praćenje pacijenata radi dijabetesa usljed akutnog stanja i duže vrijeme nakon teške infekcije (Wiwanitkit, 2011, Suri *et al.*, 2005). Pored komplikacija u vidu HUS-a, infekcija ešerihijom koli kod dijabetičara može da dovede do razvoja peritonitisa. U animalnim studijama je potvrđeno da endotelin-1 igra značajnu ulogu u razvoju peritonitisa, a povećane koncentracije plazma endotelina-1 bile su česte pri septičkom peritonitisu izazvanom ešerihijom (Wiwanitkit, 2011, Tsukada, 1993). Muhammad i saradnici (2011) su utvrdili da se vrijednosti broja eritrocita i leukocita (smanjen broj neutrofila, a povećan broj limfocita) u litri krvi značajno smanjuju kod pacova sa alloxan indukovanim dijabetesom (*diabetes mellitus* tip 1). Pad vrijednosti je uočen i za koncentraciju hemoglobina.

Bakterijska infekcija uzrokovana inokulacijom *Escherichia coli* može da dovede do ozbiljnih patoloških procesa u organizmu poput sepse i meningitisa u neonatalnom periodu (Korhonen *et al.*, 1985, Martindale *et al.*, 2000), te raznih sistemskih infekcija kao što su infekcija urinarnog trakta i kolonizacija gastrointestinalnog trakta u svim periodima ontogeneze (Sarff *et al.*, 1997, Orsakov i Orsakov, 1985, Plos *et al.*, 1995). Sepsa, septički šok i otkazivanje fizioloških funkcija mnogih organa su ozbiljne posljedice infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama koje često vode ka smrtnom ishodu (Pacheco *et al.*, 2002). Kolonizacija gastrointestinalnog trakta je zajednički korak u patogenezi mnogih bolesti uzrokovanih patogenom *Escherichia coli* (Martindale *et al.*, 2000). Da bi opstale u gastrointestinalnom traktu, bakterije moraju preživjeti mehanizme odbrane domaćinog imunog sistema i usvojiti nutrijente trenutnog mikrostaništa, često bivajući u kompetitivnom odnosu sa domaćinogom mikroflorom. Ekstraestestinalna infekcija uzrokovana bakterijom *Escherichia coli* uključuje septikemiju i poliserotozu, neonatalni meningitis i infekciju urinarnog trakta kod ljudi i drugih životinja (Ngeleka *et al.*, 1993). Bakterije pokazuju ekspresiju mnogih antigena i sekreciju faktora virulencije (toksina) koji mogu omesti imuni odgovor. Bakterijski egzotoksini i endotoksini su važni u patogenezi specifičnih bolesti (John, 1997). Faktori virulencije bakterije *Escherichia coli* koji uzrokuju septikemiju uključuju manozno-rezistentne (MR) fimbrije, citotoksine, aerobaktin i ColV plazmide, proteinske spoljašne membrane, lipopolisaharide (LPS) i kapsule, O-antigen kapsule (Ngeleka *et al.*, 1993). Egzotoksini su po hemijskoj prirodi proteini koje sekretuju mnoge vrste bakterija. Endotoksini su somatski lipopolisaharid-proteinski kompleksi. Ovi kompleksi antigena smješteni su na spoljašnjoj membrani svih Gram-negativnih bakterija (John, 1997). Endotoksini (lipopolisaharidi, LPS) su poznati kao najmoćniji bakterijski produkti u indukciji infekcijskog procesa kao odgovora imunog sistema domaćina na određeni antigen. Lipopolisaharidi takođe indukuju produkciju i oslobađanje različitih citokina (Othman *et al.*, 2006). Interakcija između lipopolisaharida porijeklom iz Gram-negativnih bakterija i domaćinogih inicijalnih produkata lančane reakcije medijatora infekcije iz monocita i makrofaga je odgovorna za efektivnost imunog sistema. U slučaju septičkog šoka, sekrecija medijatora infekcije je odgovorna za hemodinamičku neravnotežu, aktivaciju komplemenata i, na kraju, za otkazivanje fizioloških funkcija mnogih organa (Pacheco *et al.*, 2002). Livingston i saradnici (1990) su istakli da je proliferacija bijelih krvnih ćelija važan i neophodan odgovor na bakterijsku infekciju. Oni su istraživali efekte hemoragičnog šoka i administracije lipopolisaharida (LPS) na koštanoj srži. Takođe su uočili da je broj bijelih krvnih ćelija u koštanoj srži nepromijenjen nakon administracije lipopolisaharida (LPS). Bozza i saradnici (1994) su uočili da intraperitonealna injekcija LPS (250 ng) indukuje smanjenje broja neutrofila nakon 1h, koji doseže svoj maksimum između 6-12h, a njihov broj se definitivno redukuje nakon 24h. Smanjenje broja neutrofila nakon 16h se poklapa sa redukcijom broja ovih ćelija u koštanoj srži. Ipak, krvna neutrofilija i smanjenje broja neutrofila u koštanoj srži indukovana intravenozno injekcijom LPS (250 ng) je dala značajno niže vrijednosti rezultata nego slučajevi posmatrani nakon injekcije u peritoneum.

Laboratorijski, ili norveški, pacov (*Rattus norvegicus*) je jedna od najčešće korišćenih eksperimentalnih životinja, koja pruža najbolje funkcionalne karakteristike sisarskog modela sistema. Pacovi služe kao model organizma za analizu brojnih važnih biomedicinskih prijetnji, kao što su kardiovaskularne bolesti, metabolički poremećaji, neurološki poremećaji, transplatacija organa, autoimune bolesti i bolesti bubrega (Henrich, 2000). Hematološke i biohemijske vrijednosti zdravih laboratorijskih pacova variraju sa starosti, sojem, polom i spoljašnjim uslovima. Administracija endotoksina u eksperimentalne životinje rezultuje raznim patofiziološkim promjenama kao što su sistemska hipotenzija i plućna hipertenzija, kao i hematološke promjene, manifestovane u smanjenju broja leukocita i trombocita u cirkulaciji (Erve *et al.*, 1978, Goodman *et al.*, 1979, Brigham i Meyrick, 1986 i Rojas *et al.*, 2004). Mnoge studije su pokazale postojanje nekoliko hematoloških promjena u eksperimentalnoj endotoksemiji. Hawes i saradnici (1983), van Lambalgen i

saradnici (1988), Egan i saradnici (1989), Kitajima i saradnici (1995), Pearson i saradnici (1995), Kosumi i saradnici (2001), Othman i saradnici (2006) i Oladunmoye (2006) pokazali su da administracija Gram-negativnih bakterija u pacove kao eksperimentalne životinje uzrokuje sistemsku hipotenziju, smanjenje odnosa uobličjenih elemenata i plazme (hematokrit) i smanjenje koncentracije hemoglobina, kao i smanjenje broja leukocita, eritrocita i trombocita u cirkulaciji. Kao adekvatan eksperimentalni model najčešće se koristi laboratorijski pacov, čija morfologija i fiziologija dovoljno nalikuju ljudskim.

➤ Radna hipoteza sa ciljem istraživanja

U smislu dobijanja adekvatnih podataka o uticaju intoksikacije olovo-acetatom i Alloxan-om kod pacova inficiranih *Escherichia coli* na morfolometrijske i hematološke parametre, napraviće se odgovarajuća podjela eksperimentalnih jedinki na kontrolne i testne grupe. Kod testnih grupa predviđena je inokulacija bakterija zdravim jedinkama u različitom vremenskom intervalu, dok će kod kontrolnih grupa biti proveden isti tretman s fiziološkim rastvorom. Eksperimentalnim jedinkama koje su podvrgnute tretmanu Alloxan-a, vještački će se indukovati *diabetes mellitus* tipa 1, a potom će kod njih biti izazvana infekcija *Escherichia coli*, kako bi se istovremeno pratili efekti dijabetesa i bakterijske infekcije. Treća cjelina u okviru eksperimenta obuhvata jedinke intoksikovane olovo-acetatom, kojim će se poiti u koncentraciji od 1500 ppm putem vode *ad libitum*. Bakterijska infekcija će biti izazvana i kod ove grupe jedinki nakon provedenog tretmana olovo-acetatom. Četvrta grupa eksperimentalnih životinja će objediniti toksikante i infekciju ešerihijom. Dosadašnja istraživanja su pokazala da bakterijska infekcija, intoksikacija olovo-acetatom i Alloxan-om izazvan dijabetes rezultuju smanjenjem broja eritrocita i trombocita laboratorijskih pacova, kao i povećanjem broja leukocita, tako da se očekuje promjena vrijednosti krvnih parametara testnih jedinki. Za pretpostaviti je da će se uočiti jasna razlika u vrijednostima hematoloških parametara (Hgb, E, L, Hct, DKS) između jedinki žrtvovanih nakon 24 i 72 sata. Kako se olovo zadržava pored kostiju i u unutrašnjim organima očekuje se promjena odnosa masa organa/tjelesna masa intoksikovanih jedinki, prvenstveno povećanje koeficijenta jetre i bubrega (Han *et al.*, 1999). Pod uticajem dijabetesa dokumentovano je manje povećanje odnosa masa organa/masa tijela za jetru i srce eksperimentalnih pacova (Ciobotaru *et al.*, 2008). Kako je dokazano da postoji veza između dijabetesa i zaraze ešerihijom kolii, pri epidemiji ešerihije ne smije se zanemariti značaj dijabetesa kao mogućeg komorbiditeta (Wiwanitkit, 2011).

Cilji istraživanja je da se u laboratorijskim uslovima ispita dejstvo intoksikacije olovo-acetatom i alloxan-om na Wistar pacove inficirane ešerihijom *Escherichia coli* intraperitonealnim ubrizgavanjem, nakon 24h i 72h. S druge strane pratio bi se uticaj olova na morfolometrijske karaktere unutrašnjih organa, jetre, srca, slezene, bubrega i testisa, pri čemu se očekuju značajne razlike kod indeksa navedenih organa i veća odstupanja ovih vrijednosti jedinki tretiranih olovom u odnosu na ostale grupe. Krvni parametri se mijenjaju pod uticajem oba tretmana, tako da je cilj odrediti njihove vrijednosti pri zajedničkom dejstvu (olovo-acetata i bakterijske infekcije). Kako se alloxan javlja u ljudskoj ishrani unošenjem proizvoda od bijelog brašna, neophodno je utvrditi njegov efekat na organizam u sadejstvu sa svakodnevno prisutnim toksinomolovom i biotoksinom ešerihijom. Ujedno, intraperitonealni unos većih subletalnih koncentracija alloxan-a izaziva *diabetes mellitus* tip 1 kod laboratorijskih pacova, čija incidencija u ljudskoj populaciji varira od 30 na 100.000 ljudi u Skandinaviji, do 2 na 100.000 ljudi u Japanu, pri čemu se očekuje povećanje broja oboljelih u urbanim područjima (King *et al.*, 1999). Iz tog razloga je neophodno utvrditi dejstvo olova na dijabetičare, čija je ujedno podložnost infekcijama znatno veća nego kod zdravih ljudi. Bakterijska infekcija i *diabetes mellitus* tip 1 utiču na cjelokupno zdravstveno stanje jedinki, tako da je jedan od ciljeva rada uočiti njihovo zajedničko dejstvo na vrijednosti krvnih parametara, kao i na morfološke karaktere unutrašnjih organa. Objedinjavanjem toksikanata i bakterijske infekcije (kod četvrte grupe eksperimentalnih jedinki) utvrdiće se njihov zajednički uticaj na morfolometrijske i hematološke parametre Wistar pacova. Dobijeni podaci imaće značaj u budućim istraživanjima iz ekotoksikologije i ekologije uopšte i doprinijeće boljem razumijevanju uticaja bakterijske infekcije na jedinke kopnenih ekosistema. Analitičko-statistički pristup daće uvid u korelaciju dužine izlaganja infekciji sa promjenama pojedinih hematoloških i morfolometrijskih parametara, a takode će poslužiti za procjenu nivoa uticaja ovih faktora na zdravstveno stanje ispitivanih jedinki.

➤ Materijal i metod rada

Albino laboratorijski pacov bijelog krzna i crvenih očiju je najčešće korišćena laboratorijska životinja zadnjih nekoliko decenija. Predstavlja izuzetno važan životinjski model za brojna istraživanja iz psihologije, medicine, fiziologije, ekologije i drugih oblasti. Ovaj soj pripada vrsti *Rattus norvegicus*, a dobijen je i uzgaja se u laboratorijama širom svijeta. Bijeli pacov je prvi put unesen u laboratoriju u istraživačke svrhe davne 1828. godine, da bi već nakon trideset godina preuzeo primat nad drugim eksperimentalnim životinjama. Domestikovani pacovi se razlikuju od divljih u mnogo čemu. Znatno su

mirniji, sa smanjenim nagonom za ujedanjem, mogu tolerisati veću grupu jedinki u gnijezdu, ranije postaju polno zreli i ranije se pare, proizvodeći veći broj potomstva. Njihovi unutrašnji organi: mozak, jetra, bubrezi, adrenalne žlijezde i sree su manji nego kod divljih populacija. *Wistar* pacovi albino tip predstavljaju nesrodnu „outbred“ liniju bijelih pacova dobijenu od divljih populacija vrste *Rattus norvegicus*. Ovaj soj je prvi put dobijen 1906. godine u Wistar institutu za biološka i medicinska istraživanja i predstavlja prvi soj pacova proizveden isključivo kao eksperimentalni model za brojna istraživanja. Do tada su većinom istraživanja vršena na običnom kućnom mišu *Mus musculus*. Danas je Wistar pacov jedan od najpopularnijih sojeva za laboratorijska istraživanja. Karakteriše ga široka glava, duge uši i dužina repa uvijek kraća od dužine tijela.

Eksperimentalni dio rada će biti proveden u Štali Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, na Wistar pacovima uzgojenim za tu svrhu. Koristiće se jedinke jednake starosti, približnih masa tijela, jednakih zastupljenosti polova. Jedinke će se držati u grupnim pleksiglas kavezima, na 12 časovnom režimu svjetlosti (07.00-19.00), temperaturi vazduha 22°C (±2), sa hranom (proizvod Veterinarskog zavoda Subotica, Subotica, Srbija) i vodom *ad libitum*. Početkom eksperimenta individue će biti odvojene u odgovarajuće testne i kontrolne grupe. Omogućiće im se period adaptacije u trajanju od 15 dana, nakon čega će se pristupiti tretmanu. Koristiće se bakterija *Escherichia coli*, soj ATCC 11755, u zapremini 0,2 ml i broju CFU 106. Broj bakterija će se odrediti spektrofotometrijski, određivanjem optičke gustine po standardizovanom postupku (Othman *et al.*, 2005 i Olandumoye, 2006). Ubrizgavanje će se vršiti intraperitonealno sterilnim iglama promjera 0,4 mm.

Tok eksperimenta

1. Faza:

- izdvajanje i adaptacija zdravih jedinki, podjela na kontrolnu i testnu grupu.
- intraperitonealno ubrizgavanje 0,2 ml rastvora (CFU 10⁶) *Escherichia coli* jedinkama oba pola testne grupe i fiziološkog rastvora jedinkama kontrolne grupe;
- žrtvovanje jedinki nakon 24 sata inkubacije;
- žrtvovanje preostalih jedinki nakon 72 sata inkubacije.

Pacovi koji su predviđeni samo za tretman bakterijom će biti podijeljeni u četiri grupe, pri čemu će kontrolna grupa predstavljati referentnu kontrolu i svim ostalim eksperimentalnim grupama. Grupe i oznake će biti sljedeće:

- a) K 24: zdrave jedinke kojima će se intraperitonealno ubrizgati fiziološki rastvor, nakon čega će se uzeti krv, izvršiti eutanazija i mjerenje (po isteku 24 sata);
- b) K 72: zdrave jedinke kojima će se intraperitonealno ubrizgati fiziološki rastvor, nakon čega će se uzeti krv, izvršiti eutanazija i mjerenje (po isteku 72 sata);
- c) E 24: zdrave jedinke kojima će se intraperitonealno ubrizgati rastvor *Escherichia coli*, nakon čega će se uzeti krv, izvršiti eutanazija i mjerenje (po isteku 24 sata);
- d) E 72: zdrave jedinke kojima će se intraperitonealno ubrizgati rastvor *Escherichia coli*, nakon čega će se uzeti krv, izvršiti eutanazija i mjerenje (po isteku 72 sata).

2. Faza:

- indukcija *diabetes mellitus* tip 1 Alloxan-om (intraperitonealno);
- kontrola nivoa glukoze u krvi (Accu Check) iz repne vene;
- intraperitonealno ubrizgavanje 0,2 ml rastvora (CFU 10⁶) *Escherichia coli* jedinkama oba pola testne grupe i fiziološkog rastvora jedinkama kontrolne grupe;
- žrtvovanje jedinki nakon 24 sata inkubacije;
- žrtvovanje preostalih jedinki nakon 72 sata inkubacije.

Eksperimentalnim jedinkama koje će poslužiti za posmatranje uticaja *diabetes mellitus* tip 1 na krvne i morfološke parametre, dijabetes će biti indukovao ALLOXAN MONOHYDRATE-om (Acros organics; New Jersey, USA). Protokol za eksperimentalno indukovano DM-Alloxan:

- pacovi će biti izmjereni i zabilježene njihove tjelesne težine.
- određiće se nivo šećera u krvi svake životinje prije početka eksperimenta.
- glikemija će se mjeriti dobijanjem krvi iz vene repa pomoću aparata za mjerenje glikemije ACCU CHECK, Roche.
- rastvor Alloxan-a će se dobiti rastvaranjem 100 mg praha u 10 ml fiziološkog rastvora.
- rastvor će se davati intraperitonealno u dozi 100 mg na kilogram tjelesne težine pacova.
- protokol će se ponavljati sve dok izmjerena vrijednost glikemije ne pređe 200mg/dcl kada se

- smatra da je životinja u hiperglikemiji.
- biće neophodna kontrola glikemije, jer uništavanje beta ćelija pankreasa Alloxan-om u navedenoj koncentraciji predstavlja reverzibilan proces.
 - hiperglikemija će se održavati do kraja eksperimenta.

Jedinke će biti podijeljene u sljedeće grupe:

- D-0 24: jedinke oba pola sa vještački izazvanim DM, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno fiziološki rastvor, a uzimanje krvi, žrtvovanje i mjerenje će se izvršiti 24 sata kasnije.
- D-0 72: jedinke oba pola sa vještački izazvanim DM, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno fiziološki rastvor, a uzimanje krvi, žrtvovanje i mjerenje će se izvršiti 72 sata kasnije.
- D-E 24: jedinke oba pola sa vještački izazvanim DM, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno rastvor *Escherichia coli*, a uzimanje krvi, žrtvovanje i mjerenje će se izvršiti 24 sata kasnije.
- D-E 72: jedinke oba pola sa vještački izazvanim DM, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno rastvor *Escherichia coli*, a uzimanje krvi, žrtvovanje i mjerenje će se izvršiti 72 sata kasnije.

3. Faza:

- petnaestodnevna intoksikacija jedinki olovo-acetatom u koncentraciji od 1500 ppm putem vode *ad libitum*;
- intraperitonealno ubrizgavanje 0,2 ml rastvora (CFU 10^6) *Escherichia coli* jedinkama oba pola testne grupe i fiziološkog rastvora jedinkama kontrolne grupe;
- žrtvovanje jedinki nakon 24 sata inkubacije;
- žrtvovanje preostalih jedinki nakon 72 sata inkubacije.

Jedinke obuhvaćene ovim tretmanom biće podijeljene u sljedeće grupe:

- K-0 24: jedinke oba pola pojene olovo-acetatom, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno fiziološki rastvor. Uzorkovanje krvi, eutanazija i mjerenje će se izvršiti 24 sata kasnije.
- K-0 72: jedinke oba pola pojene olovo-acetatom, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno fiziološki rastvor, uzorkovanje krvi, eutanazija i mjerenje će se izvršiti 72 sata kasnije.
- E-0 24: jedinke oba pola pojene olovo-acetatom, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno rastvor *Escherichia coli*. Uzorkovanje krvi, eutanazija i mjerenje će se izvršiti 24 sata kasnije.
- E-0 72: jedinke oba pola pojene olovo-acetatom, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno rastvor *Escherichia coli*. Uzorkovanje krvi, eutanazija i mjerenje će se izvršiti 72 sata kasnije.

4. Faza:

- petnaestodnevna intoksikacija jedinki olovo-acetatom u koncentraciji od 1500 ppm putem vode *ad libitum* uz istovremenu indukciju *diabetes mellitus* tip 1 Alloxan-om (intraperitonealno);
- kontrola nivoa glukoze u krvi (Accu Check) iz repne vene;
- intraperitonealno ubrizgavanje 0,2 ml rastvora (CFU 10^6) *Escherichia coli* jedinkama oba pola testne grupe i fiziološkog rastvora jedinkama kontrolne grupe;
- žrtvovanje jedinki nakon 24 sata inkubacije;
- žrtvovanje preostalih jedinki nakon 72 sata inkubacije.

Jedinke obuhvaćene ovim tretmanom biće podijeljene u sljedeće grupe:

- Pb-D-0 24 jedinke oba pola pojene olovo-acetatom, sa vještački izazvanim DM, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno fiziološki rastvor. Uzorkovanje krvi, eutanazija i mjerenje će se izvršiti 24 sata kasnije.
- Pb-D-0 72 jedinke oba pola pojene olovo-acetatom, sa vještački izazvanim DM, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno fiziološki rastvor. Uzorkovanje krvi, eutanazija i mjerenje će se izvršiti 72 sata kasnije.
- Pb-D-E 24 jedinke oba pola pojene olovo-acetatom, sa vještački izazvanim DM, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno rastvor *Escherichia coli*. Uzorkovanje krvi, eutanazija i

- mjerjenje će se izvršiti 24 sata kasnije.
- d) Pb-D-E 72 jedinice oba pola pojene olovo-acetatom, sa vještački izazvanim DM, kojima će se 15-ti dan ubrizgati intraperitonealno rastvor *Escherichia coli*. Uzorkovanje krvi, eutanazija i mjerjenje će se izvršiti 72 sata kasnije.

Životinje će se, prije uzimanja krvi, anestezirati ketaminom koncentracije 50 mg/kg (Ketaminol 10 100ml/mg. Intervet, razrijeđen fiziološkim rastvorom u omjeru 1:10). Ketamin je jak anestetik, koji blokira provođenje impulsa bola do talamusnog i kortikalnog područja (Green *et al.*, 1981). Anestetik će se ubrizgavati intramuskularno, u zapremini određenoj prema masi jedinice, sterilnim iglama promjera 0,4 mm. Po anesteziranju (15-20 minuta od aplikacije) uzimaće se krv eksperimentalnim jedinkama kardijalnom punkcijom, u sterilnim uslovima, iglom promjera 1.2 mm i špricom zapremine 2 ml. Krv će se odlagati u vakutenere sa antikoagulansom K₂EDTA.

Određivaće se slijedeći hematološki parametri:

- Broj eritrocita /l krvi,
- Broj leukocita /l krvi,
- Hematokrit (odnos uobičajenih krvnih elemenata i krvne plazme),
- Koncentracija hemoglobina,
- MCV (srednja vrijednost zapremine eritrocita),
- MCH (srednja vrijednost količine hemoglobina u eritocitu),
- MCHC (srednja vrijednost hemoglobina u litri eritrocita) i
- Diferencijalna krvna slika.

Broj uobičajenih elemenata krvi će se određivati metodom brojanja u Thoma komori (Ivanc i Dekić, 2006) uz korištenje odgovarajućih rastvora (Hayem-ov rastvor, Türk-ov rastvor). Hematokrit će se određivati mikrometodom pomoću kapilarnih cjevčica. Koristiće se hematokrit centrifuga sa čitačem (5 minuta na 16000 rpm) i heparisane cjevčice (Ivanc i Dekić, 2006). Koncentracija Hgb će se određivati metodom po Drabkin-u po standardizovanom postupku, uz kolorimetar (Colorimetar 254) i Drabkin-ov reagens (Ivanc i Dekić, 2006). Hematološki indeksi (MCV, MCH, MCHC) će se odrediti računski po standardnim formulama (Ivanc i Dekić, 2006). Diferencijalna krvna slika će biti određena pravljjenjem razmaza bojenih metodom po Pappenheim-u (kombinovano bojenje po May-Grünwald-u i Giemsa-i). Gotovi preparati će se mikroskopirati pomoću imerzionog objektiva i imerzionog uljaradi diferenciranja elemenata (Ivanc i Dekić, 2006).

U skladu sa uputama etičkih komisija i komiteta za brigu o laboratorijskim životinjama sve jedinice će biti žrtvovane dekapacijom pod dubokom anestezijom („Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ 1996, National Academy Press, Washington, D.C.). Sve jedinice će biti žrtvovane u jutarnjim časovima, u periodu od 08.00-10.00, kako bi se izbjegle moguće varijacije dobijenih rezultata.

Masa i dužina jedinki će biti izmjerene pod dubokom anestezijom. Težina jedinki u gramima će se određivati na tehničkoj vagi, a dužina jedinki u milimetrima pomoću mjerne trake. Potom će se pristupiti žrtvovanju jedinki. Unutrašnji organi (srce, jetra, bubrezi, slezena i testisi) će biti izvađeni u što kraćem vremenskom periodu, obrađeni i fiksirani.

Organosomatski indeksi predstavljaju odnos ukupne mase tijela u odnosu na masu određenog organa (Busacker i sar., 1990).

$$OSI = \frac{\text{masa organa (g)}}{\text{totalna masa tijela (g)}} \times 100$$

Koeficijent srca - cardiosomatic index (CSI), predstavlja odnos mase srca i totalne mase tijela. Može se predstaviti formulom :

$$CSI = \frac{\text{masa srca (g)}}{\text{totalna masa tijela (g)}} \times 100.$$

Koeficijent slezine – spleensomatic index (SSI), predstavlja odnos mase slezine i mase tijela jedinke (Barber i Blake, 2006).

$$SSI = \frac{\text{masa slezine (g)}}{\text{totalna masa tijela (g)}} \times 100$$

Koeficijent gonada – gonadosomatic index (GSI), predstavlja odnos mase gonada i mase tijela jedinke.

$$GSI = [\text{masa gonada (g)} / \text{totalna masa tijela (g)}] \times 100.$$

Koeficijent jetre – liversomatic index (LSI), predstavlja odnos mase jetre i mase tijela jedinke.

$$LSI = [\text{masa jetre (g)} / \text{totalna masa tijela (g)}] \times 100.$$

Svi rezultati istraživanja će biti analizirani softverski u Office Excel 2010 pomoću parametara: srednja vrijednost, minimum, maksimum, standardna devijacija i standardna greška. Podaci će biti međusobno upoređeni Studentovim t-testom sa minimalnom statistički značajnom razlikom od $p < 0,05$. Svi rezultati istraživanja će biti obrađeni pomoću statističkih paketa SPSS 13.0 i Microsoft Office Excel 2010. Za poređenje vrijednosti praćenih parametara pojedinačnih uzoraka koristiće se ANOVA i LSD test. SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Prilikom obrade podataka koristiće se nivo pouzdanosti od 95 %. Za procjenu se koriste vjerovatnoće od 95 % i 99 %, s tim da se u praksi najčešće koristi nivo pouzdanosti od 95 %, jer omogućuje istovremeno postizanje visoke pouzdanosti i relativno precizne procjene (Koprivica, 2001).

➤ Naučni doprinos istraživanja

Naučni doprinos ovog istraživanja ogleda se u dobijanju novih saznanja iz sfere ekotoksikologije, odnosno efekata pojedinih abiotičkih i biotičkih toksikanata na žive organizme. Poseban doprinos manifestovaće se u analizi djelovanja kako pojedinih toksičnih materija, tako i njihovog zajedničkog dejstva. U tom smislu, posebno će se pratiti mehanizmi kako njihovog eventualnog sinergističkog djelovanja tako i reaktivno-odbrambenih aktivnosti samog organizma na jedan odnosno više različitih stresora (olovo-acetat, alloxan i biotoksini *Escherichia coli*).

➤ Prilog: citirana literatura

1. Abdel-Monei, A.E., Dkhi1, M.A., Al-Quraishy, S. (2011): **The potential role of flaxseed oil on lead acetate-induced kidney injure in adult male albino rats**. African Journal of Biotechnology Vol. 10(8), pp. 1436-1451, 21 February, 2011. ISSN 1684-5315 © 2011.
2. al Herbish, A.S., al Rasheed, S.A. (1992): **Persistent insulin-dependent diabetes mellitus in hemolytic uremic syndrome**. Child Nephrol Urol.;12:59-61.
3. Al-Ashban, R.M., Aslam, M., Shah, A.H. (2004): **Kohl (surma): A toxic traditional eye cosmetics study in Saudi Arabia**. Public Health 118 (4): 292-298.
4. AMAP (1998): **AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Issues**. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP). Oslo, Norway.
5. AMAP (2001): **AMAP Assessment Report: Heavy Metals, Fact Sheet 3**, Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP). Oslo, Norway.
6. Anonimus (1996): „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, National Academy Press, Washington, D.C.
7. Askin, D.P., Volkman, M. (1997): **Effect of personal hygiene on blood lead levels of workers at a lead processing facility**. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 58 (10), 752-753.

8. ATSDR (2005): **Draft toxicological profile for lead**. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.
9. Badr G. (2012): **Supplementation with undenatured whey protein during diabetes mellitus improves the healing and closure of diabetic wounds through the rescue of functional long-lived wound macrophages**. *Cell Physiol Biochem*. 2012, 29:571-582.
10. Barber, B. J., Blake, N. J. (2006): **Reproductive physiology**. In: S. E. Shumway & G. J. Parsons, editors. *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science 35*. New York: Elsevier Sciences, pp. 357-416.
11. Brigham, K. L., Meyrick, B. (1986): **Endotoxin and lung injury**. *Am Rev Respir Dis*. 133(5):913-27.
12. Busaeker, G. P., Adelman, I. R., Goolish, E. M. (1990): **Growth**. In *Methods for Fish. Biology* (Schreck, C. B. & Moyle, P. B., eds), pp. 363-387. Bethesda, MD: American Fisheries Society.
13. CDC (1991): **Preventing lead poisoning in children**. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta.
14. Ciobotaru, E., Militaru, M., Braslasu, C.M., Braslasu, E.D., Soare, T., Joita, S., Dinescu, G. (2008): **Gravimetric and morphometric assessments in Wistar rats with experimental diabetes mellitus type 1 and cardiac failure**. *Acta Veterinaria*. Vol. 58, No. 5-6, 583-592, 2008, Beograd.
15. Čupić, V.N. (1999): **Najčešća trovanja u veterinarskoj medicini**. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, 7-35, 115-117.
16. Egan, J. W., Jugus, M., Kinter, L. B., Lee, K., Smith, E. F. 3rd (1989): **Effect of selective V1 vasopressin receptor antagonist on sequelae of endotoxemia in the conscious rat**. *Circ. Shock*, Oct; 29(2): 155-66.
17. Eizirik, D. L., Pipeleers, D. G., Ling, Z., Welsh, N., Hellerström, C., Andersson, A. (1994): **Major Species Differences between Humans and Rodents in the Susceptibility to Pancreatic β -Cell Injury**. *PNAS U S A* 91(20): 9253-9256. doi:10.1073/pnas.91.20.9253. PMID 7937750.
18. Erve, P. R., Shuler, J. J., Schumer, W. (1978): **Endotoxin-challenged monkey and rats**. *Arch. Surg*, May; 113, 5, 561-564.
19. Goodman, M. L., Way, B. A., Irwin, J. W. (1979): **The inflammatory response to endotoxin**. *J. Patholol.*; 128, 1: 7-14.
20. Goyer, R.A. (1993): **Lead toxicity: Current concerns**. *Environmental Health Perspectives*, 100, 177-187.
21. Green, C. J., Knight, J., Precious, S., Simpkin, S. (1981): **Ketamin alone and combined with diazepam or xynazine in laboratory animals: A 10 years experience**. *Lab. Anim.* 15, 163-170. In Fish, R., Danneman, J. P., Brown, M., Karas, A. (Eds.), *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. Second edition. American Collage of laboratory animals medicine
22. Han, S., Li, W., JAMIL, U., Dargan, K., Orefice, M., Kemp, F.W., Bogden, J.D. (1999): **Effects of Weight Loss and Exercise on the Distribution of Lead and Essential Trace Elements in Rats with Prior Lead Exposure**. Department of Preventive Medicine and Community Health, UMDNJ-New Jersey Medical School, Newark, New Jersey, USA.
23. Hawes, A. S., Fischer, E., Marano, M. A., Van Zee, K. J., Rock, C. S., Lowry S. F., Calvano, S. E., Moldawer, L. L. (1993): **Comparison of peripheral blood leukocyte kinetics after live *Escherichia coli*, endotoxin, or interleukin-1 alpha administration. Studies using a novel interleukin-1 receptor antagonist**. *Ann Surg.* 218(1):79-90.
24. Henrich, J. H. (2000): **History, strains and models**. In Krinke J. G. (Ed.), *The handbook of experimental animals. The laboratory rat*. Chapter 1
25. Ivanc, A., Dekić, R. (2006): **Praktikum opšte fiziologije životinja**. Prirodno-matematički fakultet, Banja Luka.
26. Jablanović, M., Jakšić, P., Kosanović, K. (2003): **Uvod u ekotoksikologiju**. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Prištini, Kosovska Mitrovica, 30-39.
27. Järup, L. (2003): **Hazards of heavy metal contamination**, *British Medical Bulletin*, Vol. 68, 167-182. Oxford University Press, Oxford.
28. Jhon, L. R. (1997): **Medical Immunology**. Chapter 48, page, 684.
29. Kastori, R. (1993): **Teški metali i pesticidi u zemljištu**. Poljoprivredni fakultet: Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.
30. Kastori, R. (1997): **Teški metali u životnoj sredini**. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.
31. King, H., Aubert, R.E., Herman, W.H. (1999): **Global burden of diabetes, 1995-2025**.

- Prevalence, numerical estimates and projections. In: *Int. Diabetes Monitor*, 11:15-16
32. Kitajima, S., Tsuda, M., Eshida, N., Matsushima, Y., Saitoh, M., Momma, J., Kurokawa, Y. (1995): **Lipopolysaccharide-associated elevation of serum and urinary nitrite/nitrate levels and hematological changes in rats.** *Toxicol. Lett.*, 78, 2: 135-140.
 33. Koprivica, M. (2001): **Statistički uzorci.** skripta. Beograd, 2001.
 34. Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Väisänen-Rhen, V., Finne, J., Orsakov, F., Orsakov, I., Svenson, S. B., Mäkelä, P. H. (1985): **Serotypes, Hemolysin Production, and Receptor Recognition of *Escherichia coli* Strains Associated with Neonatal Sepsis and Meningitis.** *Infection and Immunity*, p. 486-491.
 35. Kosumi, T., Usui, N., Kubota, A., Hoki, H., Yamauchi, K., Nogami, T., Ohyanagi, H., Yonekura, T., Hirooka, S., Kakinoki, S., Kaetu, I. (2001): **Application of a drug delivery system in a novel rats model of chronic hyperendotoxemia.** *Pediatr. Surg. Int.*, 17, 4: 321-325.
 36. Kranz, B.D. *et al.* (2004): **The behavior and routes of lead exposure in pregrasping infants.** *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 14: 300-311.
 37. Lagerkvist, B.J., Landberg, S., Fred, W. *et al.* (1996): **Is placenta a good indicator of cadmium and lead exposure.** *Arch Environ Health*, 51, 5, 389-394.
 38. Lenzen, S. (2008): **The Mechanisms of Alloxan- and Streptozotocin-induced Diabetes.** *Diabetologia* 51 (2): 216-226. PMID 18087688.
 39. Lidzky T.I., Schneider J.S. (2003): **Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates.** *Oxford Journal. Medicine, Brain*: Vol. 126, Iss. 1, 5-19. Oxford.
 40. Martindale, J., Stroud, D., Moxon, F. R., Tang, C. M. (2000): **Genetic analysis of *Escherichia coli* K1 gastrointestinal colonization.** *Molecular Microbiology* 37(6), 1293-1305.
 41. Modrall, J., Pokras, M. (2010): **Lead Poisoning: The Lessons of the Birds of Esperance.** *Animal Welfare Institute Quarterly*, Vol. 59, Num. 4, 10-13. Washington DC.
 42. Mornjaković Z., Kadić, M., Šuško, I. (2000): **Uticaj olova na neke reproduktivne odlike i potomstvo kod primigravidnih Wistar pacova.** *Veterinaria* 49, Veterinarski fakultet, Sarajevo, 3 - 4, 333 - 341.
 43. Mornjaković, Z. (1994): **Uticaj olovnog acetata na neke kvalitativne i kvantitativne karakteristike mamarnih mastocita kod primigravidnih pacova.** *Med. Arch.* 48 (1 - 2), 13 - 16.
 44. Mornjaković, Z., Nešić, L.J., Kadić, M. (1995): **Uticaj olovnog acetata na neke kvalitativne i kvantitativne karakteristike mamarnih mastocita kod pacova dojilja.** *Medicinski arhiv*, 49 (3 - 4), 71 - 74.
 45. Mortada, W.J., Sobh, M.A., El-Defrawy, M.M., Farahat, S.E. (2001): **Study of lead exposure from automobile exhaust as a risk for nephrotoxicity among traffic policemen.** *American Journal of Nephrology*, 21: 274-9.
 46. Mroziakiewicz A., Kielezewska-Mroziakiewicz D., Lowicki Z., Chmara E., Korzeniowska K., Mroziakiewicz P.M. (1994): **Blood levels of alloxan in children with insulin-dependent diabetes mellitus.** *Acta Diabetol.* 1994 Dec;31(4):236-7.
 47. Muhammad, N.O., Akolade, J.O., Usman, L.A., Oloyede, O.B. (2011): **Haematological parameters of Alloxan-induced diabetic rats treated with leaf essentials oil of *Hoslundia opposita* (Vahl).** *EXCLI Journal* 2012;11:670-676 - ISSN 1611-2156.
 48. Neathery, M.W., Miller, W.J. (1975): **Metabolism and Toxicity of Cadmium, Mercury and Lead in Animals: A Review.** *Journal of Dairy Science*, Vol. 58, Issue 12, Pages 1676-1781.
 49. Ngeleka, M., Martineau-Doize, B., Fairbrother, J. M. (1993): **Septicemia-Inducing *Escherichia coli* O115:K"V165" F1651 Resists Killing by Porcine Polymorphonuclear Leukocytes In Vitro: Role of F1651 Fimbriae and K"V165" O-Antigen Capsule.** *Infection and Immunity*, p. 398-404.
 50. Noori Mugahi, M.H., Heidari, Z., Sagheb, H.M., Barbarestani, M. (2003): **Effects of chronic lead acetate intoxication on blood indices of male adult rat.** *DARU* Vol. 11, No.4, 147-151.
 51. Nriagu, J.O., Paeyna, J.M. (1988): *Nature* 333, 134-139.
 52. Oladunmoye, M. K. (2006): **Immunostimulatory Activity of Ethanolic Leaf Extract from *Ocimum gratissimum* in Albino Rat Orogastrically Dosed with *Escherichia coli* (NCIB 86).** *Journal of Pharmacology* 1 (4) 389-394.
 53. Orsakov, I., Orsakov, F. (1985): ***Escherichia coli* in extra-intestinal infection.** *J. Hyg. Camb.*, 95, 551-575.
 54. Othman, A., Al Sagair, Ezzat S., El Daly, Ahmed A., Mousa (2006): **Influence of Bacterial Endotoxins on Bone Marrow and Blood Components in Rats.** *Saudi Journal of Biological Sciences* 13 (2) 163-177.
 55. Pacheco, P., Bozza, F. A., Gomes, R. N., Bozza, M., Weller, P. F., Castro-

- Faria-Neto, H. C., Bozza, P. (2002): **Lipopolysaccharide-Induced Leukocyte Lipid Body Formation In Vivo: Innate Immunity Elicited Intracellular Loci Involved in Eicosanoid Metabolism**. *The Journal of Immunology* 169: 6498-6506.
56. Pacyna, J.M., Pacyna, E.G. (2001): **An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide**. *Environ. Rev.* 9, 269-298.
57. Pearson, J. M., Schulze, A. E., Jean, P. A., Roth, R. A. (1995): **Platelet participation in liver injury from gram-negative bacterial lipopolysaccharide in the rat**. *Shock*, 4, 3: 178-186.
58. Plos, K., Conneli, H., Jodal, U., Marklund, B., Maild, S., Wettergren, B. (1995): **Intestinal carriage of P fimbried *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children**. *J.Infect. Immun.* 39: 599-699.
59. Robitaille P, Gonthier M, Grignon A, Russo P. (1997): **Pancreatic injury in hemolytic-uremic syndrome**. *Pediatr Nephrol.* 1997;11:631-2.
60. Rojas, M., Woods, C. R., Mora, A. L., Xu, J., Brigham, K. L. (2004): **Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses**. Division of Pulmonary, Allergy and Critical Care, Center for Translational Research of the lung, McKelvey Center for Lung Transplantation, Department of Medicine, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia.
61. Sarff, L. D., McCracken, J. R., Schiffer, M. S., Glode, M. P., Robbins, J. B., Orsakov, I., Orsakov, F. (1975): **Epidemiology of *Escherichia coli* K1 in healthy and diseased newborns**. *Lancet* I: 1099-1104.
62. Seddik, L., Bah, T.M., Aoues, A., Benderdour, M., Slimani, M. (2010): **Dried Leaf Extract Protects against Lead-Induced Neurotoxicity in Wistar Rats**. *European Journal of Scientific Research*, pp.139-151.
63. Sekulić, P., Kastori, R., Hadžić, V. (2003): **Zaštita zemljišta od degradacije**. Naučni institut za ratarstvo i povrtlarstvo, Novi Sad.
64. Sengar, R.S., Gautam, M., Sengar, R.S., Garg, S.K., Sengar, K., Chaudhary, R. (2008): **Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants**. *Rev. Environ.Contam. Toxicol.* 196: 73-93.
65. Silbergeld, E.K. (1983): **Effect of lead on reproduction**. Review of experimental studies. Lead versus health. Ed. M. Rutter and K. Russel Jones. John Wiley and sons LTD. 217-227.
66. Silbergeld, E.K. (1986): **Maternally mediated exposure of the fetus: In utero exposure to lead and other toxins**. *Neurotoxicology*, 7, 557-568.
67. Soodi, M., Naghdi, N., ShariFzadeh, M., Ostad, S.N., Abdollahi, M. (2008): **Effect of Lead (Pb²⁺) Exposure in Female Pregnant Rats and Their Offspring on Spatial Learning and Memory in Morris Water Maze**. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (1), 43-51.
68. Steenland K, Boffetta P. (2000): **Lead and cancer in humans: where are we now?** *American Journal of Industrial Medicine*: 38: 295-9.
69. Strömberg, U. *et al.* (2003): **Yearly measurements on blood lead in Swedish children since 1978: an update focusing on the petrol lead free period 1995 – 2001**. *Occupational and Environmental Medicine* 60: 370-372.
70. Sudip, D., Stafford, R., Deb Roy, M.K., Bhattacharjee, C.R., Khathing, D.T., Bhattacharjee, P.C., Dkhar, P.S. (1999): **Metal toxicity and trace element deficiency in some wild animal species from north-east India, as revealed by cellular, bio-inorganic and behavioural studies**. *Current Science*, Vol.77, Num. 2, 276-280, Bangalore, India.
71. Suri, R.S., Clark, W.F., Barrowman, N., Mahon, J.L., Thiessen-Philbrook, H., Rosas-Arellano, M.P. *et al.* (2005): **Diabetes during diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: A systematic review and meta-analysis**. *Diabetes Care*, 28:2556-62.
72. Suri, R.S., Mahon, J.L., Clark, W.F., Moist, L.M., Salvadori, M., Garg, A. (2009): **Relationship between *Escherichia coli* O157:H7 and diabetes mellitus**. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health, Kidney Int Suppl.* Feb;(112):S44-6.
73. Taylor, C.M., White, R.H., Winterborn, M.H., Rowe, B. (1986): **Haemolytic-uraemic syndrome: Clinical experience of an outbreak in the West Midlands**. *Br Med J (Clin Ed)*:292:1513-6.
74. Tedeschi, S. (1990): **Surface and groundwater use in the urban area of Zagreb**. Hydrological Processes and Water Management in Urban Areas (Proceedings of the Duisberg Symposium, April 1988), IAHS Publ. no. 198.
75. Tenjović, L. (2000): **Statistika u psihologiji**, priručnik, Beograd.

76. Todd, A.C., Wetmur, J.G., Moline, J.M. *et al.* (1996): **Unraveling the chronic toxicity of lead-an essential priority for environmental health.** Environ Health Perspect. 141-146.
77. Fong, S., von Schirnding, Y.E., Prapamontol, T. (2000): **Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions.** Review, Bull World Health Organisation, 78: 1068-77.
78. Truhaut, R. (1977): **Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives.** Ecotoxicology and Environmental Safety 1: 157-173.
79. Tsukada, K., Katoh, H., Shiojima, M., Suzuki, T., Takenoshita, S., Nagamachi, (1993): **Increased plasma endothelin-1 concentrations in E.coli septic peritonitis rats with diabetes mellitus.** Exp Clin Endocrinol.:101:315-8. [PubMed: 8299709]
80. Tyrberg, B., Andersson, A., Borg, L. A. (2001): **Species Differences in Susceptibility of Transplanted and Cultured Pancreatic Islets to the β -Cell Toxin Alloxan.** General and Comparative Endocrinology 122 (3): 238-251. doi:10.1006/gcen.2001.7638. PMID 11356036.
81. van Lambalgen, A. A., Rasker M. T., van den Bos, G. C., Thijs, L. G. (1988): **Effects of endotoxemia on systemic plasma loss and hematocrit in rats.** Microvasc. Res,36, 3: 291-304.
82. Vuković, N., Vukmirović, D., Radojčić, Z. (1999): **SPSSPraktikum.** UniverzitetuBeogradu, Fakultetorganizacionihnauka, Laboratorijazastatistiku, Beograd.
83. WHO. (1995): **Lead. Environmental Health Criteria.** vol. 165. World Health Organization, Geneva.
84. Wiwanitkit, V. (2011): **Outbreak of *Escherichia coli* and diabetes mellitus.** Indian Journal of Endocrinology and Metabolism. July: 15(Suppl1): S70-S71.
85. Odukoya, A.M., Abimbola, A.F. (2010): **Contamination assessment of surface and groundwater within and around two dumpsites.** Int. J. Environ. Sci. Tech., 7 (2), 367-376.

3. OCJENA I PRIJEDLOG

Na osnovu svega prethodno izloženog Komisija smatra da kandidat mr Maja Manojlović ispunjava sve Zakonom predviđene uslove za izradu prijavljene doktorske teze.

S obzirom na veći broj objavljenih naučnih radova, štampanih u cjelini, iz oblasti ekotoksikologije, uspješno odbranjen magistarski rad, kao i učešće u projektima sa srodnom problematikom, mišljenja smo da kandidat posjeduje odgovarajuće naučne kvalifikacije da pristupi izradi navedene doktorske teze.

Predložena istraživanja su aktuelna i naučno opravdana, a rezultati koji se očekuju će doprinijeti boljem poznavanju toksikološkog uticaja olova, alloxan-a i ešerihije na žive sisteme.

Realizacija jasno definisanih ciljeva navedenih u Prijavi teme za izradu ove doktorske teze, na osnovu predstavljenih opravdanih hipoteza, primjene predviđenih adekvatnih savremenih i naučno zasnovanih metoda, a na bazi prikazanog dobro razrađenog plana, će nesumnjivo dovesti do novih saznanja iz ove istraživačke problematike i pružiti višestruki naučni doprinos.

Zbog svega prethodno navedenog, Komisija je saglasna u ocjeni da je tema „Ekotoksikološka istraživanja intoksikacije olovo-acetatom i alloxan-om Wistar pacova inficiranih ešerihijom (*Escherichia coli*)“ podobna za izradu doktorske teze, kao i da je kandidat mr Maja Manojlović podobna za izradu iste.

Komisija predlaže Vijećima studijskih programa Biologija, Ekologija i zaštita životne sredine, Naučno-nastavnom Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta u Banjoj Luci i Senatu Univerziteta u Banjoj Luci da prihvate ovaj Izveštaj i odobre izradu navedene doktorske teze.

POTPIS ČLANOVA KOMISIJE

1. Dr Dragojla Golub, docent, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, predsjednik

2. Dr Ivica Radović, redovni profesor, Fakultet bezbednosti Univerziteta u Beogradu, član

3. Dr Radoslav Dekić, docent, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, član

IZDVOJENO MIŠLJENJE: Član komisije koji ne želi da potpiše izvještaj jer se ne slaže sa mišljenjem većine članova komisije, dužan je da unese u izvještaj obrazloženje, odnosno razloge zbog kojih ne želi da potpiše izvještaj.