

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Dina M. Tucović

**EFEKTI ORALNOG UNOSA KADMIJUMA NA  
IMUNSKI SISTEM KOŽE PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Dina M. Tucović

**EFFECTS OF ORAL CADMIUM INTAKE ON  
SKIN IMMUNE SYSTEM IN RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

## **MENTORI:**

**Dr Aleksandra Popov Aleksandrov,**

viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

**Dr Milena Kataranovski,**

redovni profesor u penziji, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu  
naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

## **ČLANOVI KOMISIJE:**

**Dr Aleksandra Popov Aleksandrov,**

viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

**Dr Milena Kataranovski,**

redovni profesor u penziji, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu  
naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

**Dr Katarina Veljović,**

viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

*Posvećeno mojim dragim roditeljima, Miodragu i Biljani, i supргу Mihailu. Hvala vam što moj život ispunjavate topline, ljubavlju i smehom, i što ste uvek verovali u mene.*

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na odeljenju za Ekologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, u okviru projekta #173039, pod rukovodstvom dr Milene Kataranovski i dr Aleksandre Popov Aleksandrov.

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

-*Dr Mileni Kataranovski*, pre svega na ukazanom poverenju i prilici da postanem deo ovog divnog tima. Hvala vam što ste me uveli u prelepi svet imunologije, na nesebičnom deljenju znanja, konstantnoj motivaciji i konstruktivnim kritikama, koje su uvek imale za cilj da izvuku ono najbolje od mene.

-*Dr Aleksandri Popov Aleksandrov*, za bezgraničan trud i posvećenost, od mojih prvih koraka u naučnim istraživanjima do kraja izrade ove doktorske disertacije. Hvala na podršci i savetima uz koje je bilo mnogo lakše i lepše doći do cilja.

-*Dr Ivani Mirkov, Jeleni Kulaš, Milici Zeljković i Dušanki Popović* na srdačnosti i nesebičnoj pomoći u eksperimentalnoj izradi ove teze. Hvala što ste svaki radni dan učinile zanimljivim, kreativnim i nasmejanim.

-*Dr Katarini Veljović* koja je omogućila primenu komensalne bakterije *S. epidermidis* u ovoj studiji i koja je svojim stručnim znanjem i sugestijama doprinela izradi ove doktorske disertacije.

-*Dr Vesni Suboti* na analizi akutno-faznih proteina u perifernoj krvi.

-*Dr Lidiji Zolotarevski* na histopatološkoj analizi tkiva kože i uha.

-*Dr Jeleni Mutić, Vesni Vukojević i Slađani Đurđić* na određivanju koncentracije kadmijuma i drugih metala u organima i tkivima.

Zahvaljujem se i svim kolegama iz lab. 66, *Suzi, Nedi, Bokiju, Tamari S., Ivani S., Đorđu, Milici V., Milici L., Dragici, Ivanu, Milji, Tamari K., Dijani, Ceci, Blagoju, Sanji J., Neli, Sanji i Milanu* na prijatnoj atmosferi, druženju i što su mi pomogli u svakoj situaciji.

# EFEKTI ORALNOG UNOSA KADMIJUMA NA IMUNSKI SISTEM KOŽE PACOVA

## SAŽETAK

Štetni uticaji sredinske izloženosti kadmijumu (Cd), koji se odražavaju na različite organe, sve se više prepoznaju. Iako je poznato da topikalna primena Cd može uticati na vijabilnost ćelija kože, gotovo da nema podataka o efektu Cd na homeostatske procese ovog tkiva, uključujući efekte na imunski sistem kože, naročito nakon oralnog unosa. Efekti produženog izlaganja (30 dana) sredinski bitnim dozama Cd (5 i 50 ppm), ispitani su kod Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO) pacova, koji se razlikuju u imunskom odgovoru na različite stimulse. Pored efekta Cd na oksidativnu i imunsku/inflamatornu aktivnost kože, ispitana je reaktivnost kože na dodatni stimulus, dinitrochlorobenzen (DNCB) u reakciji kontaktne preosetljivosti. Uprkos sličnom deponovanju Cd u koži/ćelijama kože, kod DA soja već na 5ppm Cd zapaženo je oštećenje tkiva i veći intenzitet/različit obrazac oksidativnog i imunskog odgovora, ukazujući na veću osetljivost ovog soja na dermatotoksične efekte Cd. Iako su EĆ oba soja razvile stres odgovor na prisustvo Cd, intenzivniji antioksidativni odgovor (povećanje GSH, viša ekspresija gena za MT-1 i -2, proteina za Nrf2, kao i ekspresije gena AHR puta) uz prisustvo apoptoze samo kod AO soja, ukazuje na bolju sposobnost zaštite ovog soja od štetnog efekta Cd. Proinflamatorni odgovor zapažen je samo kod EĆ DA soja (povećanje IL-1 $\beta$ , TNF i IL-6), a povećanje IL-10 kao potencijalnog mehanizma zaštite kod AO soja. Ipak, nakon topikalne primene DNCB razvija se inflamatorni odgovor kod oba soja, sugerišući da se kod AO pacova probijaju zaštitni mehanizmi koji su se održavali nakon primene samog Cd (makar na 50 ppm Cd). Ova studija može biti korisna prilikom ispitivanja veze oralnog unosa Cd i različite osetljivosti kože na razvoj zapaljenskih reakcija i patoloških stanja.

**Ključne reči:** Oralni unos kadmijuma, DA i AO pacovi, imunski sistem kože, epidermne ćelije, dermatotoksičnost, reakcija kontaktne preosetljivosti

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Imunobiologija

**UDK broj:** [612.3+546.48]:[611.778+612.112](043.3)

## EFFECTS OF ORAL CADMIUM INTAKE IN SKIN REACTIVITY IN RATS

### ABSTRACT

Harmful effects of environmental Cd exposure, which affect different organs, are being increasingly recognized. Although it is known that topical Cd administration may affect skin cell viability, there is a paucity of data concerning Cd effect on the homeostatic processes of this tissue, including effects on the skin's immune system, especially after oral intake. The effects of prolonged exposure (30 days) to the two environmentally relevant Cd doses (5 and 50 ppm) were examined in Dark Agouti (DA) and Albino Oxford (AO) rats, which differ in the immune responses to different stimuli. In addition to the Cd effects on the oxidative and immune/inflammatory skin activity, the reactivity of skin after additional dinitrochlorobenzene (DNCB) stimulus during contact hypersensitivity reaction (CHS), was examined. Despite similar Cd deposition in skin/skin cells, tissue damage and a higher intensity/different pattern of oxidative and immune responses were observed in DA strain already at 5 ppm Cd, indicating a higher sensitivity of this strain to the dermatotoxic Cd effects. Although epidermal cells (ECs) of both strains developed stress response to the Cd presence, a more intensive antioxidative response (an increase of GSH, a higher level of gene expression for MT-1 and MT-2, proteins for Nrf2, as well as the genes of AHR pathway) with the presence of apoptosis only in AO strain, indicates a better protection capability of this strain from deleterious Cd effect. The proinflammatory response was observed only in the ECs of DA strain (an increase in IL-1 $\beta$ , TNF and IL-6), as well as IL-10 increase in AO strain as a potential protection mechanism. Nevertheless, after topical administration of DNCB, an inflammatory response develops in both strains, indicating the breakthrough of protective mechanisms that persisted in AO rats after oral Cd intake (at least at 50 ppm Cd). This study may be useful for examining the relationship between oral Cd intake and different skin sensitivity to the development of inflammatory responses and pathological conditions.

**Key words:** Oral cadmium intake, DA and AO rats, skin immune system, epidermal cells, dermatotoxicity, contact hypersensitivity

**Research area:** Biology

**Area of special interest:** Immunobiology

**UDC number:** [612.3+546.48]:[611.778+612.112](043.3)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hemijska i fizička svojstva kadmijuma .....	2
1.2. Izvori kadmijuma u životnoj sredini i putevi izlaganja ljudi .....	2
1.3. Apsorpcija, distribucija i ekskrecija kadmijuma.....	4
1.4. Efekti kadmijuma na zdravlje ljudi.....	5
1.5. Mehanizmi toksičnosti kadmijuma .....	6
1.6. Efekat kadmijuma na imunski sistem .....	7
<i>1.6.1. Komponente i funkcije imunskog sistema.....</i>	<i>7</i>
<i>1.6.2. Imunotoksičnost kadmijuma .....</i>	<i>10</i>
1.7. Imunski sistem kože.....	12
<i>1.7.1. Barijerna funkcija kože.....</i>	<i>12</i>
<i>1.7.2. Struktura i imunske ćelije epiderma.....</i>	<i>13</i>
<i>1.7.3. Struktura i imunske ćelije derma .....</i>	<i>15</i>
<i>1.7.4. Potkožno masno tkivo kože .....</i>	<i>16</i>
<i>1.7.5. Mikrobiom kože.....</i>	<i>17</i>
<i>1.7.6. Koža i metali.....</i>	<i>17</i>
<i>1.7.7. Imunske reakcije u koži.....</i>	<i>18</i>
<i>1.7.8. Dermatotoksičnost kadmijuma .....</i>	<i>19</i>
1.8. Genetska varijabilnost kao faktor koji doprinosi osetljivosti na toksične efekte kadmijuma.....	20
<b>2. CILJEVI RADA</b> .....	<b>21</b>



<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>23</b>
3.1. Hemikalije i reagensi .....	24
3.2. Ekperimentalne životinje .....	24
3.3. Oralni tretman kadmijumom.....	25
3.4. Određivanje koncentracije kadmijuma u tkivima i organima .....	25
3.5. Analiza akutno-faznih proteina i citokina u perifernoj krvi nakon oralnog unosa kadmijuma.....	26
3.6. Histološka analiza tkiva kože nakon oralnog unosa kadmijuma .....	26
3.7. Merenje propustljivosti kože nakon oralnog unosa kadmijuma .....	27
3.8. Ispitivanje parametara inflamacije u homogenatima kože nakon oralnog unosa kadmijuma.....	27
<b>3.8.1. Homogenizacija tkiva kože</b> .....	<b>27</b>
<b>3.8.2. Lowry metoda za određivanje koncentracije proteina</b> .....	<b>27</b>
<b>3.8.3. Procena parametara antioksidativne zaštite</b> .....	<b>28</b>
<b>3.8.4. Određivanje nivoa HMGB1 molekula Western Blot metodom u homogenatima tkiva</b> .....	<b>29</b>
3.9. Ispitivanje promena u kondicioniranom medijumu organokulture eksplanata kože nakon oralnog unosa kadmijuma .....	30
<b>3.9.1. Postavljanje organokulture eksplanata kože</b> .....	<b>30</b>
<b>3.9.2. Određivanje metaboličke vijabilnosti organokulture eksplanata kože</b> .....	<b>30</b>
<b>3.9.3. Određivanje nivoa citokina imunoenzimskim testom na čvrstoj fazi (ELISA)</b> .....	<b>31</b>
<b>3.9.4. Određivanje nivoa azot monoksida (NO) pomoću Griess-ove reakcije</b> .....	<b>31</b>
3.10. Ispitivanje promena u izolovanim ćelijama kože nakon oralnog unosa kadmijuma ..	31
<b>3.10.1. Izolacija epidermnih i dermnih ćelija kože</b> .....	<b>31</b>

3.10.2. Postavljanje kulture ćelija kože .....	32
3.10.3. Određivanje metaboličke vijabilnosti ćelija kože MTT testom .....	32
3.10.4. Određivanje nivoa redukovanog glutationa (GSH) u epidermnim ćelijama kože	33
3.10.5. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real time polymerase chain reaction, RT-PCR) .....	33
3.10.6. Oslobođanje laktat dehidrogenaze od strane epidermnih ćelija.....	35
3.10.7. Određivanje koncentracije citokina ELISA testom u epidermnim i dermnim ćelijama.....	35
3.10.8. Određivanje nivoa NO u epidermnim ćelijama.....	35
3.10.9. Određivanje nivoa proteina (Nrf2, casp-3 i PARP) Western blot metodom u epidermnim ćelijama.....	35
3.11. Ispitivanje promena u drenirajućim limfnim čvorovima kože (saLČ) nakon oralnog unosa kadmijuma .....	36
3.11.1. Izolacija i postavljanje kulture ćelija dLČ kože .....	36
3.11.2. Merenje metaboličke aktivnosti .....	36
3.11.3. Određivanje koncentracije citokina ELISA testom .....	36
3.12. Ispitivanje efekta oralnog unosa kadmijuma na reakciju kontaktne preosetljivosti (na DNCB) .....	37
3.12.1. Izazivanje reakcije kontaktne preosetljivosti i merenje otoka uva .....	37
3.12.2. Izolacija i postavka kulture ćelija epiderma i dLČ kože.....	37
3.12.3. Izolacija i postavka kulture ukupnih ćelija uva.....	38
3.12.4. Određivanje vijabilnosti ćelija kože i dLČ.....	38
3.12.5. Određivanje koncentracije citokina ELISA testom u ćelijama uva i dLČ.....	38
3.12.6. Određivanje zastupljenosti CD4 <sup>+</sup> i CD8 <sup>+</sup> ćelija u fazi elicitacije.....	38

3.13. Statistička obrada rezultata .....	39
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>40</b>
4.1. Efekat oralnog unosa kadmijuma na telesnu masu i dnevni unos kadmijuma.....	41
4.2. Koncentracija kadmijuma u tkivima.....	41
4.3. Efekat oralnog unosa kadmijuma na akutno-fazne proteine i citokine u perifernoj krvi pacova .....	42
4.4. Histološka analiza kože nakon oralnog unosa kadmijuma .....	43
<i>4.4.1. Histološka analiza kože nakon hematoksilin-eozin bojenja.....</i>	<i>43</i>
<i>4.4.2. Efekat oralnog unosa kadmijuma na brojnost mast ćelija u koži.....</i>	<i>44</i>
<i>4.4.3. Efekat kadmijuma na aktivnost neutrofila kože .....</i>	<i>45</i>
4.5. Efekat oralnog unosa kadmijuma na parametre oštećenja kože .....	46
<i>4.5.1. Propustljivost kože.....</i>	<i>46</i>
<i>4.5.2. Marker oksidativnog oštećenja u homogenatima kože.....</i>	<i>47</i>
<i>4.5.3. Nivo HMGB1 molekula u homogenatima kože .....</i>	<i>47</i>
4.6. Efekat oralnog unosa kadmijuma na vijabilnost kože i produkciju proinflammatoryh citokina metodom organokulture eksplanata kože.....	48
<i>4.6.1. Metabolička vijabilnost.....</i>	<i>48</i>
<i>4.6.2. Produkcija proinflammatoryh (IL-1<math>\beta</math>, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>) citokina .....</i>	<i>49</i>
<i>4.6.3. Produkcija azot-monoksida (NO).....</i>	<i>50</i>
4.7. Efekat oralnog unosa kadmijuma na epidermne ćelije kože.....	51
<i>4.7.1. Vijabilnost epidermnih ćelija.....</i>	<i>51</i>
<i>4.7.2. Odgovor epidermnih ćelija na stres izazvan kadmijumom.....</i>	<i>52</i>
<i>4.7.3. Ispitivanje efekta kadmijuma na apoptozu i nekrozu epidermnih ćelija .....</i>	<i>53</i>

<i>4.7.4. Ekspresija gena uključenih u AHR put u epidermnim ćelijama.....</i>	<i>54</i>
<i>4.7.5. Citokinski odgovor epidermnih ćelija.....</i>	<i>55</i>
<i>4.7.6. Produkcija NO od strane epidermnih ćelija.....</i>	<i>58</i>
<i>4.7.7. Odgovor epidermnih ćelija na S. epidermidis .....</i>	<i>59</i>
<i>4.7.8. Vijabilnost epidermnih ćelija u kulturi .....</i>	<i>60</i>
<i>4.7.9. Produkcija citokina u kokulturi epidermnih ćelija i limfocita.....</i>	<i>60</i>
4.8. Efekat oralnog unosa kadmijuma na ćelije derma .....	63
<i>4.8.1. Vijabilnost ćelija derma .....</i>	<i>63</i>
<i>4.8.2. Produkcija proinflamatornih (IL-1<math>\beta</math>, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>) citokina .....</i>	<i>64</i>
<i>4.8.3. Produkcija antiinflamatornog citokina IL-10 .....</i>	<i>65</i>
<i>4.8.4. Vijabilnost ćelija derma u kulturi.....</i>	<i>66</i>
4.9. Efekat oralnog unosa kadmijuma na drenirajuće limfne čvorove (supraskapularne i aksilarne) kože .....	66
4.10. Ispitivanje efekta kadmijuma na imunsku reaktivnost kože nakon nanošenja haptena (DNCB) u reakciji kontaktne preosetljivosti .....	67
<i>4.10.1. Ispitivanje efekta kadmijuma na aktivnost epidermnih ćelija u fazi senzibilizacije reakcije kontaktne preosetljivosti .....</i>	<i>67</i>
<i>4.10.2. Ispitivanje efekta kadmijuma na aktivnost ćelija drenirajućih limfnih čvorova (saLČ) kože u fazi senzibilizacije.....</i>	<i>70</i>
<i>4.10.3. Ispitivanje efekta kadmijuma na aktivnost ćelija uva u fazi ekspresije reakcije kontaktne preosetljivosti .....</i>	<i>73</i>
<i>4.10.4 Ispitivanje efekta kadmijuma na aktivnost ćelija aLČ u fazi ekspresije reakcije kontaktne preosetljivosti .....</i>	<i>78</i>
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>82</b>
5.1. Efekat oralne primene Cd na osnovne parametre toksičnosti .....	83

5.2. Deponovanje kadmijuma u tkivima i esencijalnih metala u koži (Fe, Cu, Zn).....	84
5.3. Efekat oralnog unosa kadmijuma na markere sistemske inflamacije .....	84
5.4. Efekat oralnog unosa kadmijuma na histološki vidljive promene u koži i infiltraciju/aktivnost imunskih ćelija .....	85
5.5. Efekat oralnog unosa kadmijuma na markere oštećenja kože .....	86
5.6. Stres odgovor epidermnih ćelija .....	88
5.7. Efekat oralnog unosa Cd na imunsku aktivnost epidermnih ćelija .....	90
5.8. Efekat oralnog unosa Cd na limfne čvorove (saLČ) kože .....	92
5.9. Efekat oralnog unosa Cd na reaktivnost kože nakon nanošenja DNCB .....	93
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>97</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>100</b>

# 1. UVOD

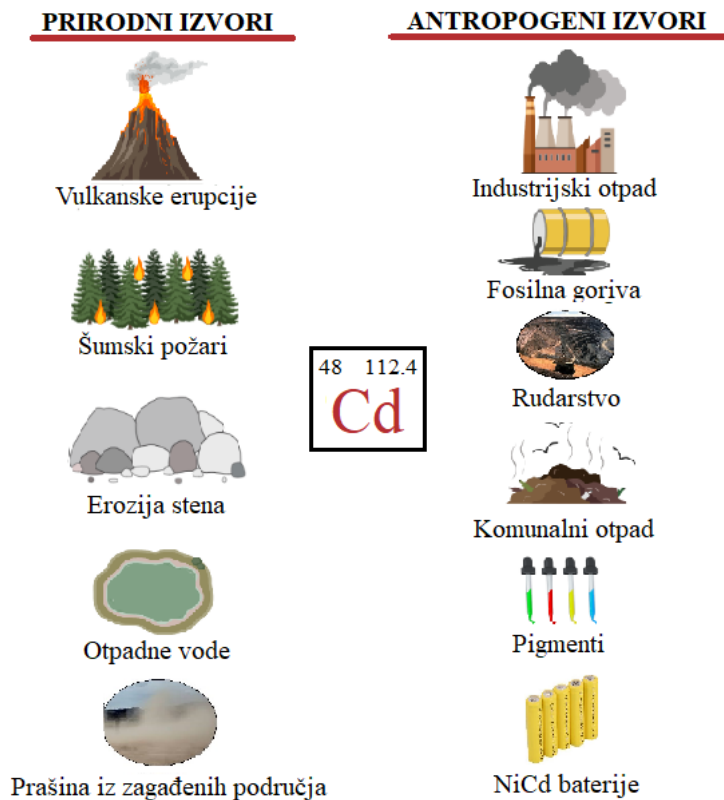
Teški metali nose naziv u skladu sa svojom atomskom težinom i gustinom (Fergusson, 1990). Oni se prirodno nalaze u ekosistemima i mogu biti toksični već pri niskim koncentracijama. Kadmijum (Cd) je sedmi najtoksičniji teški metal, koji predstavlja ozbiljan zdravstveni problem ljudi usled sredinske kontaminacije (ATSDR, 2017). Otkriven je 1817. godine od strane nemačkog hemičara Friedrich Stromeyer-a, koji je na zahtev vlade testirao cink-karbonat, dugo prepisivani lek za lečenje kožnih oboljenja u apotekama širom Hildsheima-a (Nemačka). Stromeyer je iz cink-karbonata izolovao nepoznati hemijski element koji je prvobitno opisao kao nečistoću cinka (Zn), da bi kasnije predložio ime Cadmium po latinskoj reči „*cadmia*“, starom nazivu za rudu Zn (Stromeyer, 1819). Hemičar Karl Hermann je 1818 godine nezavisno od Friedrich Stromeyer-a takođe otkrio Cd (Mellor, 1923).

### **1.1. Hemijska i fizička svojstva kadmijuma**

Cd je svrstan u IIb grupu prelaznih metala, zajedno sa Zn, živom (Hg) i ununbijumom (Uub) i okarakterisan je kao težak metal sa atomskim brojem 48, relativnom atomskom masom 112.414, tačkom topljenja na 321.069 °C, tačkom ključanja na 767 °C i gustinom od 8.69 g cm<sup>-3</sup> (Haynes, 2014). Najviše ga ima u Zemljinoj kori gde se nalazi u rudama Zn, bakra (Cu) i olova (Pb) (ATSDR, 2012), dok se može pronaći i u formi čiste rude Cd, po imenu grenokit. Prema svojim fizičkim svojstvima, Cd spada u mekane metale, srebrno-bele boje. Rastvorljivost ovog teškog metala u vodi u velikoj meri zavisi od stepena njene kiselosti, pa se tako Cd vezan za sedimentne stene može rastvoriti ukoliko dođe do smanjenja pH vode (Ros i Slooff, 1987). S obzirom da Cd spada u relativno nestabilna jedinjenja, u prirodi najčešće gradi komplekse sa sulfatima (kadmijum-sulfat, CdSO<sub>4</sub>) i hloridima (CdCl<sub>2</sub>) (IARC, 1993), u kojima se nalazi u obliku dvovalentnih jona (Cd<sup>2+</sup>) (Shi i drugi, 2008), lako rastvorljivih u vodi (ATSDR, 2012).

### **1.2. Izvori kadmijuma u životnoj sredini i putevi izlaganja ljudi**

Vulkanske erupcije, šumski požari, prašina nošena vetrom iz zagađenih područja i aerosolne čestice okeana, jesu glavni prirodni izvori Cd u atmosferi. Ispiranje matičnih stena doprinosi oslobađanju ovog metala u zemljište (Khan i drugi, 2010; Liu i drugi, 2013), naročito stena vulkanskog porekla, za koje je pokazano da sadrže jako visoku koncentraciju Cd (Shah i drugi, 2010). Ipak, preko 90 % ( $38 \times 10^6$  kg godišnje<sup>-1</sup>) Cd se oslobađa u prirodnu sredinu delovanjem čoveka. Zahvaljujući visokoj otpornosti na koroziju, niskoj tački topljenja, visokoj sposobnosti plastične deformacije pre pucanja (duktilnosti), termičkoj i električnoj provodljivosti, Cd je pogodan za široku industrijsku upotrebu (USGS, 2007). Globalno se nalazi kao sastavni deo nikl-kadmijumskih baterija (83%), pigmenta (8%), premaza i presvlaka (7%), stabilizatora za plastiku (1.2%) i drugo (0.8%), gde doprinosi poboljšanju njihovih performansi (Tolcin, 2008) (Slika 1).



**Slika 1. Putevi dospevanja kadmijuma u životnu sredinu**

Primarna upotreba Cd u industriji je u pravljenju elektroda nikel-kadmijumskih baterija za železničke pruge i avio industriju, ali i za potrošačke proizvode (bežični električni aparati, mobilni telefoni, kamere, prenosivi računari, prenosivi kućni aparati i dečje igračke) (ATSDR, 2008; USGS, 2008). Sulfidna jedinjenja Cd se koriste za pravljenje pigmentata, zbog visoke moći pokrivanja ovog metala i velike otpornosti na atmosferske i sredinske uticaje, koji se primenjuju u proizvodnji inženjerske plastike, glazura, stakla, keramike, gume, emajla, boja za slikanje i pravljenje vatrometa (Herron, 2000). Prema podacima iz 2016. godine, ukupno oslobađanje Cd usled industrijalizacije, iznosilo je 23.000 tona u čitavom svetu, ne uključujući Sjedinjene Američke Države (USGS, 2017). Sagorevanjem fosilnih goriva, oslobađanjem komunalnog otpada i otpada iz cementnih industrija i topionica metala (Nriagu i Pacyna, 1988; Bi i drugi, 2006; Cloquet i drugi, 2006), Cd dospeva u zemljište, dok najčešće korišćenjem fosfatnih đubriva dospeva u poljoprivredna, obradiva zemljišta (Alloway, 2013). U Francuskoj je izmerena najveća koncentracija Cd u zemljištu ( $7.61 \text{ mg kg}^{-1}$ ), dok su odmah za njom Belgija i Kina ( $7.43 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Unošenje vode i hrane, kontaminiranih ovim teškim metalom, predstavlja najznačajniji put izloženosti ljudi Cd (ECHA, 2013; ATSDR, 2008). Naime, iz zagađenih područja biljke lako usvajaju Cd putem korenovog sistema, transportuju ga u nadzemne delove gde dolazi do akumulacije ovog metala i tako doprinose njegovom ulasku u lanac ishrane (Di Toppi i Gabbrielli, 1999). Takođe, kretanjem podzemnih voda, Cd dospeva do vode za piće (EPA, 2017). Njegova granična dozvoljena vrednost iznosi  $0.003 \text{ mg/L}$ , prema preporuci EU (Directive 98/83/EC), a po Pravilniku Republike Srbije o higijenskoj ispravnosti vode za piće (Sl. list SRJ, 42/98 i 44/99). Izmereni nivoi Cd u poljoprivrednim proizvodima dosta variraju i zavise od sorte biljaka, tipa zemljišta, uslova uzgajanja i poljoprivrednih metoda koje se koriste (Callan i drugi, 2014). Namirnice koje se često koriste u ishrani ljudi, poput krompira, pirinča ( $0.59 \text{ mg Cd/kg}$ ) (Zhang i drugi, 2014), soje i pšenice ( $0, 2 \text{ mg/kg}$ ),



kikirikija, zelenog lisnatog povrća (0.05 mg/kg), žitarica i čokolade (0.8 mg/kg) (Satarug i drugi, 2000), kao i organizmi koji imaju filtracioni način ishrane (ostrige i druge školjke), imaju sposobnost da bioakumuliraju velike količine Cd bez vidljivih znakova toksičnosti i nazivaju se hiperakumulatorima Cd (Zyadah i Abdel-Baky, 2000). Iznutrice, pre svega jetra (0.5 mg/kg) i bubreg (1.0 mg/kg), sadrže relativno veću količinu Cd u poređenju sa mišićima, dok riba (0.1 mg/kg), naročito losos, sadrži manje količine ovog metala (Birgisdottir i drugi, 2013; Guan i drugi, 2015). Posebna zabrinutost postoji za unos Cd kod vegetarijanaca i onih ljudi koji žive područjima gde je zastupljena ishrana bogata morskom hranom i školjakama (200–1000 µg/kg) (Galal-Gorchev, 1991). Značajne količine Cd (do 1.46 µg na 15 mg Zn, preporučenog dnevnog unosa) su pronađene i u suplementima Zn (Krone i drugi, 2001).

Pored opšte populacije ljudi, koja Cd najčešće unosi pomoću kontaminirane hrane ili vode, postoje i grupe ljudi koje su štetnim efektima ovog metala izložene putem disanja. S ozbirom na to da lišće duvana prirodno akumulira velike količine Cd, osobe koje su pušači unose Cd u organizam udisanjem duvanskog dima (ili ređe oralnim putem, žvakanjem duvana) (Pappas i drugi, 2008, 2014). Procenjeno je da jedna cigareta sadrži 1.7 µg Cd od čega se oko 10 % apsorbuje prilikom pušenja (Elinder i drugi, 1983), pa tako količina apsorbovanog Cd kod osobe koja puši jednu kutiju cigareta/danu iznosi 1-3 µg (po danu) (Lewis i drugi, 1972). Kako plućni epitel nema efikasnu barijeru za mnoge toksične supstance (Adams, 1975; Squier i drugi, 1991; Mauro i drugi, 2015) poput Cd, on se lako apsorbuje kroz epitel i intersticijelna tkiva, dospeva do cirkulacije i transportuje do organa (Ferin i drugi, 1992; Oberdorster i drugi, 2002) gde može da izazove niz toksikoloških i patoloških promena. Prema studiji Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer, IARC), osobe koje su profesionalno izložene ovom metalu, takođe ga najčešće unose udisanjem kontaminiranog vazduha. Tako, osobe koje rade u industrijama za proizvodnju baterija, pigmenta ili galvanizaciju metala, najčešće su izložene oksidima kadmijum-hidroksida (Friberg i drugi, 1985; Ernst i Thériault, 1984; IARC, 2012), dok su osobe koje se profesionalno bave zavarivanjem, sa elektrodama koje sadrže 25% Cd, izložene visokim koncentracijama čistog Cd. Nivo Cd na pojedinim radnim mestima dostiže i preko 52 µg/m<sup>3</sup> vazduha, što je pet puta veće od granične dozvoljene vrednosti (Nogué i drugi, 2004). Dozvoljeni nedeljni unos Cd po osobi iznosi 0.49 mg/kg (WHO, 2011) i ukoliko se pređe ovaj prag, usled njegove akumulacije tokom života, može doći do razvoja različitih oboljenja gde se kao finalna posledica hronične inflamacije može javiti karcinogeneza (Bernard, 2008; Pappas, 2011). Unos Cd kod ljudi, u manjoj meri, odigrava se i putem dermalnog kontakta sa prašinom ili tečnostima koje su kontaminirane ovim metalom (ECHA, 2013), ali je ovaj put izlaganja zanemarljiv u odnosu na oralni i inhalacioni put.

### 1.3. Apsorpcija, distribucija i ekskrecija kadmijuma

Put dospevanja Cd u organizam u velikoj meri utiče na njegovu apsorpciju (Zalups i Ahmad, 2003). U oralnom putu intoksikacije ljudi Cd, kao glavnom putu izlaganja, primarni ciljani organ je gastrointestinalni trakt (GIT) (Andersen i drugi, 1988), gde se u proseku apsorbuje 3-8 % unetog Cd, dok je animalnim modelima pokazano da se apsorbuje oko 1-2 % ovog metala (Zalups i Ahmad, 2003). Mehanizam unošenja Cd u same ćelije intestinuma, enterocite, uključuje njegovo nespecifično vezivanje za anjonska mesta na membrani i prolazak kroz membranu, koji zavisi od njene fluidnosti (Foulkes i drugi, 1981; Foulkes, 1989). Transport Cd u enterocite olakšan je transporterima dvovalentnih jona (engl. Divalent Metal Transporter 1, DMT1), čija je osnovna uloga transport jona gvožđa (Fe<sup>2+</sup>), kao i jonskim kanalima kalcijuma (engl. Calcium Binding Protein, CaBP) (Reeves i drugi, 2005; Kuppler i drugi, 2009) sa kojima Cd deli sličnu veličinu, pa stoga ima i sličan afinitet vezivanja za ove transportere (Brzoska i Moniuszko-Jakoniuk, 1998) i u kompeticiji je sa njima

(Perfus-Barbeoch i drugi, 2002). Nakon apsorpcije, jedan deo Cd se u citoplazmi vezuje za proteinske frakcije malih i velikih relativnih molekulskih masa, poput metalotioneina (MT) sa kojima formira komplekse (Cd-MT), čime se sprečava njegov transport u sistemsku cirkulaciju (Nordberg, 1972). Ipak, veći deo Cd, aktivnošću transportera za izbacivanje gvožđa (engl. Metal Transporter protein 1, MTP1), izlazi iz enterocita GIT-a i dospeva do sistemske cirkulacije i drugih organa (Ryu i drugi, 2004). Osim toga, kao posledica toksičnosti Cd dolazi do nekroze i apoptoze enterocita i oslobađanja kompleksa Cd-MT u krv, povećavajući tako dodatno njegovu koncentraciju u cirkulaciji (Zalups i Ahmad, 2003). Oslobođeni Cd odlazi pre svega do bubrega (Orlowski i Piotrowski, 2003), gde se kao indikator za skorije izlaganje ovom metalu koristi urin (Jin i drugi, 2002), a zatim i do jetre (Webb, 1972; Skipper i drugi, 2016). Pored bubrega i jetre, koji se smatraju primarnim ciljnim organima toksičnosti izazvane Cd (Martin i drugi, 2006), pokazano je da se ovaj metal deponuje u testisima, srcu, kostima, očima i mozgu (WHO 1992; Asagba i drugi, 2002; Eriyamremu i drugi, 2005; Asagba i Eriyamremu, 2007). Efikasnost apsorpcije nakon unošenja Cd putem inhalacije iznosi 25-50 %, što iako je dosta veće u poređenju sa apsorpcijom nakon ingestije (WHO, 1992), kao što je rečeno, pogađa samo određene grupe ljudi (pušači, ljudi koji žive blizu topionica metala i profesionalno izloženi ljudi). Apsorpcija Cd putem kože nije velika (0.2–0.8%), (Nordberg i drugi, 2007), ali je pokazano da je znatno olakšana vezivanjem slobodnih jona Cd za sulfhidrilne radikale cisteina epidermih keratinocita i formiranjem kompleksa sa metalotioneinima (Fasanya-Odewumi i drugi, 1998). Apsorpcija Cd, pored puta izloženosti zavisi od doze i dužine izloženosti Cd, izloženosti drugim metalima, starosti, pola, ishrane, porodične anamneze, načina života i zdravstvenog stanja osobe. Prema dužini trajanja, izloženost kadmijumu može biti akutna (oko 14 dana), subhronična (do godinu dana) i hronična, kada traje godinu dana ili duže (ATSDR, 2012). U zavisnosti od dužine trajanja izloženosti Cd, neki organi su podložniji njegovom deponovanju, pa je tako jetra primarni ciljni organ nakon akutnog, a bubrezi i skelet nakon hroničnog izlaganja (Schnel i drugi, 1978). Epidemiološke studije na ženama (Olsson i drugi, 2002), pokazale su da osobe koje poseduju nizak nivo gvožđa u većoj meri apsorbuju Cd, nakon njegovog oralnog unosa, ukazujući tako na ulogu pola i interakcije Cd sa drugim metalima u njegovoj apsorpciji. Ovakvi rezultati potvrđeni su i studijama na miševima (Hamilton i Valberg, 1974). Da na apsorpciju Cd utiče starost jединke, pokazala su istraživanja Akesson i drugi (2002), gde su juvenilne jединke apsorbovale veće količine ovog metala (10 %) u poređenju sa adultima (1 %) (Matsusaka i drugi, 1972).

Mala količina Cd se eliminiše iz organizma nakon deponovanja u tkivima i organima, usled nedostatka aktivnih ekskretornih mehanizama. Deo Cd se izbacuje putem urina (Nordberg i Nordberg, 1972), dok se ostatak uglavnom eliminiše preko fecesa, iako je u pitanju neapsorbovani materijal. Manje značajni putevi izlučivanja uključuju njegovo deponovanje u dlaci i kosi, ekskreciju putem majčinog mleka i pankreasa, ali zajedno ovi putevi daju mali doprinos ukupnom izbacivanju Cd, naročito ako se uzme u obzir biološki poluživot ovog metala. Spora ekskrecija Cd dovodi do njegovog dugačkog poluživota, varirajući od 200 dana do 22 godine, prevazilazeći tako životni vek nekih životinja i za 20 % (Friberg i drugi, 1985). Prosečan poluživot Cd u bubrezima je 14 godina, u rasponu od 9 do 28 godina, kako je pokazano u japanskim studijama (Suwazono i drugi, 2009), dok je studija iz Švedske pokazala da može dostići poluživot čak od 45 godina (Fransson i drugi, 2014).

#### **1.4. Efekti kadmijuma na zdravlje ljudi**

Prve eksperimentalne toksikološke studije za Cd sprovedene su još 1919. godine, dok su njegovi hronični efekti na zdravlje ljudi prepoznati dosta kasnije, objavljivanjem prvih podataka o lezijama pluća, bubrega i kostiju kod industrijskih radnika u periodu između 1930-1940 (Bulmer i drugi, 1938; Nicaud, 1942; Friberg, 1950). Cd je 1960ih godina dospelo u centar toksikoloških istraživanja nakon što

je identifikovan kao glavni etiološki faktor „*itai-itai*“ bolesti, stanja koje pogađa žene u Japanu koje su izložene ovom metalu putem ishrane bogate pirinčem i kontaminirane vode (Nordberg, 2009). Pacijenti oboleli od „*itai-itai*“ bolesti imaju ozbiljnu osteomalaciju praćenu višestrukim prelomima kostiju i renalnom disfunkcijom (Jarup i drugi, 1998), bolove u leđima i ekstremitetima i teškoće pri hodanju, kao i osećaj bola pri pritisku kostiju (Nordberg i drugi, 2002). Nakon ovih podataka o ozbiljnim intoksikacijama, broj epidemioloških i eksperimentalnih studija porastao je širom sveta kako bi se okarakterisala toksičnost Cd i kako bi se odredili granični nivoi izloženosti ovom metalu koji predstavlja pretnju po ljudsko zdravlje. Ispitivanjem efekta Cd na hematološke parametre, pokazano je da hronično izlaganje ovom metalu dovodi do anemije (Albahary, 1972) i eozinofilije (Valko i drugi, 2005). Etiološke studije pokazale su da Cd učestvuje u razvoju karcinoma, pa je stoga klasifikovan u prvu grupu karcinogena od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer, IARC) (IARC 1993; Arroyo i drugi, 2012). Tako, kod industrijskih radnika koji su izloženi Cd putem inhalacije, postoji povećan rizik za razvoj karcinoma pluća (Waalkes, 2003), a povezuje se i sa rakom prostate i jetre (Zeng i drugi, 2004). U bubrezima Cd svoje toksične efekte ispoljava na dozno-zavistan način, nakon dostizanja kritičnih vrednosti od 150-200 ppm ukupnog Cd (Sethi i Khandelwal, 2006; Bernard i Lauwerys, 1986; Bernard, 2004) tj 2 ppm slobodnog Cd. Rana faza oštećenja bubrega odlikuje se povećanom ekskrecijom  $\beta$ 2-mikroglobulina putem urina (Bernard, 2004), koji je prihvaćen kao rani biološki marker nefrotoksičnosti kadmijuma (Prozialeck i drugi, 2007), dok kasnije može doći do letalnog ishoda usled otkazivanja srca, moždanog udara, nefritisa i nefroze (Nishijo i drugi, 2004). Nakon akutnog oralnog unosa, ovaj metal ispoljava svoje toksične efekte na gastrointestinalni trakt, gde izaziva grčeve u stomaku, povraćanje i dijareju (ATSDR, 2012).

Sve više je podataka o štetnim efektima Cd na nervni sistem, kao etiološkom faktoru neuredegenerativnih bolesti poput Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (Okuda i drugi, 1997; Jiang i drugi, 2007). Meta delovanja Cd u CNS-u jesu cerebralni kortikalni neuroni, gde dovodi do njihove apoptoze (Xu i drugi, 2011; Yuan i drugi, 2013). Iako efekat Cd na imunski sistem ljudi nije toliko ispitan postoje podaci o njegovom imunostimulatornom efektu na limfocite i immunosupresivnom efektu na neutrofile ljudi u perifernoj krvi (Ciarrocca i drugi, 2015). Dodatno, etiološke studije na preko 17.000 pacijenata (u periodu 1999-2012) ukazale su da Cd u krvi može da poveća podložnost pojavi hroničnih infekcija ljudi virusom hepatitisa B ili bakterijama *Helicobacter pylori* i *Toxoplasma gondii* (Krueger i Wade, 2016), i pokazale povećanje koncentracije interleukina (IL) -1 $\beta$  i interferona (IFN) - $\gamma$  u serumu ljudi (Yucesoy i drugi, 1997). Nedavna studija pokazala je vezu između nivoa Cd u krvi i psorijaze (Liaw i drugi, 2017), međutim nisu poznati drugi literaturni podaci o dermatotoksičnosti ovog metala.

## 1.5. Mehanizmi toksičnosti kadmijuma

Povezanost izloženosti Cd sa brojnim zdravstvenim rizicima kod ljudi nametnuli su potrebu za ispitivanjem mehanizama toksičnosti ovog metala. Pokazano je da Cd svoju toksičnost može da ispolji direktno ili indirektno (Rani i drugi, 2014) i da može da aktivira kako oštećujuće tako i reparacione procese, ali da je glavni mehanizam njegovog delovanja izazivanje oksidativnog stresa (Ercal i drugi, 2001; Shaikh i drugi, 1999; Cuypers i drugi, 2010). Drugi mehanizmi toksičnosti Cd uključuju modulaciju ćelijske proliferacije, inhibiciju apoptotskih mehanizama, blokiranje reparacije molekula DNK (dezoksiribonukleinska kiselina) (Zarros i drugi, 2008) i inflamaciju (Theocharis i drugi, 1991; Horiguchi i drugi, 2000).

Oksidativni stres predstavlja fenomen izazvan poremećajem balansa između produkcije i akumulacije reaktivnih oblika kiseonika (engl. Reactive Oxygen Species, ROS) unutar ćelija i tkiva, i

sposobnosti antioksidativnog sistema da ukloni ovakve reaktivne produkte (Pizzino i drugi, 2017). Pokazano je da Cd sprečava oksidativnu fosforilaciju i povećava propustljivost membrane, remeti homeostazu kalcijuma, natrijuma i kalijuma i vodi ka oslobađanju jona gvožđa, dovodeći tako indirektno do povećanja nivoa ROS (Belyaeva i drugi, 2008; Pathak i Khandelwal, 2006; Dorta i drugi, 2003; Yeh i drugi, 2009). Takođe, postoji veliki broj molekula antioksidativne zaštite unutar ćelije za koje može da se veže ovaj dvovalentni katjon, odnosno za njihove funkcionalne grupe koje sadrže sumpor, azot ili kiseonik (Klaassen i drugi, 1999), dovodeći tako do povećanja nivoa ROS (Lopez i drugi, 2006). Prve efekte unutar ćelije Cd ostvaruje na redukovani glutation (GSH), koji se smatra glavnim unutarćelijskim ne-enzimskim molekulom antioksidativne zaštite koji ima sposobnost vezivanja i uklanjanja ROS, reaktivnih oblika azota i drugih reaktivnih vrsta tokom inflamatornih procesa i metabolizma ksenobiotika (Rahman i drugi, 2005; Haddad i Harb, 2005). Naime, Cd se vezuje za tiolne grupe GSH molekula (Singhal i drugi, 1987) trošeći tako njegove unutarćelijske depoe čime stvara oksidativno okruženje unutar ćelije. Pored GSH, Cd inhibira aktivnost antioksidativnih enzima superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) (Rani i drugi, 2014). Krajnji efekat toksičnog delovanja Cd na ćelije putem oksidativnog stresa, jeste njihova ćelijska smrt (Kukongviriyapan i drugi, 2016).

Još jedan od načina indirektnog delovanja Cd jeste indukovanje apoptoze modulacijom aktivnosti brojnih transkripcionih faktora (TF) osetljivih na oksidativni stres, a koji učestvuju u regulaciji gena uključenih u apoptozu (Watkin i drugi, 2003). Jedan od tih faktora jeste NF- $\kappa$ B, koji je bitan za balans između preživljavanja i smrti ćelije, a za koji se *in vitro* sa visokim afinitetom mogu vezati dvovalentni katjoni, poput Cd, i inhibirati njegovo vezivanje za DNK (Shumilla i drugi, 1998).

## 1.6. Efekat kadmijuma na imunski sistem

Kadmijum deluje na različite komponente imunskog sistema i procese u kojima one učestvuju, pa je stoga u ovom delu dat kratak pregled principa funkcionisanja imunskog sistema.

### 1.6.1. Komponente i funkcije imunskog sistema

Imunski sistem čini skup ćelija, tkiva i molekula (Abbas i drugi, 2014a) čija je osnovna funkcija zaštita tkiva koja su u neposrednom kontaktu sa spoljašnjom sredinom (kože, respiratornih puteva, intestinalnog trakta i drugih graničnih tkiva) koja su stoga izložena stranim antigenima, mikroorganizmima i njihovim toksinima. Ćelije imunskog sistema zajedno sa drugim potpornim (neimunskim) ćelijama grade limfna tkiva koja se mogu podeliti na primarna (kostna srž i timus), u kojima dolazi do nastanka i funkcionalnog sazrevanja limfocita, i sekundarna (slezina, limfni čvorovi i limfno tkivo vezano za mukozu), u kojima dolazi do interakcije limfocita sa drugim imunskim/nelimfoidnim ćelijama i razvoja adekvatnog imunskog odgovora na različite antigene (Abbas i drugi, 2014b). Ovaj sistem ima dve linije odbrane, urođenu (prirodnu, nativnu) i adaptivnu (stečenu) imunost. Urođena imunost predstavlja prvu liniju odbrane od patogena i toksina, ili prilikom tkivnog oštećenja, nezavisna je od antigena (ne-specifična) i uspostavlja se u roku od nekoliko sati nakon susreta sa antigenom. Brojne ćelije su uključene u ovaj tip imunskog odgovora, uključujući ćelije mononuklearnog fagocitnog sistema, mast ćelije, neutrofilne, bazofilne i eozinofilne leukocite i limfoidne ćelije urođene imunosti (ILC), kao što su ćelije prirodne ubice (engl. Natural killer, NK) (Abbas i drugi, 2014c). Kako ćelije urođenog sistema nemaju svojstvo memorije, urođena imunost na svaki ponovni susret sa antigenom odgovara na isti način. Sa druge strane, adaptivni imunski odgovor je antigen-specifičan i njegovi mehanizmi se uspostavljaju i prilagođavaju (adaptiraju) antigenu čime se

postizuje/stiče specifičnost za antigen, pa je neophodan određeni vremenski period od susreta sa antigenom do postizanja adekvatnog i maksimalnog imunskog odgovora. Postoje dva tipa adaptivnog imunskog odgovora koji su posredovani T (celularna imunost) i B limfocitima (humoralna imunost) (Abbas i drugi, 2014b), ćelijama koje poseduju jedinstvenu sposobnost memorije. Naime, nakon uklanjanja infekcije većina efektorskih ćelija (T i B limfocita) umire i uklanja se procesom fagocitoze, dok se mali broj ovih ćelija zadržava u vidu memorijskih ćelija od kojih jedna kategorija (efektorske memorijske ćelije) obezbeđuje znatno brži i jači odgovor prilikom ponovnog susreta sa istim antigenom (Bonilla i Oettgen, 2010; Janeway i drugi, 2001a). Urođena i adaptivna imunost međusobno se ne isključuju, već ostvaruju saradnju prilikom odbrane domaćina, tako što urođena daje „instrukcije“ adaptivnom, koji kao efektorske koristi komponente i mehanizme urođene imunosti (Turvey i Broide, 2010; Bonilla i Oettgen, 2010; Janeway i drugi, 2001a).

### *1.6.1.1. Urođena imunost*

Prva linija odbrane urođene imunosti posredovana je anatomskim (epitelne ćelije kože i mukoze) i fiziološkim (temperatura, niska pH i hemijski medijatori) barijerama, prirodnim antibioticima i imunskim ćelijama epitela (Abbas i drugi, 2014b; Warrington i drugi, 2011). Ukoliko patogen uspe da prodre kroz prvu liniju odbrane, biće prepoznat od strane ćelija urođenog imuniteta preko receptora za prepoznavanje obrazaca (engl. Pattern Recognition Receptors, PRRs), koji imaju sposobnost da vežu evolutivno konzervirane komponente mikroorganizama nazvane molekulski obrasci asocirani sa patogenima (engl. Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) (Janeway i drugi, 2001b). Najzastupljeniji i najbolje proučeni PRR jesu receptori slični Toll proteinu (engl. Toll like receptors, TLRs), koji mogu biti površinski (TLR 1, 2, 4, 5, 6) i služe za prepoznavanje ćelijskih komponenti bakterija i nekih vrusa, gljiva i parazita, ili unutarćelijski (TLR 3, 7, 8, 9) koji prepoznaju nukleinske kiseline virusa i fagocitovanih bakterija. Unutar ćelije se, pored TLR receptora, nalaze CARD (engl. Caspase Activation and Recruitment Domain) receptori za prepoznavanje RNK virusa, i NLR (engl. NOD /Nucleotide Oligomerization Domain-containing protein/-like receptors) receptori koji prepoznaju bakterijske peptidoglikane (Kataranovski i drugi, 2012). Ćelije urođenog imuniteta prepoznaju i molekulske obrasce oštećenja domaćina (engl. Danger Associated Molecular Patterns, DAMPs) poput molekula DNK, RNK, HMGB1 (engl. High-Mobility Group Box 1) proteina, kalcijum-vezujućih S100 proteina, proteina toplotnog šoka (eng. Heat shock proteins, HSPs), i drugih molekula koji se oslobađaju iz oštećenih ili umirućih ćelija i pokreću proces „sterilne“ (neinfektivne) inflamacije (Janeway i drugi, 2001b; Kataranovski i drugi, 2012; Roh i Sohn, 2018).

Primarna funkcija sistema urođenog imuniteta jeste privlačenje imunskih ćelija na mesto infekcije ili inflamacije, produkcijom medijatora zapaljenja citokina i molekula sa hemotaktičkim svojstvima. Oni omogućavaju aktivaciju sistema komplementa, biohemijsku kaskadu koja ima zadatak u prepoznavanju i osponizaciji (oblaganju) stranih antigena, nakon čega ovi antigeni podležu procesu fagocitoze (Turvey i Broide, 2010; Bonilla i Oettgen, 2010; Janeway i drugi, 2001b). Prve imunske ćelije koje ostvaruju fizički kontakt sa patogenom jesu makrofagi (MF) i neutrofilni leukociti, fagocitne ćelije koji vrše fagocitozu mikroorganizama. Naime, patogen se okružuje membranom fagocita, formira se fagozom koji se spaja sa lizozomalnim granulama neutrofila i MF i nastaje fagolizozom. U fagolizozomu, oslobađanjem lizozomalnih proteina poput mijeloperoksidaze (MPO) neutrofila (Klebanoff, 2005), dolazi do uništavanja patogena (Janeway i drugi, 2001c). Pored uloge u fagocitozi, MF mogu da deluju kao antigen-prezentujuće ćelije (APC) i da prezentuju antigene T ćelijama (Turvey i Broide, 2010). Kao i prethodna dva tipa ćelija, dendritične ćelije (DC) imaju sposobnost fagocitoze mikroorganizama, čije delove, nakon obrade prezentuju T ćelijama. Zahvaljujući svojoj aktivnosti antigen-prezentujućih ćelija (APC) deluju kao posrednici između urođene i adaptivne imunosti. Mast

ćelije, bazofili i eozinofili imaju ulogu u akutnim inflamatornim procesima poput onih u astmi i alergiji. Naime, mast ćelije i bazofili eksprimiraju visokoafinitetne receptore (FcεRI) za konstantni region (Fc) imunoglobulina E (IgE) čijom aktivacijom se pokreće degranulacija i oslobađanje širokog spektra citokina i biohemijskih medijatora i razvija se inflamacija, u kojoj kao centralne efektorske ćelije deluju sva tri tipa ćelija (Janeway i drugi, 2001c). Pored toga, mast ćelije, bazofili i eozinofili zahvaljujući produkciji molekula sa sposobnošću razaranja tegumenta, obezbeđuju i zaštitu od parazita (helminata) koji su previše veliki da bi bili fagocitovani (Stone i drugi, 2010). Ulogu u odbacivanju tumora i uništavanju ćelija koje su inficirane virusima imaju NK ćelije, koje dovode do apoptoze inficiranih ćelija oslobađanjem perforina i granzima iz svojih granula (Brandstadter i Yang, 2011).

U odgovoru na tkivnu povredu, izazvanu infekcijom (prodorom mikroorganizama), fizičkim stimulusom, hemijskim agensom itd., ćelijske i solubilne komponente urođene imunosti uspostavljaju zapaljenjski odgovor, zaštitni odgovor organizma na povredu sa ciljem eliminacije agenasa koji su doveli do povrede, sprečavanja oštećenja tkiva i/ili započinjanja procesa reparacije i obnavljanja fizioloških funkcija tkiva ili organa pogođenih inflamatornim procesom (Das, 2011).

### *1.6.1.2. Adaptivna imunost*

Ukoliko odgovor posredovan urođenom imunošću nije dovoljan za eliminaciju infektivnih agenasa, aktivira se adaptivna imunost, čije su osnovne funkcije razlikovanje “stranih” od “sopstvenih” antigena, nastanak imunoloških efektorskih puteva specifičnih za patogene i eliminacija specifičnih patogena ili ćelija inficiranih patogenima i nastanak memorije (Bonilla i Oettgen, 2010). U kostnoj srži, od hematopoetskih matičnih ćelija, nastaju T ćelije koje nakon migracije u timus potpuno sazrevaju. Ove ćelije iskazuju na svojoj membrani T-ćelijski receptor (TCR) i za svoju aktivaciju zahtevaju pomoć DC-a, ali ponekad i MF-a, B limfocita, fibroblasta i epitelnih ćelija kao neprofesionalnih APC-a. Na svojoj površini APC eksprimiraju površinske proteine, MHC molekule, koji su klasifikovani u dve klase kao MHC molekuli prve klase (MHC I) koji se eksprimiraju na svim ćelijama sa jedrom, i MHC molekuli druge klase (MHC II) eksprimirani samo na određenim tipovima ćelija, poput DC, MF i B limfocita. Nakon obrade proteinskih antigena od strane APC-a dolazi do prikazivanja antigenskih peptida na svojoj površini, u sklopu MHC molekula I klase kada je reč o endogenim (unutarćelijskim) peptidima ili MHC molekula II klase u slučaju egzogenih (vanćelijskih) peptida (Bonilla i Oettgen, 2010). Uz angažovanje kostimulatornih i adhezivnih molekula u okviru imunološke sinapse u zoni kontakta APC i T limfocita, dolazi do aktivacije određenih subpopulacija T ćelija, u zavisnosti od klase MHC molekula. Citotoksične T ćelije (T<sub>c</sub>, prevashodno CD8<sup>+</sup>) aktiviraju se interakcijom sa MHC I molekulima na ciljnim ćelijama (koje su inficirane stranim agensima ili maligno i hemijskim putem transformisane) i uključene su u njihovo uništavanje. Nakon aktivacije CD8<sup>+</sup> T ćelija, dolazi do njihove klonske ekspanzije, oslobađanja perforina i granzima, i posledičnog liziranja ciljnih ćelija. Pomoćničke T ćelije (T<sub>H</sub>, CD4<sup>+</sup>) imaju ulogu u uspostavljanju i povećanju obima imunskog odgovora i određivanju adekvatnog odgovora, tako što usmeravaju druge ćelije ka njihovim specifičnim funkcijama. T<sub>H</sub> ćelije su pod restrikcijom MHC molekula druge klase, nakon čega oslobađaju citokine koji utiču na mnoge tipove ćelija, uključujući i APC koje ih aktiviraju po čemu su i funkcionalno podeljene u nekoliko podklasa. T<sub>H</sub>1 pomoćničke T ćelije karakterišu se produkcijom IFN-γ, koji aktivira baktericidne aktivnosti MF i obezbeđuje odbranu od unutarćelijskih patogena. Produkcijom IL-4, IL-5 i IL-13 karakteriše se T<sub>H</sub>2 odgovor, uključen u aktivaciju i/ili regrutovanje B limfocita, koji proizvode IgE antitela, mast ćelija i eozinofila, učestvujući tako u inflamatornim procesima astme i alergijskim reakcijama. Pored ove dve klase T ćelija, postoje i T<sub>H</sub>17 T ćelije koje proizvode citokine poput IL-17 i IL-22, i imaju ulogu u inflamaciji tkiva i aktivaciji neutrofila u odgovoru na vanćelijske patogene (Abbas i drugi, 2014d). Iako većina efektorskih CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelija umire apoptozom nakon

uklanjanja infektivnog agensa, jedan mali deo ovih ćelija preživljava i naseljava periferna tkiva kao memorijske T ćelije. U odgovoru na antigene, memorijske T ćelije mogu mnogo brže da proliferišu u poređenju sa naivnim (prvi put se sudeću sa određenim antigenom) T ćelijama i da dovedu do produkcije citokina i nastanka efektorskih ćelija (Gebhardt i drugi, 2011; Pepper i Jenkins, 2011; Marshall i drugi, 2011; Hale i drugi, 2013; Pepper i drugi, 2011). Još jedna subpopulacija CD4<sup>+</sup> T ćelija jesu regulatorne T (Treg) ćelije zadužene za održavanje tolerance na sopstvene antigene, završetak (kontrakciju) imunskog odgovora i ograničavanje štetnih imunskih odgovora na sopstvene i strane antigene (Sakaguchi i drugi, 2008). Naime, Treg ćelije mogu da suprimiraju proliferaciju naivnih T ćelija i njihovu diferencijaciju u efektorske ćelije, kao i da suprimiraju efektorske aktivnosti T ćelija, NKT ćelija, B limfocita, MF-a i DC-a (von Boehmer, 2005; Shevach, 2006; Miyara and Sakaguchi, 2007; Tang i Bluestone, 2008) oslobađanjem imunosupresivnih citokina (IL-10, IL-35 i TGF- $\beta$ ) (Lafaille, 1998), direktnim ćelijskim kontaktom sa ciljnim ćelijama i funkcionalnim modifikacijama/ubijanjem ćelija (Read i drugi, 2000; Pandiyan i drugi, 2007; Tang i Bluestone, 2008).

Adaptivna imunost pored T ćelija posredovana je i B ćelijama, jednim ćelijama koje poseduju sposobnost produkcije antitela. Ove ćelije nastaju i funkcionalno sazrevaju u kostnoj srži, dok su kao zrele ćelije uglavnom lokalizovane u limfnim folikulima sekundarnih limfnih organa. Nakon aktivacije antigenom (proteinskim ili neproteinskim) dolazi do njihove proliferacije i diferencijacije u efektorske (plazma) ćelije koje luče antitela sa različitim efektorskim funkcijama poput IgM (aktivacija komplementa), IgG (aktivacija fagocita, komplementa i neonatalne imunosti), IgE (odbrana od helminata) i IgA (mukozna imunost) (Abbas, 2014e).

### 1.6.2. Imunotoksičnost kadmijuma

Toksični efekti Cd na imunski sistem prepoznati su krajem 20. veka, nakon etioloških studija (Descotes, 1992; Stelzer i Pazdernik, 1983; Bernier i drugi, 1995). U zavisnosti od korišćenog eksperimentalnog sistema (*in vivo* ili *in vitro*), puta njegove primene, korišćene vrste (čovjek ili eksperimentalne životinje) i perioda izlaganja (akutno, subhronično, hronično), kao i vrste ispitivanog tkiva ili ćelije, ovaj metal može da dovede do različitih efekata na imunski sistem (Olszowski i drugi, 2012). Kako je produkcija citokina i hemokina regulisana je od strane NF- $\kappa$ B i AP-1 (Daffada i drugi, 1994), transkripcionih faktora koji su redoks-senzitivni, sugerise se da Cd promenom ćelijskog redoks statusa može indirektno da indukuje ekspresiju proinflamatornih citokina i hemokina (Dong i drugi, 1998). Međutim, pored imunostimulatornih, pokazano je da Cd može da ispolji i imunosupresivne efekte.

Diferencijalni efekat Cd pokazan je kod ljudi koji su profesionalno izloženi ovom metalu, usled povećanja broja limfocita, a smanjenja broja neutrofila u perifernoj krvi (Ciarrocca i drugi, 2015). Da efekat Cd zavisi od ispitivane ćelijske funkcije, pokazano je u *in vitro* studijama na polimorfonuklearnim ćelijama periferne krvi ljudi, gde je Cd povećao oksidativnu aktivnost (Amoruso i drugi, 1982; Zhong i drugi, 1990) i adheziju ovih ćelija, dok je sa druge strane ispoljio inhibični efekat na sposobnost ovih ćelija da vrše fagocitozu (Baginski, 1985). Da efekat Cd zavisi i od doze, pokazano je u *in vitro* studijama nakon izlaganja ćelijske linije makrogafa miša (RAW264.7) niskoj dozi Cd (0.1  $\mu$ M) u trajanju od 90 min i 120 min, gde je došlo do aktivacije ovih ćelija i produkcije TNF- $\alpha$  (García-Mendoza i drugi, 2019), dok je primena više doze Cd (3  $\mu$ M), uz duži period izlaganja ovom metalu (24h), doveo do pada u produkciji TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  (Jin i drugi, 2016). Inhibični efekat Cd pokazan je i na MC/9 ćelijskoj liniji mast ćelija (smanjena produkcija TNF- $\alpha$  i oslobađanje histamina) (García-Mendoza i drugi, 2019). Da efekat Cd zavisi od doze, pokazano je i *in vivo*, nakon oralnog unosa ovog metala u formi CdCl<sub>2</sub> u trajanju od mesec dana. Niže doze (5 i 10 ppm) Cd dovele

su do smanjenja, a više doze (25, 50 i 100 ppm) do povećanja broja B i T ćelija u perifernoj krvi pacova (Lafuente i drugi, 2004).

Nakon akutne primene kadmijuma (intraperitonealno) kod pacova uspostavlja se zapaljenjska reakcija na sistemskom nivou koju karakteriše povećanje broja granulocita u krvi i povećane koncentracije proinflammatoryh citokina (IL-6 i TNF- $\alpha$ ) u plazmi (Kataranovski i drugi, 1998). Međutim, smanjenje broja limfocita u perifernoj krvi pacova u istom modelu akutne intoksikacije (Kataranovski i drugi, 1998) ukazalo je na imunosupresivni potencijal Cd. Sa druge strane, *in vivo* studija pokazala je da akutni tretman subletalnom dozom (1 mg/kg) Cd vodi ka povećanju gena za IL-1 $\beta$ , a smanjenja za TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  i IL-17 (Djokic i drugi, 2015) u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, a sa druge strane do pada nivoa iRNK za IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6 u granulocitima periferne krvi (uz povećanje produkcije TNF- $\alpha$ ), uz povećanu aktivnost mijeloperoksidaza (MPO) i oslobađanje ROS i NO od strane ovih ćelija (Djokic i drugi, 2014). Inhibicija produkcije proinflammatoryh citokina (IL-1 $\beta$ ) (Marth i drugi, 2001; Theocharis i drugi, 1994), TNF- $\alpha$  (Boscolo i drugi, 2005; Marth i drugi, 2001), i IFN- $\gamma$  (Boscolo i drugi, 2005) pokazan je 24h nakon izlaganja Cd ( $\geq 10^{-5}$  M). Ipak, diferencijalni efekat Cd na produkciju nekih od ovih citokina (povećanje TNF- $\alpha$ , a izostanak efekta na IFN- $\gamma$ ) od strane monocita periferne krvi, takođe je zapažen (Maria i drugi, 2000). Povećanje produkcije IL-8 i IL-6 uočen je nakon *ex vivo* izlaganja ovih ćelija Cd (Horiguchi i drugi, 1993).

Kadmijum putem cirkulacije dospeva u ostala tkiva i organe, pre svega do jetre i bubrega. Studije akutne hepatotoksičnosti Cd kod laboratorijskih sojeva pacova i miševa pokazale su da u oštećenom tkivu jetre dolazi do infiltracije inflamatornih ćelija, većinom neutrofila, (Hoffmann i drugi, 1975; Dudley i drugi, 1982; Theocharis i drugi, 1991), kao i ekspresije brojnih gena za akutno-fazne proteine i inflamatorne citokine, u prvom redu TNF- $\alpha$  (Kayama i drugi, 1995a), i hemokine (Rikans i Yamano, 2000). Tretman BNLCL.2 ćelija jetre sa CdCl<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) dovodi do povećanja ekspresije IL-6 (Lee i Lim, 2011). Povećan inflamatorni odgovor ćelija bubrega nakon primene Cd, zapažen je u *in vivo* (povećanje IL-6 i TNF- $\alpha$ ) (Kayama i drugi, 1995b) i *in vitro* (povećanje IL-6 i IL-8) studijama (Rajendran i drugi, 2016).

Osim u jetri i bubrezima, kao primarnim ciljnim organima, Cd se deponuje i u slezini (Ohsawa i drugi, 1986) i značajan broj studija je ispitivao njegove efekte na imunske odgovore u ovom organu. Subhronično (10 nedelja) oralno izlaganje pacova Cd (32 ppm), dovelo je do smanjenja broja ćelija slezine i do blagog porasta broja Treg ćelija, kao i povećane produkcije IFN- $\gamma$  i IL-10 od strane T ćelija (Turley i drugi, 2019). Takođe, podaci *in vivo* su pokazali porast (Malavé i de Ruffino, 1984; Ohsawa i drugi, 1986), smanjenje (Dan i drugi, 2000; Pathak i Khandelwal, 2007) ili izostanak efekta (Müller i drugi, 1979) Cd na odgovore B ćelija i promenu broja i podtipova T ćelija u slezini. Istraživanja *in vitro* su ukazala na supresiju odgovora T ćelija kao odgovor na Cd (DeGagné i drugi, 2006; Feng i drugi, 2001; Pathak i Khandelwal, 2008). U radu Demenesku i drugi (2014) akutni tretman Cd doveo je do porasta urođeno imunskih aktivnosti ćelija slezine (porast IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i NO, kao i povećanje aktivnosti MPO usled infiltracije neutrofilnih leukocita), uz smanjenje proliferacije T limfocita i produkcije IFN- $\gamma$  (Demenesku i drugi, 2014), što pokazuje kompleksnost imunomodulatornih efekata Cd.

Da Cd ostvaruje imunotoksični efekat i na distalna tkiva, poput pluća, pokazala je i studija gde je akutna primena ovog metala (0.5 mg/kg and 1.0 mg/kg) povećala broj neutrofila i aktivirala odgovor ćelija pluća (redukcija NBT, povećanje MPO i IL-6 (Kataranovski i drugi, 2009). Sa druge strane, hronična primena Cd (5 ppm i 50 ppm) povećala je inflamatorni odgovor analiziran u homogenatima pluća, kao i na nivou izolovanih ćelija ovog tkiva (povećanje MPO i IFN- $\gamma$ ) (Kulas i drugi, 2019).

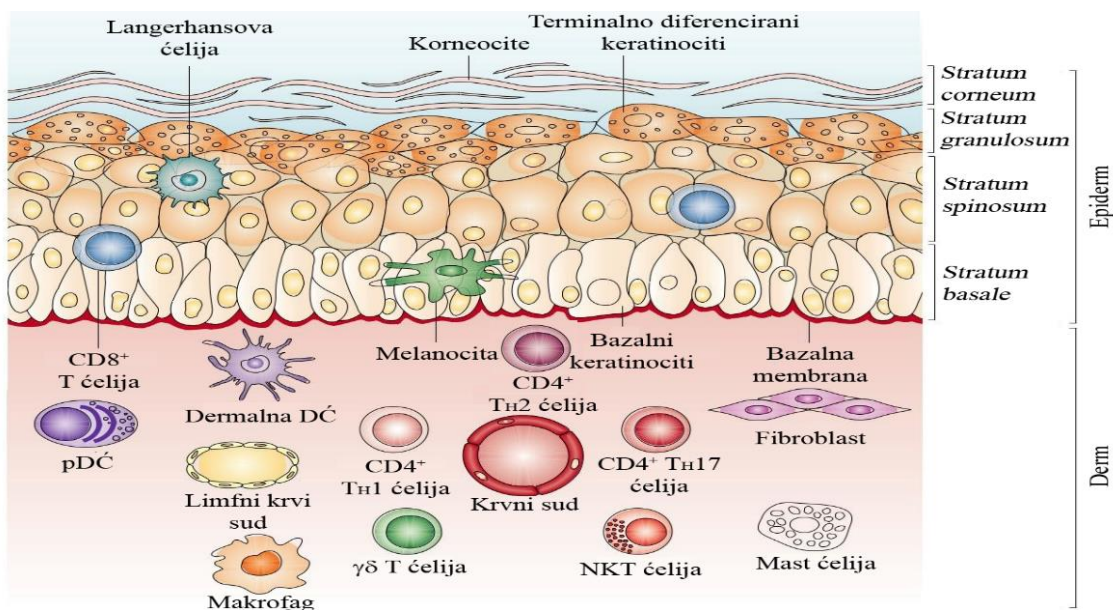
Imunotoksičnost Cd ispitana je i na crevni imunski sistem, pre svega *in vitro* studijama na Caco-2 ćelijskoj liniji, gde je zapažen proinflammatory efekat Cd putem stimulacije produkcije IL-8 (Hyun i drugi, 2007). Negativan uticaj Cd na crevo pokazan je u studiji Breton i drugi (2013) gde je oralni unos metala smanjio ekspresiju gena za proinflammatory (IL-1 $\beta$ , TNF i IFN- $\gamma$ ) i antiinflammatory (IL-10 i TGF- $\beta$ ) citokine u duodenumu miša. Sa druge strane, oštećenje tkiva i intestinalna inflamacija zapaženi



su nakon oralnog unosa Cd (5 ppm i 50 ppm) kod pacova, sudeći po promenama u homogenatima creva (povećanje HMGB1, SOD, CAT, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  i IL-17) i mezenteričnim LC (povećanje IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  i IL-17, uz smanjenje IL-10) (Ninkov i drugi, 2015).

## 1.7. Imunski sistem kože

Kao primarna granica između organizma i spoljašnjeg okruženja, koža obezbeđuje prvu liniju odbrane od patogenih mikroorganizama, fizičkih i hemijskih činilaca, ne samo kao fizička barijera već i kao aktivni imunski organ (Guttman-Yassky i drugi, 2019). Dva glavna odeljka kože jesu epiderm (površinski sloj) i derm (srednji sloj), dok treći sloj čini potkožno masno tkivo. U epidermu se, pored keratinocita kao najzastupljenijih ćelija ovog sloja (preko 90 %) (McGrath i drugi, 2004) nalaze i melanociti, Langerhansove ćelije (LC) i T ćelije. Derm je anatomski komplikovaniji, sa većom ćelijskom raznovrsnošću i čine ga fibroblasti, DC, MF, NKT ćelije, mast ćelije i različite subpopulacije T ćelija (Slika 2) (Nestle i drugi, 2009). Ovaj sloj kože drenira se limfnim i vaskularnim krvnim sudovima kojima je omogućena kretanje ćelija koje imaju sposobnost migracije (Nickoloff, 2019).



Slika 2. Građa kože i efektorske ćelije (Modifikovano prema Nestle i drugi, 2009)

### 1.7.1. Barijerna funkcija kože

Barijerna funkcija kože uglavnom je posredovana ćelijama stratifikovanog sloja epiderma kože, keratinocitima, zahvaljujući tesnim vezama koje formiraju i adhezionim molekulima (Kubo i drugi, 2013), kao i lipidnom omotaču koji povećava njihovu čvrstinu (Madison, 2003) i fizički sprečava prolazak toksičnih agenasa i mikroorganizama kroz kožu, transepidermni gubitak vode i dehidraciju kože (Kubo i drugi, 2013; Nestle i drugi, 2009; Brandner i drugi, 2002). Još jedan vid zaštite kože predstavlja produkcija antimikrobnih peptida (AMP) i lipida kao što su defenzini i katelicidini (Niyonsaba i drugi, 2017; Niyonsaba i drugi, 2006; van Smeden i Bouwstra, 2016), koji, osim uloge u

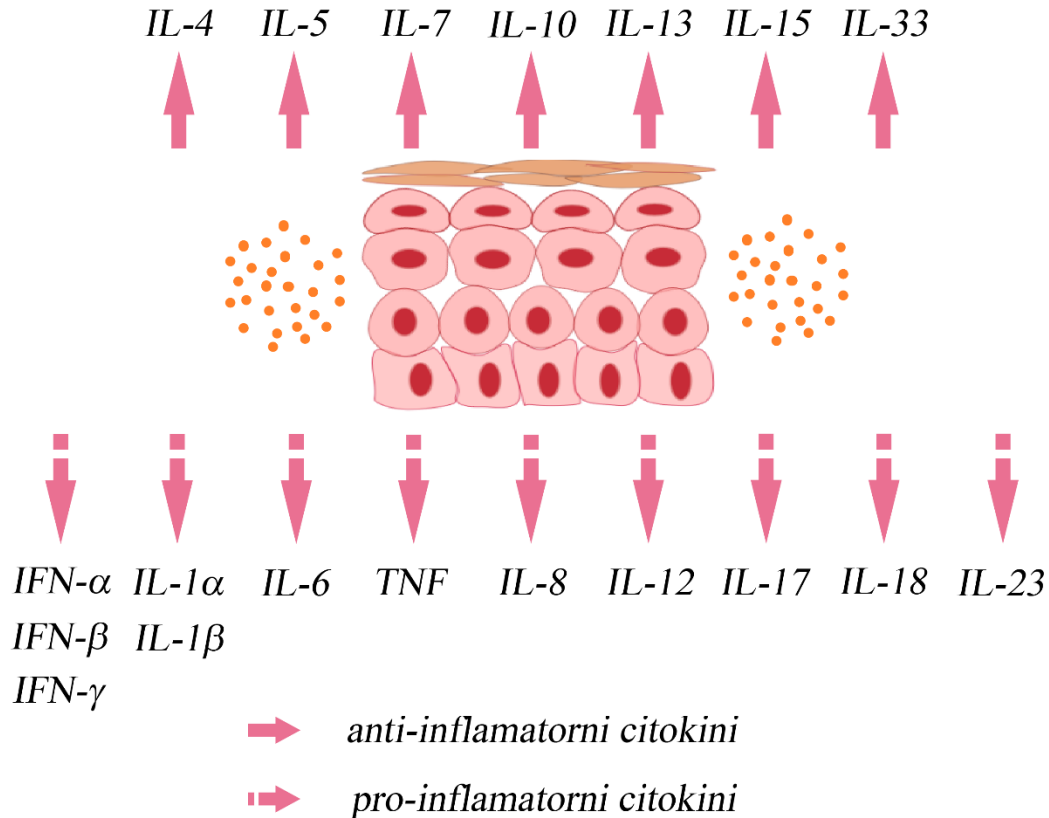
direktnoj eliminaciji mikroorganizama, imaju i sposobnost da modulišu imunski odgovor (Davidson i drugi, 2004). U najvećoj meri ih produkuju keratinociti, ali i ćelije derma poput fibroblasta, DĆ, monocita i makrofaga (MF), ćelija znojnih i sebaceoznih žlezda (Niyonsaba i drugi, 2017; Niyonsaba i drugi, 2006). Kao još jedan vid zaštite, koža poseduje i receptore za hemijske signale, poput aril-ugljovodoničnog receptora (Aryl Hydrocarbon Receptor, AHR) (Schmidt i Bradfield, 1996; Romani i drugi, 2010) koji se eksprimira u epidermnim i dermnim ćelijama kože (Frericks i drugi, 2007), gde nakon vezivanja za ligand pokreće transkripciju gena koji sadrže elemente koji omogućavaju odgovor na ksenobiotike (engl. AHR Xenobiotic Responsive Elements, XREs) u svojim promotorima (Abel i Haarmann-Stemann, 2010; Schmidt i Bradfield, 1996). Dodatno, pokazano je da ekspimiranje ovog receptora na keratinocitima doprinosi sprečavanju transepidermnog gubitka vode (Haas i drugi, 2016).

### 1.7.2. Struktura i imunske ćelije epiderma

Epiderm grade četiri sloja: *stratum basale* (bazalni sloj), *stratum spinosum* (spinozni sloj), *stratum granulosum* (granulozni sloj) i *stratum corneum* (rožni sloj) (Slika 2). Najdublji sloj epiderma, *stratum basale*, odgovoran je za kontinuirano obnavljanje ćelija i sastoji se samo od jednog sloja nediferenciranih keratinocita koji imaju sposobnost kontinuiranog umnožavanja (Nestle i drugi, 2009). Bazalni keratinociti nakon diferencijacije migriraju u sledeći gornji sloj, *stratum spinosum*, gde započinju proces sazrevanja tokom kojeg menjaju svoju formu, prelaze iz stubičastog u poligonalni oblik i počinju da sintetišu keratin. Keratinociti trećeg sloja epiderma, *stratum granulosum*, karakterišu se tamnim nakupinama citoplazmatskog materijala (engl. dark clumps) i aktivno produkuju keratin i lipide. Kao krajnji produkt sazrevanja keratinocita, nastaje *stratum corneum*, spoljašnji sloj epiderma gde se nalaze terminalno diferencirani keratinociti (korneocite) (Hsu i drugi, 2014), mrtve ćelije poreklom od keratinocita bazalnog sloja koje ne poseduju organele (Proksch i drugi, 2008).

Iako keratinociti, zajedno sa fibroblastima, ne pripadaju imunskim ćelijama, one imaju sposobnost da sa njima interaguju, da prepoznaju patogene i stoga posreduju u imunskim odgovorima gde diskriminišu bezopasne, komensalne organizme od štetnih patogena (Nguyen i Soulika, 2019). Kao i druge eukariotske ćelije, keratinociti prepoznaju produkte mikroorganizama pomoću svojih PRR-ova (Bitschar i drugi, 2017) i pokazano je da ove ćelije ekspimiraju kako površinske (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 i TLR6) tako i unutarćelijske (TLR3 i TLR9) TLR (Lebre i drugi, 2007), kao i NLR receptore pomoću kojih mogu da prepoznaju PAMP i DAMP. Ekspresija TLR na keratinocitima ključna je za započinjanje imunskog odgovora kože, s obzirom da aktivacija ovih receptora na humanim keratinocitima vodi predominantno ka T<sub>H</sub>1-tipu imunskog odgovora i produkciji IFN-a tip I (Miller i Modlin, 2007). Aktivacijom ovih receptora dolazi do sklapanja inflamazoma, koga čine NLR, adaptorski protein ASC (engl. Apoptosis associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain) i pro-kaspaza 1, čiji je rezultat obrada pro-IL-18 i stvaranja biološki aktivnih formi ovih citokina (Martinon i drugi, 2009). Do aktivacije inflamazoma u keratinocitima dolazi i pod delovanjem ultravioletnog (UV) zračenja kod ljudi (Feldmeyer i drugi, 2007; Keller i drugi, 2008) i nakon dermalnog kontakta sa haptanima (kontaktni alergeni) (Watanabe i drugi, 2007). Studije su pokazale da keratinociti mogu da deluju kao neprofesionalne APC, usled ekspresije MHC II molekula, (Nickoloff i Turka, 1994), da obrade i prezentuju peptidne antigene memorijskim CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelijama i da aktiviraju funkcionalne odgovore u njima (Black i drugi, 2007). Pored svoje uloge u prezentaciji antigena, keratinociti produkuju širok spekatar imunoregulatornih proteina, citokina i hemokina koji doprinose efikasnom imunskom odgovoru kože. Privlačenje ćelija u kožu od strane keratinocita odigrava se putem hemokina, CCL20 za LĆ (Dieu-Nosjean i drugi, 2000), CCL20, CXCL9, CXCL10 i CXCL11 za efektorske T ćelije i CXCL8, hemoatraktanta neutrofila (Albanesi i drugi, 2005). Keratinociti konstitutivno, ili nakon aktivacije, produkuju proinflamatorne (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ,

IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, TNF- $\alpha$ ), kao i antiinflamatorne/regulatorne (IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-13, IL-15, IL-33) citokine (Slika 3) (Albanesi i drugi, 2005; Grone, 2002; Noske, 2018). Produkcija citokina od strane keratinocita utiče na migraciju inflamatornih ćelija kao i na proliferaciju i diferencijaciju samih keratinocita (Grone, 2002).



**Slika 3. Produkcija citokina od strane keratinocita**

Pored keratinocita, specijalizovane ćelije epiderma čine Langerhansove ćelije (LĆ) kao glavne rezidentne imunske ćelije kože, poreklom iz kostne srži, koje funkcionišu kao profesionalne APC. Studije na miševima pokazale su da su LĆ preko EpCAM (engl. Epithelial Cell Adhesion Molecule, CD326) čvrsto vezane za E-kadherine iskazane na površini epidermih ćelija, tokom homeostaze. Nakon aktivacije keratinocita putem PAMP ili DAMP, povećava se ekspresija kostimulatornih molekula, raskidaju se veze između E-kadherina i EpCAM i LĆ migriraju u drenirajuće limfne čvorove (dLČ) kože (Deckers i drugi, 2018; Choi i drugi, 2018; Mayumi i drugi, 2013). Tamo će LĆ prezentovati obrađene antigene naivnim CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T ćelijama (zahvaljujući ekspresiji MHC I tj MHC II molekula, redom) (Hunger i drugi, 2004) i obezbediće im i signale (IL-12, IL23) neophodne za nastanak specifičnih subpopulacija T ćelija. Na ovaj način LĆ obezbeđuju razvoj adekvatnog imunskog odgovora, specifično usmerenog ka ciljnom patogenu (Romani i drugi, 2010).

Pokazano je da zdrava koža sadrži više od  $2 \times 10^{10}$  rezidentnih T ćelija, što je dvostruko više u odnosu na broj T ćelija u krvi (Clark i drugi, 2006). U epidermu se uglavnom nalaze citotoksične (CD8<sup>+</sup>) T ćelije, raspoređene u bazalnom i suprabazalnom sloju keratinocita, blizu LĆ (Foster i drugi, 1990). Pokazano je da se radi o memorijskim ćelijama, koje su strateški raspoređene kao prva linija

odbrane nakon ponovnog izlaganja istom antigenu (Boyman i drugi, 2007).

U koži se nalazi subpopulacija Treg ćelija usled njihovih interakcija sa LC i dermalnim DC (dDC), usled čega su lokalizovane i u epidermu i u dermu kože. Migracija Treg ćelija u kožu vrši se tokom neonatalnog perioda zahvaljujući ekspresiji CCR4, CD103, i kožnog limfocitnog antigena (engl. Cutaneous lymphocyte antigen, CLA) (Ali i drugi, 2017) i kod adultnih jedinki ljudi pokazano da ove ćelije čine čak 20 % rezidentnih CD4<sup>+</sup> T ćelija kože (Wolff i drugi, 2012). Nakon povrede, u epidermu dolazi do akumulacije Treg ćelija koje visoko ekspimiraju receptor epidermalnog faktora rasta (engl. Epidermal growth factor receptor), gde učestvuju u zarastanju rane i reepitelizaciji tkiva aktivacijom MF (Nosbaum i drugi, 2016).

Pored konvencionalnih T ćelija, epiderm u manjem broju naseljavaju i nekonvencionalne T ćelije, poput  $\gamma\delta$  T ćelija (1-10%). Ovoj grupi ćelija pripadaju DETC (engl. Dendritic Epidermal T Cells) koje imaju ulogu u regulaciji homeostaze epiderma (Jameson i drugi, 2004; Sharp i drugi, 2005) usled njihovog bliskog fizičkog kontakta sa keratinocitima (Matsue i drugi, 1993). Aktivirane DETC proizvode IL-2, IL-3, GM-CSF, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , kao i IL-17A za koji je pokazano da ima ulogu i u zarastanju rane (MacLeod i drugi, 2013).

### 1.7.3. Struktura i imunske ćelije derma

Za razliku od epiderma, u dermu su većinom lokalizovane CD4<sup>+</sup> T ćelije, grupisane oko postkapilarnih venula, ispod granice epiderma i derma. Tokom različitih inflamatornih bolesti kože detektovana su sve tri subpopulacije ovih ćelija (T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub>) u dermu. Nakon infekcije kože sa unutarćelijskim patogenima aktiviraju se T<sub>H1</sub> ćelije koje proizvode IFN- $\gamma$  i aktiviraju MF kako bi se uklonila infekcija, dok se T<sub>H2</sub> odgovor i produkcija IL-4 i IL-13 pre svega, povezuju sa atopijskim dermatitisom. T<sub>H17</sub> ćelije i njihova produkcija IL-17 se povezuju u poslednje vreme sa psorijazom (Marinoni i drugi, 2014) i atopijskim dermatitisom, a smatra se i da su esencijalne za prvu liniju odbrane od infekcija bakterijama i gljivama (Weaver i drugi, 2007). Iz kože pacijenata obolelih od atopijskog dermatitisa, izolovana je još jedna subpopulacija cirkulišućih T ćelija, T<sub>H22</sub> ćelije, koje imaju potencijal da migriraju u kožu i da proizvode IL-22, ali ne i IL-17 ili IFN- $\gamma$  (Nogralles i drugi, 2009).

NKT ćelije ekspimiraju  $\alpha\beta$  TCR sa ograničenim repertoarom i imaju sposobnost prepoznavanja lipidnih antigena (Wolf i drugi, 2015; Godfrey i drugi, 2000), i kod ljudi u ranoj fazi aktivacije proizvode i T<sub>H1</sub> i T<sub>H2</sub> citokine, dok tokom kasnije faze aktivacije predominantno proizvode proinflamatorne citokine IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Pored uloge ovih ćelija u odbrani od tumora i alergija, pokazano je da imaju aktivnu ulogu u bolestima kože, poput kontaktne preosetljivosti, atopijskog dermatitisa i psorijaze (Balato i drugi, 2009).

Iako su u većoj meri zastupljene u epidermu,  $\gamma\delta$  T ćelije nalaze se i u dermu (2-9%) (O'Brien i Born, 2015) kože i poseduju veću pokretljivost u poređenju sa DETC ( $\gamma\delta$  T ćelije epiderma) koje su tokom homeostaze u bliskom kontaktu sa keratinocitima. Funkcija  $\gamma\delta$  T ćelija derma tokom inflamatornih procesa ogleda se u produkciji IL-17 (Gray i drugi, 2011) što je pokazano u brojnim bolestima kože, poput psorijaze (van der Fits i drugi, 2009; Mabuchi i drugi, 2013).

DC čija je lokalizacija u dermu, nazivaju se dDC i na sličan način kao i LC imaju sposobnost da migriraju u limfne čvorove i da kao profesionalne APC pokrenu adaptivne imunske odgovore (Hain i drugi, 2019; Tomura i drugi, 2014). Postoji više subpopulacija ovih ćelija od kojih jedni pokreću T<sub>H1</sub> odgovore (Segura i drugi, 2012), dok se druge dDC povezuju sa aktivacijom T<sub>H2</sub> i T<sub>H17</sub> ćelijama (Flores-Langarica i drugi, 2018; Gao i drugi, 2013; Kumamoto i drugi, 2013; Murakami i drugi, 2013). Pokazana je i njihova uloga u održavanju homeostatskih interakcija između ćelija domaćina i rezidentnih, komensalnih bakterija kože (Naik i drugi, 2015). Još jedna subpopulacija DC jesu

plazmacitoidne DC<sup>+</sup> (pDC<sup>+</sup>), pronađene u koži isključivo pod inflamatornim uslovima, gde masovno proizvode IFN- $\gamma$  (Kashem i drugi, 2017).

Iako je primarna funkcija fibroblasta sinteza kolagenih i elastičnih vlakana u vanćelijskom matriksu (Kalluri i Zeisberg, 2006; Parsonage i drugi, 2005; Tomasek i drugi, 2002), usled aktivacije svojih PRR-ova, ove ćelije mogu da proizvode serum amiloid-A (Morizane i drugi, 2019) za koji se smatra da aktivira produkciju proinflamatornih citokina od strane mnogih imunskih ćelija (Eklund i drugi, 2012). Dok keratinociti i fibroblasti mogu u istoj meri da proizvode citokine poput IL-1 $\beta$ , fibroblasti u mnogo većoj meri proizvode IL-6 i tako pojačavaju inflamatorne odgovore u koži, a nakon izlaganja toplotnom stresu pokazano je mogu da proizvode i druge citokine u koži, kao što su TNF- $\alpha$ , IL-8 i IL-25 (Jiang i drugi, 2018).

Do sada su identifikovana dva glavna izvora dermalnih MF, embrionski progenitori koji se nalaze u koži prenatalno (Guilliams i drugi, 2014) i cirkulišući monociti koji nakon sazrevanja dospevaju u kožu (Sheng i drugi, 2015). Monociti od kojih nastaju MF ekspimiraju limfocitni antigen 6C (Ly6C) i u kožu odlaze preko svog hemokinskog receptora, CCR2 (Malissen i drugi, 2014), dok se nakon njihovog sazrevanja u rezidentne MF, smanjuje njegova ekspresija (Tamoutounour i drugi, 2013). Pokazano je da MF izolovani iz zdrave kože imaju visoku ekspresiju CD63, DC-SIGN (CD 209) i IL-10, sugerišući da mogu da prilagode svoj fenotip u imunoregulatorni (Tamoutounour i drugi, 2013; Lonati i drugi, 1996). Ove ćelije odlikuje velika plastičnost, ali se mogu klasifikovati u dve subpopulacije prema svojim efektorskim funkcijama, kao „M1“ i „M2“ MF. M1 MF se odlikuje produkcijom inducibilne azot-oksida sintaze (iNOS) i proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6) (Mills, 2015; Mills i Ley, 2014), dok M2 MF proizvode antiinflamatorne citokine (IL-4, IL-10, IL-13 i TGF- $\beta$ ) (Zhang i drugi, 2018) i/ili imaju ulogu u reparaciji kože nakon fibroze tkiva. Međutim, ovakva striktna podela MF važi za *in vitro* uslove, dok MF *in vivo* mogu istovremeno da ekspimiraju M1 i M2 markere (Ohji i drugi, 1993).

Mast ćelije kao progenitori iz kostne srži dospevaju u derm kože (Liu i drugi, 2010) gde sazrevaju pomoću ćelijskih faktora poreklom od keratinocita, dok se njihova proliferacija odigrava kao posledica delovanja T<sub>H</sub>2-citokina- IL-3, IL-4, IL-9 i IL-10 (Hultner i Moeller, 1990; Thompson-Snipes i drugi, 1991). Najpoznatija uloga mastocita je u alergijskim reakcijama gde proizvode velike količine histamina (Shi i drugi, 2018; Hirano i drugi, 2018). Dodatno, ove ćelije proizvode velike količine prostaglandina D2 (PGD2), medijatora inflamacije za kojeg je pokazano da poseduje proinflamatornu (Fajt i drugi, 2013) i antiinflamatornu (Murata i drugi, 2013) ulogu, kao i leukotrijena koji imaju ulogu u privlačenju neutrofila (Lammermann i drugi, 2013), a koji povratno dovode do degranulacije mast ćelije. Sintaza citokina (IL-33, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-5, IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-13 ) od strane aktiviranih mast ćelija posledica je aktivacije transkripcije gena pomoću NF- $\kappa$ B (Lorentz i drugi, 2000).

Pokazano je da kožu naseljavaju i rezidentni eozinofili (Yu i drugi, 2016; Ramirez i drugi, 2018). Ne zna se puno o njihovoj ulozi u homeostazi, dok je njihova uloga bolje proučena u dermatozama i kožnim oboljenjima povezanih sa eozinofilijom (ACD i urtikarija), gde dovode do lokalnog oštećenja tkiva. Poput mast ćelija, eozinofili proizvode i PGD2 (Luna-Gomes i drugi, 2011) koji dovodi do njihove infiltracije u kožu tokom atopijskog dermatitisa (He i drugi, 2010).

#### 1.7.4. Potkožno masno tkivo kože

Odmah ispod derma nalazi se potkožno masno tkivo, koje se pretežno sastoji od fibrocita i adipocita. Adipozno tkivo kože skladišti energiju u formi masnih kiselina i funkcioniše kao endokrini organ važan za homeostazu glukoze i metabolizam lipida (Driskell i drugi, 2014; Rodrigues i drugi, 2019). Usled razvoja patoloških stanja kože, brojne imunске ćelije infiltriraju u ovo tkivo gde proizvode različite faktore rasta, citokine i adipokine (Cildir i drugi, 2013).

### 1.7.5. Mikrobiom kože

Komensalni organizmi poput bakterija, gljiva i virusa nalaze se u epidermu i dermu kože gde grade dodatni zaštitni sloj domaćina (Oh i drugi, 2016) i učestvuju u homeostazi imunskog sistema (Belkaid i Harrison, 2017) i modulaciji ekspresije gena (Meisel i drugi, 2018). Ubrzo nakon rođenja, mikrobiom kolonizuje kožu (Scharschmidt i drugi, 2015) i učestvuje u regulaciji invazije ovog tkiva od strane patogenih mikroorganizama (Shi i drugi, 2018), sekrecijom sopstvenih antimikrobnih supstanci (baktericina) koje inhibiraju njihov rast (Gallo i Nakatsuji, 2011).

Glavni komensalni mikroorganizmi kože jesu *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) i *Cutibacterium acnes* (ranije *Propionibacterium acnes*) (*C. acnes*) (Christensen i Bruggemann, 2014). Da komensalne bakterije mogu da manipulišu imunskim odgovorom u koži, potvrđuje studija Cogen i drugih (2010), koja je pokazala da *S. epidermidis* može da sekretuje delta toksin koji indukuje formiranje vanćelijskih zamki neutrofila, kao i da stimuliše produkciju antimikrobnih peptida (AMP) protiv grupe A bakterijskog soja *Streptococcus* (Cogen i drugi, 2010). Lipoteihoična kiselina poreklom iz *S. epidermidis* regrutuje mast ćelije u kožu signalizacijom preko TLR-2 receptora nakon susreta sa virusom kravljih boginja (Wang i drugi, 2012). Dodatno, aktivacijom TLR2 receptora *S. epidermidis* može da poveća produkciju  $\beta$ -defenzina od strane keratinocita (Lai i drugi, 2010). Folikuli dlake takođe su naseljeni komensalnim bakterijama koje mogu da pokrenu produkciju hemokina i citokina od strane keratinocita, promovišući tako privlačenje imunskih ćelija (Adachi i drugi, 2015; Nagao i drugi, 2012). Sojevi bakterija *S. epidermidis* koji razvijaju biofilm na površini kože, stimulišu u većoj meri produkciju antiinflamatornih nego proinflamatornih citokina (Spiliopoulou i drugi, 2012). Spillopoulou i drugi (2012) pokazali su, na humanim makrofagima poreklom od monocita, da se nakon stimulacije od 24h pomoću živih bakterija *S. epidermidis*-a, smanjuje produkcija IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  i IL-12, a povećava produkcija antiinflamatornog citokina IL-13. Da komensali mogu imati ulogu u anti-tumorskoj odbrani, pokazano je sa *S. epidermidis* koji može da produkuje 6-N-hidroksi-aminopurin (6-HAP), suprimirajući na taj način rast melanoma kod C57BL/6 miševa. Dodatno, ovaj soj bakterija može da zaštiti SKH-1 imunodeficientne miševe od UV-indukovane neoplazije (Nakatsuji i drugi, 2018).

Gljive i virusi manje su zastupljeni na koži. Ipak, pokazano je da su pacijenti oboleli od atopijskog dermatitisa, makar u nekoj meri, bili izloženi senzitivizaciji sa kvaščanom gljivom *Malassezia sympodialis* (*M. sympodilais*), ukazujući na ulogu gljiva u razvoju patoloških stanja kože (Mittermann i drugi, 2016). Virusni mikrobiom je manje raznovrstan od bakterijskog, ali opet ispoljava veći diverzitet na koži u poređenju sa gljivama i naseljava zdravu kožu ljudi (Hannigan i drugi, 2017). Najšire rasprostranjen virus jeste polioima virus merkelovih ćelija (MCV), pronađen kod 60 % adulta (Moore i Chang, 2017).

### 1.7.6. Koža i metali

Za najmanje deset metala je pokazano da imaju esencijalne uloge u jednom ili više tipova ćelija kože sisara kao elektroliti, kofaktori i strukturne komponente (Lansdown 1995). Normalni homeostatski mehanizmi i reparacioni sistemi nakon povrede oslanjaju se na ravnotežu jona metala, pa tako njihove previsoke ili suviše niske koncentracije mogu da dovedu do patoloških promena. Glavni esencijalni metal kože jeste cink (Zn), koji se u koži nalazi u količini od oko 2-3 g, što čini otprilike 5 % od ukupne količine ovog metala pronađenog u organizmu (Jackson, 1989). Njegova koncentracija veća je u epidermu nego u dermu i potkožnom tkivu, verovatno jer je ovaj metal neophodan za aktivnu proliferaciju i diferencijaciju keratinocita (Michaelsson i drugi, 1980), što sugerise da Zn učestvuje u formiranju epidermne barijerne funkcije. Poremećaj ove barijerne funkcije indukuje produkciju TH2-

promovišućih citokina od strane keratinocita koji dodatno narušavaju strukturu i funkcionisanje *stratum corneum*-a i tesnih veza i pokreću process inflamacije (Ogawa i drugi, 2018). Zajedno sa Zn, esencijalne funkcije u koži prilikom zarastanja rane ispoljavaju kalcijum (Ca), bakar (Cu) i magnezijum (Mg), od hemostaze (faza 1) preko inflamatorne i proliferative faze (faze 2 i 3) do reorganizacije i vraćanja tkiva u normalno stanje (faza 4). Drugi metali poput mangana (Mn) i silicijuma (Si) prisutni su samo tokom perioda formiranja vezivnog tkiva i njegove rekonstitucije (Bremner, 1987). Pored esencijalnih metala, analitičke studije su otkrile čitav opseg ksenobiotičkih metala u koži, melaninu, kosi i noktima (Chakraborty i drugi, 1983). Značaj ovih jona poput srebra (Ag), arsena (As), Pb, vanadijuma (V), kalaja (Sn) i Cd još uvek nije u potpunosti poznat, zna se samo da su svi potencijalno toksični kada su prisutni u velikim količinama (Hostynek i drugi, 1993; Schroeder i drugi, 1964).

Važnu ulogu u metabolizmu esencijalnih metala, pre svega Zn, ali i ksenobiotičkih metala poput Cd, Ag i Hg, imaju metalotioneini (MT), proteini male molekulske mase bogati cisteinom (oko 6 kDa), koji se visokim afinitetom vezuju za ove dvovalentne katjone (Kagi i Vallee, 1960), i koji poseduju ulogu u homeostazi esencijalnih metala i detoksifikaciji toksičnih metala (Sutherland i drugi, 2010). U koži se, od četiri glavne izoforme MT (MT 1-4) pronađene kod sisara (Kagi i Hunziker, 1989), ekspimiraju tri. MT-1 i MT-2 su u koži ekprimirani najviše u mitotički aktivnim, matičnim ćelijama u bazalnom epitelu epiderma (Lansdown, 2002), dok se MT-4 primarno ekspimiraju u stratifikovanom epitelu kože i jezika (Miles i drugi, 2000). MT-3 se ekspimiraju u neuronima gde inhibira njihov prekomerni rast (Ding i drugi, 2010). Za Cd je pokazano da ima najveću potentnost u indukovanju ekspresije metalotioneina (Kim i drugi, 2008), koja zavisi od doze kao i načina primene ovog metala, kao i da sa njima formira stabilne komplekse u epidermalnim ćelijama (Bremner i Beattie, 1990; Bremner, 1987). Pokazano je da MT kao ne-enzimski molekuli, pripadaju i sistemu antioksidativne zaštite od unutarćelijskog nivoa ROS (Kepinska i drugi, 2018).

#### 1.7.7. Imunske reakcije u koži

Nakon narušavanja homeostatskih imunskih odgovora kože dolazi do razvoja brojnih hroničnih poremećaja ovog tkiva, poput psorijaze, atopijskog dermatitisa (AD) i alergijskog kontaktnog dermatitisa (AKD), bolesti koje imaju veliki socio-ekonomski uticaj. Do razvoja psorijaze i atopijskog dermatitisa dolazi usled poremećaja u urođenoj i adaptivnoj imunosti, uključujući remećenje barijerne funkcije kože (De Cid i drugi, 2009; Palmer i drugi, 2006). Iako se ove dve bolesti odlikuju sličnim histopatološkim promenama (hiperproliferacija epiderma, akantozna i izražena infiltracija T ćelija), izraženiji razvoj  $T_H1$  i  $T_H17$  (Lowes i drugi, 2008) imunskog odgovora zapažen je kod psorijaze, a  $T_H2$  kod atopijskog dermatitisa (Hamid i drugi, 1994). Sa druge strane, kod alergijskog kontaktnog dermatitisa do aktivacije adaptivnog imuniteta i razvoja efektorskih T ćelija dolazi nakon kontakta kože sa određenim haptenom (kontaktnim alergenom (Kimber i drugi, 2002). kao model za ispitivanje mehanizama AKD, koristi se reakcija kontaktne preosetljivosti (Honda i drugi, 2013). Kontaktna preosetljivost (engl. Contact hypersensitivity, CHS) posredovana je T- ćelijskim inflamatornim reakcijama (Krasteva i drugi, 1999) koje se dešavaju na mestu kontakta sa haptanima, malim proteinima koji su sami po sebi slabo imunogeni, ali stiču imunogenost nakon vezivanja za veće proteinske nosače (Lemus i Karol, 2008). Ova reakcija spada u kasni tip preosetljivosti (tip IV), i sastoji se iz dve faze, senzibilizacije i elicitacije, koje su vremenski i prostorne odvojene (Enk i Katz, 1995; Grabbe i Schwarz, 1998). Aferentna faza ili faza senzibilizacije, traje 8-15 dana kod ljudi ili 5-7 dana kod miša i dešava se nakon prvog kontakta kože sa haptenom. Naime, haptent-peptid kompleks preuzimaju DČ kože koje zatim migriraju do dLČ, gde prezentuju haptent u okviru MHC molekula I i II klase naivnim haptent-specifičnim  $CD8^+$  i  $CD4^+$  T ćelijama, redom (Bour i drugi, 1995). Aktivirane haptent-specifične  $CD8^+$  i  $CD4^+$  T ćelije proliferišu i diferenciraju se u memorijske i haptent-specifične



T ćelije. Mali deo haptenspecifičnih T ćelija odlazi iz dLČ u cirkulaciju i počinje da recirkuliše između limfnih organa i perifernih tkiva (kože pre svega) (Lappin i drugi, 1998). Nakon ponovnog izlaganja kože istom haptenu, kod senzibilisanih osoba, dolazi do vidljivih znakova u roku od nekoliko sati. Naime, efektorske i memorijske T ćelije nastale tokom faze senzibilizacije se regrutuju i aktiviraju u dermu, gde pokreću inflamatorni proces odgovoran za nastanak lezija kože, koji traje 72 sata kod ljudi ili 24-48 sati kod miša, nakon čega počinje progresivno da se smanjuje usled fizioloških regulacionih mehanizama. Iako je u nekim eksperimentalnim sistemima pokazano da je reakcija kontaktne preosetljivosti posredovana CD4<sup>+</sup> T ćelijama (Gocinski i Tigelaar, 1990; Wang i drugi, 2000), glavnu ulogu efektorskih ćelija u odgovoru na različite haptene imaju CD8<sup>+</sup> Tlimfociti (Bour i drugi, 1995; Xu i drugi, 1996; Cavani, 2001) koji produkuju IFN- $\gamma$  i IL-17. Zaista, tokom faze senzibilizacije u kontaktnoj preosetljivosti na DNFB (2,4-dinitro-fluorobenezen) nastaju CD8<sup>+</sup> T ćelije u limfnim organima i regrutuju se u kožu nakon ponovnog susreta sa haptenom gde indukuju ACD putem citotoksičnosti (Kehren i drugi, 1999; Akiba i drugi, 2002). Generalno je prihvaćeno da IL-17 (Reeve i drugi, 1999; Aggarwal i Gurney, 2002) i IFN- $\gamma$  igraju važnu ulogu u odgovorima CHS-a i da defekti u signalnim molekulima ovih citokina sprečavaju razvoj ACD-a (Wakabayashi i drugi, 2005; Lu i drugi, 1998). Reakcija kontaktne preosetljivosti našla je primenu u ispitivanju potencijalnih imunotoksičnih efekata različitih agenasa (Duprat, 1989). Naime, iako se za procenu imunotoksičnog potencijala neke supstance pre svega koriste histopatološke analize limfnih organa, neophodno je ispitati efekat na ćelijski imunski odgovor za koji se, pored testa proliferacije limfocita, može koristiti CHS (Descotes, 2010).

#### 1.7.8. Dermatotoksičnost kadmijuma

Kao biomarker profesionalnog ili sredinskog izlaganja ljudi teškim metalima koristi se dlaka (Hughes, 2006; Teresa i drugi, 1997; Sera i drugi, 2002). Istraživanja *in vitro*, na ćelijskim linijama keratinocita, pokazala su da ovaj metal menja njihovo preživljavanje i oksidativni status. Na humanoj liniji keratinocita (HaCaT), pokazano je da visoke doze Cd (50 i 100  $\mu$ M) dovode do povećane smrti ćelija (50 %), oksidacije lipida i proteina, DNK oštećenja i smanjenja aktivnosti katalaze i glutation-peroksidaze. Sa druge strane, nakon tretmana Cd povećava se nivo glutation-reduktaze i GSH, pa se sugeriše da on verovatno ima glavnu ulogu u zaštiti keratinocita od citotoksičnosti Cd (Nzengue i drugi, 2008). Ispitivanje ekspresije MT u istoj ćelijskoj liniji (HaCaT) pokazalo je da dolazi do povećane ekspresije ovih metalovezujućih proteina (Nzengue i drugi, 2009). Poznate su i studije na drugim ćelijskim linijama kože, kao što su primarni humani epidermni keratinociti (NHEK), kod kojih je merenje ćelijske vijabilnosti pokazalo da Cd ispoljava dozno-zavisni citotoksični efekat na ove ćelije (Bae i drugi, 2001). Kako je pokazano da Cd ne dovodi do smrti ćelija putem apoptoze (Nzengue i drugi, 2008), Son i drugi (2011) ispitali su na GFP-LC3 JB6 mišjim epidermnim ćelijama, da li ovaj metal indukuje autofagiju ćelija. Pokazali su da tretman Cd dovodi do smanjenja nivoa unutarćelijskog ROS, aktivira PARP (engl. Poly (ADP-ribose) Polymerase-1) što vodi ka smanjenju energije ćelije i uvodi je u autofagiju.

Nije poznato puno epidemioloških podataka u vezi sa efektom Cd na imunski sistem kože, ali je studija Ritz i drugi (1998) pokazala da kod dece koja imaju povećanu koncentraciju Cd u urinu, dolazi do supresije reakcije preosetljivosti kože na alergene iz vazduha. Sa druge strane, novija studija ukazala je na potencijalnu vezu između Cd i psorijaze, gde je pokazano da pacijenti oboleli od ove bolesti imaju povećanu koncentraciju Cd u krvi, kao i da su učesnici studije koji su imali ozbiljniju kliničku sliku, posedovali i veću koncentraciju Cd u krvi od onih koji su ispoljavali blaže oblike ove bolesti (Liaw i drugi, 2017).

Iako je izloženost Cd putem kože zanemarljiva (ATSDR, 2008), najveći broj podataka o



njegovom dermatotoksičnom efektu *in vivo* dobijeno je iz studija gde je ovaj metal nanošen topikalno na kožu. Pri subletalnim dozama (14 mg/kg i 28 mg/kg) u hroničnom režimu primene kod pacova, Cd dovodi do iritacije derma, poput pojave krasti na koži, alopecije i eritema (Lansdown i drugi, 2001). Miševi kojima je nanošen CdCl<sub>2</sub> na ošišanu kožu leđa, ispoljili su akantozu i hiperkeratozu sa ulcerativnim promenama (Lansdown i Sampson, 1996). Takođe, topikalno nanešen na kožu Cd (1 %) može da uspori proces zarastanja rane ili da dovede do nepotpune reepitelizacije tkiva, putem konstantne infiltracije inflamatornih ćelija, nastanka edema i aberantnog rasta epidermnih ćelija (Lansdown i drugi, 2001). Iako je hrana najčešći put izlaganja Cd (Cabrera i drugi, 1998) kod ljudi koji su nepušači, ima malo podataka o efektu oralnog unosa Cd na procese u koži. Mei i drugi (2017) pokazali su da hronični tretman CdCl<sub>2</sub> (30 mg/l), rastvorenog u vodi za piće, usporava zarastanje rane kod miša, tako što redukuje infiltraciju neutrofila, ekspresiju hemokina (CXCL1, CXCL2) i proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) u ranoj, inflamatornoj, fazi zarastanja tkiva i suprimira fosforilaciju ERK1/2 i NF- $\kappa$ B. Drugih podataka o efektu Cd na procese bitne za održavanje homeostaze u koži, uključujući efekat na imunsku aktivnost kože, nema.

### 1.8. Genetska varijabilnost kao faktor koji doprinosi osetljivosti na toksične efekte kadmijuma

Kako bi se stekao uvid u delovanje nekog metala, neophodno je ispitati doprinos genetičke varijabilnosti u podložnosti na njegove toksične efekte. Genetička varijabilnost različitih sojeva glodara koji se koriste u eksperimentalnim studijama, može odraziti genetički diverzitet koji postoji u ljudskoj populaciji (Loscher i drugi, 2017). Različite studije na pacovima i miševima (Rajesh i Rajesh, 2016; Kacew i drugi, 1995) su pokazale da se nivo deponovanog Cd može razlikovati između sojeva (Shimada i drugi, 2008). Sa druge strane, zapaženo je da slično deponovanje Cd kod različitih sojeva pacova i miševa, može da dovede do ispoljavanja štetnih efekata različitog intenziteta u organima poput pluća (McKenna i drugi, 1997), testisa (Liu i drugi, 2001) i jetre (Kuester i drugi, 2002), ukazujući na značaj genetičke osnove u osetljivosti na toksične efekte ovog metala. Tako, tretman CdCl<sub>2</sub> (u trajanju od 15 dana) kod Brown-Norway i Lewis sojeva pacova, uprkos istom deponovanju u timusu, doveo je do razlike u broju i stopi proliferacije timocita (Morselt i drugi, 1988). Ispitivanje efekta Cd na jetru ukazalo je na veću osetljivost ovog tkiva kod Fischer pacova u odnosu na jedinke Sprague-Dawley soja pacova, kao posledica delovanja ovog metala na ekspresiju hemokina i citokina (Harstad i Klaassen, 2002), dok je veći stepen oštećenja pluća zapažen kod C57BL/6 u poređenju sa DBA sojem miševa nakon tretmana Cd koji se pripisuje većoj stopi infiltracije leukocita u ovaj organ (McKenna i drugi, 1997). Dodatno, kod miševa je pokazano da su sojevi C3H/HeJ, 129/SVIM i AKR/J osetljiviji na hepatotoksičnost indukovanu Cd u odnosu A/J i C57BL/6J soj (Quaife i drugi, 1984; Hata i drugi, 1980), dok su DBA/1J i C57BR/J sojevi osetljiviji od Balb/C, C57BL/6J i C3H/HeJ na testikularnu toksičnost (Gunn i drugi, 1965; Chiquoine i Suntzeff, 1965), uprkos sličnom nivou deponovanog metala u tkivima. Kod akutne, intraperitonealne primene Cd (1 mg/kg), dolazi do izraženije inhibicije proliferacije i produkcije IFN- $\gamma$  i IL-17 od strane ćelija slezine Dark Agouti (DA) pacova u poređenju sa Albino-Oxford (AO) pacovima, kao i infiltracije neutrofila u pluća (Demenesku i drugi, 2016). Uprkos sličnom deponovanju Cd, veća osetljivost DA pacova u poređenju sa AO pacovima pokazana je i nakon oralnog unosa ovog metala (30 dana), usled izraženijih toksičnih efekata na mezenterične limfne čvorove (povećana proliferativna i oksidativna aktivnost ćelija, produkcija IFN- $\gamma$  i IL-17) i creva (pad vijabilnosti ćelija i smanjena proliferacija i produkcija citokina) (Ninkov i drugi, 2016).

## **2. CILJEVI RADA**

Koža, pored toga što predstavlja fizičku barijeru između organizma i spoljašnje sredine, posreduje u homeostazi čitavog organizma jer deluje i kao imunološka barijera. Iako je poznato da na ovo tkivo mogu da deluju različiti ksenobiotici remeteći njenu homeostazu, podataka o efektu široko rasprostranjenog toksikanta kadmijuma (Cd) na imunski sistem kože gotovo da nema. Najveći broj dosadašnjih podataka o efektu Cd na kožu dobijeno je nakon njegove topikalne primene, iako se dermalna apsorpcija smatra zanemarljivom u poređenju sa oralnim unosom Cd, a koji i predstavlja najznačajniji put intoksikacije kod ljudi. Kako su naši početni podaci pokazali da se nakon produžene (30 dana) oralne primene Cd deponuje u koži pacova, osnovni cilj ove doktorske disertacije jeste ispitivanje efekta ovog teškog metala na imunski sistem kože, analizom oksidativne i imunske/inflamatorne aktivnosti ukupne kože i njenih izolovanih ćelija, pre svega epidermnih ćelija (EC). Efekat Cd na podložnost kože na razvoj zapaljenske reakcije ispitao bi se nakon izazivanja reakcije kontaktne preosetljivosti, kao životinjskog modela alergijskog kontaktnog dermatitisa (AKD). S obzirom da su naša prethodna istraživanja pokazala da se Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO) pacovi razlikuju u osetljivosti na imunotoksične efekte Cd u crevima i slezini (Ninkov i drugi, 2016; Demenesku i drugi, 2016), imunomodulatorni efekat ovog metala na kožu ispitiće se uporednom analizom kod oba soja pacova, što može doprineti razumevanju uticaja genetske podloge u delovanju Cd na imunski sistem kože. Rezultati ispitivanja efekata kadmijuma na imunski sistem kože u okviru ove doktorske disertacije, mogu dati kompletniji uvid u imunotoksične efekte ovog metala i vezu između ovog metala u hrani i patoloških procesa u koži.

# **3. MATERIЈAL I METODE**

### 3.1. Hemikalije i reagensi

1. Kadmijum-hlorid ( $\text{CdCl}_2$ ) (Serva, Feinbiochemica, Hajdelberg, Nemačka), rastvaran je u dejonizovanoj vodi ( $\text{de}j\text{H}_2\text{O}$ ).
  2. RPMI-1640 medijum za gajenje ćelija (PAA laboratories, Austrija), dopunjavan sa HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfoična kiselina, 25 mM), glutaminom (2 mM), gentamicinom (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Galenika a.d., Srbija), 5% (v/v) inaktivisanim fetalnim telećim serumom (engl. Fetal Calf Serum, FCS) (PAA laboratories, Austrija) i antimikotikom vorikonazolom (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Pfizer PGM, Francuska), korišćen je za kulturu ćelija.
  3. PBS (engl. Phosphate Buffer Saline, pH 7.4) sastoji se od NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (8.1 mM) i  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.76 mM) (LachNer, Neratovice, Češka).
  4. Supstrat za određivanje aktivnosti mijeloperksidaze (MPO) sačinjen je od  $\sigma$ -dianizidin dihidrohlorida (0.167 mg/ml) (Sigma) i 0.0005 % vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Zorka Farma, Šabac, Srbija) u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.0) (Sigma).
  5. Tetrazolijumova so (3(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difenil tetrazolijum bromid, MTT) (ICN Biomedicals Inc, Aurora, SAD) u koncentraciji 5 mg/ml, dodavana je u kulturu u finalnoj koncentraciji od 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
  6. Za stimulaciju ćelija: konkanavalin A (ConA); lipopolisaharid (LPS; tip 0111: B4 iz E. Coli) (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, SAD) i *S. epidermidis* BGHMC11 izolovan iz humanog mleka rastvarani u RPMI-1640 medijumu.
  7. Griess-ov reagens: 0.1% rastvor N-(1-naftil) etilendiamin-dihidrohlorida (Sigma-Aldrich Inc, St. Luis, MO, SAD) i 1% rastvor sulfanilamida (u 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (Sigma-Aldrich Inc, St. Luis, SAD).
  8. 1-hloro-2,4-dinitrobenzen (DNCB) (BDH Chemicals Ltd., Poole, UK) rastvoren je u acetonu i maslinovom ulju (odnos 4:1).
  9. 2,4-dinitrobenzen sulfonska kiselina (DNBS) (Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI), vodosolubilna forma DNCB-a, rastvarana je u RPMI-1640 medijumu.
  10. Zoletil 100 (Virbac, Carros, Francuska), korišćen za anesteziranje životinja.
- Sve hemikalije korišćene u kulturi sterilisane su pomoću filtera (pore veličine 0.2  $\mu\text{m}$ ) (Filterpour, Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Nemačka).

### 3.2. Ekperimentalne životinje

Eksperimenti su izvođeni na mužjacima Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO) sojeva pacova koji su na početku oralnog tretmana Cd imali četiri do pet nedelja starosti. Životinje su odgajane na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (IBISS)- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, pod adekvatnim uslovima za datu vrstu (temperatura  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 60% relativna vlažnost vazduha, režim 12h svetlo/12h mrak), uz poštovanje principa bezbednosti i dobrobiti eksperimentalnih životinja (princip „5 sloboda“), uključujući neograničeni pristup vodi i hrani. Eksperimenti su izvođeni u skladu sa etičkim pravilima („3R“ pravilo) i odobreni su od strane Etičkog komiteta IBISS (rešenje broj 06-01/17). Tretman životinja i eksperimentalne procedure sprovedeni su u skladu sa Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe.

### 3.3. Oralni tretman kadmijumom

Pacovi su oralnim putem unosili Cd u formi  $\text{CdCl}_2$  (Serva, Feinbiochemica, Hajdelberg, Nemačka) rastvorenog u  $\text{deH}_2\text{O}$  u trajanju od 30 dana (produženi tretman). Za tretman su korišćene dve koncentracije Cd, niža od 5 ppm (mg/l) koja odgovara sredinskom zagađenju kome su bile izložene žene u Japanu obobile od „*itai itai*“ bolesti (Bhattacharyya i drugi, 1988), i viša od 50 ppm (mg/l) koja odgovara koncentraciji Cd u sredinama sa visokim stepenom zagađenja ili koncentraciji Cd kojoj su ljudi profesionalno izloženi (Wang i drugi, 2003). Eksperimentalne životinje su podeljene u tri eksperimentalne grupe sa 4-5 pacova po grupi/soju, u najmanje tri nezavisna eksperimenta:

1. životinje koje su pile čistu  $\text{deH}_2\text{O}$  (kontrolna grupa)
2. životinje koje su pile  $\text{deH}_2\text{O}$  sa rastvorenim Cd u koncentraciji od 5 ppm
3. životinje koje su pile  $\text{deH}_2\text{O}$  sa rastvorenim Cd u koncentraciji od 50 ppm

Po dve životinje iz iste grupe bile su smeštene u zajedničkom kavezu gde su tokom tretmana imale neograničen pristup hrani i vodi. Rastvori Cd menjani su svežim rastvorima dva puta nedeljno (kao i  $\text{deH}_2\text{O}$ ), kada su pacovima mereni telesna masa i količina popijene vode (po kavezu). Po završetku tretmana (30 dana), životinje su anestetizirane intramuskularnim injeciranjem 0,15 ml/kg (15 mg/kg) telesne mase (t.m.) zoletila (Virbac, Carros, Francuska), a nakon sprovođenja eksperimentalnih procedura eutanazirane su dekapitacijom.

### 3.4. Određivanje koncentracije kadmijuma u tkivima i organima

Metodom masene spektrometrije sa indukovano kuplovanom plazmom (engl. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS), određivana je koncentracija Cd u krvi, koži, subskapularnim i aksilarnim limfnim čvorovima (saLČ), crevu, jetri i bubrezima. Na nivou kože koncentracija Cd je određivana u tkivu izolovanom sa dorzalne strane tela pacova, i to u dlaci, ukupnoj koži i izdvojenim slojevima ovog tkiva (epiderm i derm).

Stakleno posuđe korišćeno u analizi uzoraka bilo je potopljeno u 10% azotnu kiselinu ( $\text{HNO}_3$ ) 24h, nakon čega je višestruko isprano sa visoko-prečišćenom (engl. ultra-pure) vodom (Millipore Simplicity System 185 includes dual UV filters (185 i 254 nm) pre korišćenja. Uzorci pune krvi (1 ml) ili tkiva (0.2 g) odmereni su na analitičkoj vagi u posudama aparata za mikrotalasnu digestiju (Ethos One, Milestone Italija) u koje je zatim dodato 7 ml 65%  $\text{HNO}_3$  (Berghof Products + Instruments GmbH, Berghof, Nemačka) i 1 ml 33% vodonik-peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).  $\text{HNO}_3$  je dodata kako bi se povećala rastvorljivost metala prevođenjem u nitrite, dok  $\text{H}_2\text{O}_2$  sprečava formiranje azotnih isparenja i ubrzava razlaganje uzorka (sa porastom temperature). Uzorci su razloženi u aparatu za mikrotalasnu digestiju na 180°C, prema sledećem temperaturnom programu: povećanje temperature do 180°C tokom prvih 10 min i održavanje ove temperature narednih 15 minuta (min). Po isteku programa rastvor je premešten u teflonske čaše u vodenom kupatilu kako bi se isparavanjem tečnosti (do 3 ml) redukovale suvišne kiseline. Nakon hlađenja, uzorci su premešteni u volumetrijske posude (od 15 ml) i rastvoreni sa visoko-prečišćenom vodom. Koncentracije metala su određene pomoću ICP-MS (ICAP, Q, X Thermo Scientific series 2). Ceo sistem je kontrolisan pomoću Qtegra Instrument Control Software. Instrumentalni parametri i mereni izotopi su dati u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Instrumentalni uslovi za ICP-QMS

Rf snaga (W)	1548
Protok gasa (L/min)	13.9
Pomoćni protok gasa(L/min)	1.09
Brzina protoka raspršivača (L/min)	0.8
Vreme uzimanja uzoraka	3 x 50s
Broj tačaka po piku	3
Integraciono vreme (ns)	50
Izmereni izotop	<sup>111</sup> Cd

Štok rastvor koji sadrži 1000 mg/L Cd korišćen je za pripremu standarda. Kao kontrolni uzorci korišćeni su <sup>6</sup>Li, <sup>45</sup>Sc, <sup>115</sup>In i <sup>159</sup>Tb (VHG standards, Manchester, UK). Koncentracije metala izražene su kao µg metala po gramu tkiva (µg/g).

### 3.5. Analiza akutno-faznih proteina i citokina u perifernoj krvi nakon oralnog unosa kadmijuma

Nakon anesteziranja životinja uzeta je puna krv iz abdominalne arterije i stavljena u endofrice (0.5 mL K3 EDTA Capillary Blood Tube, MiniCollect®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija). Špricovima sa heparinom izolovana je krv za izdvajanje plazme, koja je dobijena nakon centrifugiranja (1500×g, 10 min). Krv izolovana sterilnim špricovima bez heparina, inkubirana je 30 min (na 4°C) i centrifugirana (1500×g, 10 min) u cilju izolovanja seruma. Koncentracija haptoglobina određivana je u serumu imunohemijskom metodom (komercijalni N-antiserum za haptoglobin) i analizirana pomoću Siemens BNII nefelometra (Siemens Healthcare Diagnostics Products). Koncentracija je preračunata pomoću standardne krive konstruisane na osnovu apsorbaneci poznatih koncentracija ovog proteina. U serumu je određivana i koncentracija albumina pomoću komercijalnog testa (Siemens) čije je merenje rađeno na Siemens Healthcare Diagnostic Dimension sistemu. Koncentracija fibrinogena je određivana na koagulacionom analizatoru (Siemens Healthcare Diagnostic BCS-XP) pomoću komercijalno dostupnih reagenasa (Multifibren, Siemens Healthcare Diagnostics Products). Rezultati akutno-faznih proteina su predstavljeni kao relativne vrednosti životinja tretiranih Cd u odnosu na kontrolne životinje (kojima je dodeljena vrednost 1).

Nivo citokina meren je u plazmi pomoću komercijalno dostupnih ELISA setova za IL-6 (R&D Systems, Mineapolis, SAD) i TNF-α (eBioscience) prema uputstvu proizvođača. Koncentracija ovih proteina preračunata je na osnovu standardne krive konstruisane pomoću apsorbaneci njihovih poznatih koncentracija.

### 3.6. Histološka analiza tkiva kože nakon oralnog unosa kadmijuma

Nakon eutanazije životinja uzeti su uzorci kože veličine oko 1 cm<sup>2</sup>, i fiksirani u puferovanom 4% formalinu (pH 6.9). U cilju uklanjanja vode iz tkiva, uzorci su sprovedeni kroz seriju alkohola (etanola) rastuće koncentracije (30-100%), nakon čega su isprani u ksilolu i ukalupljeni u parafin. Pomoću mikrotoma sečeni su poprečni preseki tkiva debljine 5 µm, koji su zatim deparafinizovani potapanjem u ksilol i rehidratirani serijom alkohola opadajuće koncentracije (100-70%) i vodom. Nakon bojenja histoloških preparata pomoću hematoksilina (boji jedro u plavo) i eozina (boji citoplazmu u crveno), preseki tkiva su isprani u alkoholu i ksilolu, i montirani u medijumu za poklapanje mikroskopskih preparata (DPX). Sa ciljem određivanja broja mast ćelija, uzorci tkiva kože bojeni su Giemsa

rastvorom (Alfapanon, Novi Sad, Srbija) u PBS (pH 6.8), a zatim fiskirani u razblaženoj (1:1000) sirćetnoj kiselini (Čaruntu i drugi, 2014). Broj mast ćelija je kvantifikovan na najmanje 30 mikroskopskih polja (nepreklapajućih), na uvećanju od 400× (10×okular/40×objektiv), i izračunat je prosečan broj ćelija po polju za svaku životinju. Analiza histoloških preparata vršena je pomoću digitalnog svetlosnog mikroskopa (Nicon Co, Tokio, Japan).

### **3.7. Merenje propustljivosti kože nakon oralnog unosa kadmijuma**

Kako bi se procenilo da li Cd narušava barijernu funkciju kože korišćena je boja patent plavo V (Sigma- Aldrich Inc, St. Luis, MO, SAD) po protokolu prilagođenom prema Jacobi i drugi (2006). Sa kože leđa isećeni su uzorci kože veličine od oko 1 cm<sup>2</sup> i stavljeni u ploču sa 24 mesta. Na površinu kože naneto je 10 µl patent plavog, a nakon inkubacije (1 h na sobnoj temperaturi) ispran je višak boje i uzorci su prebaćeni u novu ploču. Boja je ekstrahovana dodavanjem 1.75 ml etanola i 0.5 ml 1M NaOH, nakon čega je naliveno po 100 µl uzorka u mikrotitar ploču sa 96 mesta, u triplikatu. Apsorbanca je merena na 620 nm pomoću automatskog ELISA čitaća (GRD, Rim, Italija). Propustljivost kože preraćunata je kao razlika u apsorbanci između obojene i kontrolne (neobojene) kože. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti apsorbanci tretiranih životinja u odnosu na kontrolne životinje (kojima je dodeljena vrednost 1).

### **3.8. Ispitivanje parametara inflamacije u homogenatima kože nakon oralnog unosa kadmijuma**

#### **3.8.1. Homogenizacija tkiva kože**

Tkivo kože uzeto sa dorzalne površine tela nakon žrtvovanja životinja, zamrznuto u tećnom azotu i skladišćeno na -80°C do upotrebe. Na analitićkoj vagi odmeravano je po 0.3 g uzorka koje je zatim homogenizovano u saharoznom puferu (250 mM saharoza, 10 mM Tris-HCl, 1 mM etilen diamin tetra sirćetna kiselina (EDTA), 1% PMSF, pH 7.4 ) u odnosu 1:10, pomoću elektrićnog homogenizera (IKA T18 Basic Homogenizer, IKA Works Inc., Vilmington NC, SAD). Dobijeni homogenati su sonifikovani (Bandelin electronic, UW 2070, Berlin, Nemaćka) i centrifugirani (37000 rpm, na + 4°C, u trajanju od 1h i 40 min), nakon čega su izdvojeni supernatanti korišćeni za dalje analize. Svi koraci su raćeni na ledu. U izdvojenim supernatantima odrećivana je koncentracija proteina Lowry metodom (3.8.2. *Lowry metoda za odrećivanje koncentracije proteina*).

#### **3.8.2. Lowry metoda za odrećivanje koncentracije proteina**

Za odrećivanje koncentracije proteina korišćena je kolorimetrićska Lowry metoda (Lowry i drugi, 1951) gde je koncentracija ukupnih proteina srazmerna intenzitetu boje rastvora uzorka. Po 20 µl uzorka ili standarda mešano je sa 300 µl reagensa C (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Carlo Erba, Milano, Italija) u 0.1 M NaOH (LachNer, Neratovice, Češka), 1% CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O (Zorka, Šabac, Srbija) i 2% K-Na-tartarat (Alkaloid, Skoplje, Makedonija). Nakon 15 min inkubacije na sobnoj temperaturi, dodato je 60 µl 1 X Folin- Ciocalteu reagensa (Merck, Darmstadt, Nemaćka), i uzorci su inkubirani još 30 min na sobnoj temperaturi. U mikrotitar ploču sa 96 mesta nalivano je po 100 µl uzorka u triplikatu i oćitana je apsorbanca na 670 nm pomoću automatskom ELISA čitaća. Koncentracije proteina preraćunate su pomoću standardne krive konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija govećeg serumskog albumina (engl. Bovine Serum Albumin/ BSA; AppliChem, Darmstadt, Nemaćka) od 0.1



do 1 mg/ml, i izražene su u mg/ml.

### 3.8.3. Procena parametara antioksidativne zaštite

Poremećaj ravnoteže slobodnih radikala i antioksidanata u organizmu vodi ka razvoju oksidativnog stresa i posledičnom oštećenju ćelija i tkiva. Najvažniji parametar koji određuje biološki uticaj antioksidativnih enzima jeste njihova aktivnost.

#### 3.8.3.1. Aktivnost katalaze (CAT, EC 1.11.1.6)

Izlaganje metalima povećava produkciju ROS i vodi ka nastanku  $H_2O_2$ , usled čega se aktivira CAT, enzim koji štiti ćelije od oksidativnog oštećenja prevodeći  $H_2O_2$  do kiseonika i vode (Chance i drugi, 1979). Aktivnost CAT je određivana u supernatantima homogenata kože, merenjem stope razlaganja  $H_2O_2$  na 230 nm pomoću spektrofotometra (Shimadzu UV-160). U kvarcnim kivetama mešano je 10  $\mu$ l homogenata sa 50  $\mu$ l Tris-EDTA pufera (pH 8.0) i 1 ml  $H_2O_2$ . Merena je promena apsorbance u trajanju od 3 min sa intervalima od po 30 sekundi, na 25°C. Kao mera aktivnosti katalaze uzeta je količina enzima koja razloži 1 mmol  $H_2O_2$  u minuti, i izražena je u jedinici po miligramu (U/mg) proteina čija je koncentracija određena po Lowry metodi (3.8.2. *Lowry metoda za određivanje koncentracije proteina*).

#### 3.8.3.2. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1)

SOD je enzim koji konvertuje superoksidne radikale do  $H_2O_2$  i molekuskog kiseonika ( $O_2^{\bullet-}$ ), dovodeći tako do njihove neutralizacije (Fridovich, 1995). Aktivnost ovog enzima je određivana u supernatantima homogenata kože merenjem inhibicije spontane autooksidacije adrenalina (epinefrin) u baznoj sredini, epinefrinskom metodom (Misra i Fridovich, 1972). U staklenim kivetama pomešano je 20  $\mu$ l uzorka, 3 ml natrijum-bikarbonatnog pufera ( $Na_2CO_3$  i EDTA u dej $H_2O$ , pH 10.2) i 20  $\mu$ l epinefrina (Sigma). Merena je promena apsorbance u trajanju od 10 min (na svakih 1 min) pomoću spektrofotometra (Shimadzu UV-160, Kjoto, Japan). Kao mera aktivnosti SOD uzeta je količina enzima potrebna da smanji stopu autooksidacije adrenalina za 50 %, i izražena je u jedinici po miligramu (U/mg) proteina čija je koncentracija određena pomoću Lowry metode (3.8.2. *Lowry metoda za određivanje koncentracije proteina*).

#### 3.8.3.3. Aktivnost glutation-S-reduktaze (GST, EC 2.5.1.18)

Glutation-S-transferaza (GST) je glavni protein detoksifikacionih enzima faze II koji ima ulogu u katalizaciji vezivanja elektrofilnih supstrata za GSH, smanjujući tako njihovu reaktivnost i oštećenje tkiva posredstvom ROS i teških metala (Sheehan i drugi, 2001). Aktivnost ovog enzima je određivana spektrofotometrijski (Shimadzu UV-160) merenjem reakcije vezivanja dinitrohlorobenzena (DNCB) za sulfhidrilne grupe cisteina GSH molekula, na talasnoj dužini od 340 nm u trajanju od 3 min (na 25°C). Za reakciju je korišćeno 20  $\mu$ l uzorka (supernatant homogenata kože), DNCB rastvoren u 95% etanolu, fosfatni pufer (pH 6.5), GSH i voda. Jedinica aktivnosti GST izražava se kao broj nanomola DNCB-GSH kompleksa nastalih u minuti ( $U = nmol\ DNCB-GSH/min$ ). Aktivnost GST izražena je u jedinicama po miligramu proteina (U/mg proteina), čija je koncentracija određena po Lowry metodi

(3.8.2. *Lowry metoda za određivanje koncentracije proteina*).

#### 3.8.3.4. *Određivanje nivoa malondialdehida (MDA) u homogenatima kože*

Slobodni radikali u organizmu dovode do lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina u ćelijskim membranama gde kao krajni produkt nastaje malondialdehid (MDA) (Gawel i drugi, 2004), često korišćeni marker oksidativnog stresa. Prema metodi Girotti i drugih (1991), 50  $\mu$ l supernatanta homogenata kože ili standarda pomešano je sa 2 ml TBA reagensa (tiobarbiturna kiselina, hlorovodonična kiselina (HCl) i trihlorosirćetna kiselina) (Zorka Farma, Šabac, Srbija) i 950  $\mu$ l Tris-HCl (pH 7.4), nakon čega je smeša zagrevana na temperaturi od 100°C, u trajanju od 60 min. Nakon hlađenja i centrifugiranja (3000 rpm, 10 min), po 200  $\mu$ l supernatanta je naliveno u duplikatu u mikrotitar ploču sa 96 mesta. Kako MDA reaguje sa tiobarbituratnom kiselinom iz smeše, kao krajnji produkt nastaju jedinjenja žute boje (TBA reagujuće supstance) čiji je intenzitet boje srazmeran nivou MDA u uzorku. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 535 nm, dok je koncentracija MDA preračunata pomoću standardne krive konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija MDA i izražena u nM/mg proteina. Koncentracija proteina određena po Lowry metodi (3.8.2. *Lowry metoda za određivanje koncentracije proteina*).

#### 3.8.3.5. *Ispitivanje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO) u homogenatima kože*

MPO predstavlja glavni proinflamatorni enzim azurofilnih granula neutrofilnih granulocita (Schultz i Kaminker, 1962). Za određivanje aktivnosti MPO u homogenatima kože korišćen je  $\sigma$ -dianizidin dihidrohlorid koji se oksiduje pomoću ovog enzima u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Prema prilagođenom protokolu Bozeman i Learn (1990), 33  $\mu$ l supernatanta homogenata kože ili standarda pomešano je sa 966  $\mu$ l kalijum-fosfatnog pufera (50 mM) sa  $\sigma$ -dianizidin dihidrohloridom (0.167 mg/ml) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.0005 %). Nakon inkubacije od 10 min po 100  $\mu$ l uzorka je naliveno u duplikatu u mikrotitar ploču sa 96 mesta, i apsorbanca je očitana na 450 nm korišćenjem automatskog ELISA čitača. Pomoću standardne krive konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija MPO, preračunata je aktivnost ovog enzima i izražena u jedinicama po ml (U/ml) homogenata.

#### 3.8.4. *Određivanje nivoa HMGB1 molekula Western Blot metodom u homogenatima tkiva*

Za određivanje nivoa HMGB1 homogenizovano je 100  $\mu$ g tkiva kože prema opisanom protokolu (3.8.1. *Homogenizacija tkiva kože*) u saharoznom puferu sa dodatim inhibitorima proteaza (Protease inhibitors mix G, Serva Electrophoresis GmbH, Hajdelberg, Nemačka). Homogenati kože su centrifugirani (20 min, 9700 $\times$ g, na 4°C) i prebaćeni u nove ependorfice. Nakon određivanja količine proteina (3.8.2. *Lowry metoda za određivanje koncentracije proteina*), preračunata je njihova koncentracija pomoću standardne krive konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija proteina BSA. Po 30  $\mu$ g proteina (iz svakog uzorka homogenata kože) razblaženo je 4x u Lemli puferu [(Tris-HCl pH 6.8, SDS,  $\beta$ -merkaptotanol (Applichem, Darmstadt, Nemačka), bromfenol plavo (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD), glicerol (LachNer, Neratovice, Češka)], i zagrevano 5 min (na 95°C) kako bi se postigla denaturacija proteina do njihove primarne strukture.

Uzorci proteina su zatim razdvojeni elektroforezom na poliakrilamidnom gelu na Bio-Rad sistemu (Mini-PROTEAN II, Electrophoresis Cell. Cat. Num. 165- 2940). Korišćena su dva gela, 12% SDS-poliakrilamidni gel [0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.05 % amonijum-persulfat (AMPS) i

0.05 % TEMED (tetrametilendiamin)] u kome se kreću proteini, i 5% SDS-poliakrilamidni gel (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% AMPS i 0.1% TEMED) u kome se uzorci koncentruju i poravnjavaju. Gel sa uzorcima postavljen je u sistem za elektroforezu sa puferom za elektroforezu (0.192 M glicin, 25 mM Tris-HCl i 0.1% SDS, pH 8.3). Razdvajanje proteina tokom elektroforeze vršeno je pod naponom od 20 mA u gelu za koncentrovanje, odnosno 30 mA u gelu za razdvajanje proteina.

Nakon završene elektroforeze, izvršen je transfer proteina na polivinil difluoridnu membranu (PVDF) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, Bakingamšir, Engleska) pomoću sistema za transfer (Fastblot B43, Biorad, Minhen, Nemačka) na 170 mA. Kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela membrana je nakon ispiranja blokirana dodavanjem TBS pufera (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20), skraćeno TBS-T pufer, sa 5% BSA u trajanju od sat vremena. Nakon blokiranja i ispiranja dodato je primarno monoklonsko zečije anti-pacovsko anti-HMGB1 (Cell Signaling Technology, #6893) ili anti- $\beta$ -aktin (Cell Signaling Technology, #8457) antitelo rastvoreno u TBS-T sa 1% BSA, nakon čega je usledila inkubacija preko noći (na 4°C). Nakon ispiranja od viška nevezanog primarnog antitela dodato je sekundarno kozije anti-zečije IgG antitelo (Invitrogen, #65-6120) u trajanju od sat vremena, na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje. Detekcija traka sa HMGB1 proteinima izvršena je pomoću sistema za detekciju hemiluminiscencije (ECL, Santa Cruz Biotechnology) prema uputstvu proizvođača, i hemiluminescentni signal prenešen je na film kako bi trake proteina analizirale pomoću ImageJ softvera. Nivo HMGB1 proteina izražen je u odnosu na referentni protein  $\beta$ -aktin (HMGB1/ $\beta$ -aktin).

### **3.9. Ispitivanje promena u kondicioniranom medijumu organokulture eksplanata kože nakon oralnog unosa kadmijuma**

#### **3.9.1. Postavljanje organokulture eksplanata kože**

Sa dorzalne strane tela isečeni su uzorci kože pune debljine, veličine oko 1 cm<sup>2</sup> koji su zatim istrimovani pomoću skalpera kako bi se uklonilo potkožno masno tkivo. Nakon merenja mase kože uzorci su višestruko isprani u fiziološkom rastvoru sa gentamicinom i medijumu sa gentamicinom, kako bi se sprečila kontaminacija. Koža je isečena na dva dela i postavljena u ploče sa 24 mesta (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) sa 1 ml medijuma (sa 5% FCS). Organokultura je kultivisana 48h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, vlažna atmosfera), a zatim su ploče centrifugirane na 1400 rpm (10 min) i sakupljen je supernatant (kondicionirani medijum) koji je dalje korišćen za određivanje produkcije medijatora inflamacije tj NO i citokina.

#### **3.9.2. Određivanje metaboličke vijabilnosti organokulture eksplanta kože**

Vijabilne ćelije poseduju aktivni metabolizam putem kojeg mogu da redukuju tetrazolijumovu so MTT (žute boje) do ljubičasto obojenog produkta, formazana, čija je količina direktno proporcionalna broju vijabilnih ćelija (Marshall i drugi, 1995). Metabolička aktivnost eksplanta kože ispitana je putem ovog kolorimetrijskog testa, gde su kao uzorci korišćeni mali komadi kože, veličine ~3 mm<sup>2</sup>, koji su nakon merenja mase postavljeni u triplicatima u mikrotitar ploču sa 96 mesta. U svaki bunarić je dodato 200  $\mu$ l medijuma i 20  $\mu$ l MTT, kako u sveže izolovane eksplante kože (0h) tako i u eksplante kože nakon kultivacije u trajanju od 24h. Nakon inkubacije u trajanju od 3 sata, uzorci kože su ostavljeni na -20 °C preko noći, a zatim su pojedinačni monoplakati eksplanta prebačeni u novu ploču sa 24 mesta kako bi se ekstrahovao formirani formazan. Ekstrakcija boje je izvršena dodavanjem 0.5

ml 2-metoksi etanola i inkubacijom tokom noći na sobnoj temperaturi, nakon čega je po 200  $\mu$ l ekstrahovane boje prebačeno u novu mikrotitar ploču sa 96 mesta. Apsorbanca je očitana spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm, sa korekcijom na talasnoj dužini od 670 nm i preračunata po gramu tkiva, dok je MTT indeks iskazan kao odnos MTT redukcije eksplanata kultivisanih 24h i MTT redukcije svežih eksplanata (0h) (MTT indeks=24h/0h).

### 3.9.3. Određivanje nivoa citokina imunoenzimskim testom na čvrstoj fazi (ELISA)

Najčešće korišćena metoda za detekciju i kvantifikaciju peptida, proteina, antitela i hormona jeste ELISA (engl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) test koji se zasniva na visoko specifičnoj interakciji antigena i antitela. Za određivanje produkcije citokina u kondicioniranom medijumu dobijenim iz organokulture eksplanata kože, korišćena je „sendvič“ ELISA, zbog svoje visoke osetljivosti gde se antigen od interesa detektuje pomoću primarnog (hvatajućeg) i sekundarnog (detektujućeg) antitela. Za određivanje nivoa citokina korišćeni su komercijalno dostupni ELISA setovi za pacove, prema uputstvu proizvođača: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 (R&D Systems, Mineapolis, SAD) i TNF- $\alpha$  (eBioscience). Koncentracija citokina preračunata je pomoću standardne krive konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija gore navedenih citokina i izražena u pg/ml.

### 3.9.4. Određivanje nivoa azot monoksida (NO) pomoću Griess-ove reakcije

Kao indirektna metoda za određivanje nivoa azot monoksida (NO) koristi se Griess-ova reakcija, gde se vrši detekcija nitrita (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) i/ili nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) kao krajnjih produkata metabolizma ovog medijatora inflamacije (Hibbs i drugi, 1988) koji su u direktnom odnosu sa količinom produkovanog NO. Za određivanje količine NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, uzeto je 50  $\mu$ l uzorka (kondicioniranog medijuma organokulture eksplanata kože) ili standarda u koje je dodato 50  $\mu$ l Griess-ovog reagensa, koga čine sulfonilamid (SA) i N-(1-Naftiletildiamin) (NAD) u odnosu 1:1. Nakon inkubacije (10 min, sobna temperatura), razvijena je boja (roza) čija je apsorbanca merena spektrofotometrijski na 540 nm (sa korekcijom na 670 nm). Količina produkovanih NO<sub>2</sub><sup>-</sup> preračunata je korišćenjem standardne krive konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija natrijum-nitrita (NaNO<sub>2</sub>) i izražena u  $\mu$ M.

## 3.10. Ispitivanje promena u izolovanim ćelijama kože nakon oralnog unosa kadmijuma

### 3.10.1. Izolacija epidermnih i dermnih ćelija kože

Koža je isečena na komadiće veličine oko 0.5 cm<sup>2</sup> i inkubirana u medijumu sa dispazom (2.5 mg/ml) preko noći (na 4°C). Nakon odvajanja slojeva kože epidermni sloj je inkubiran (35 min, na 37°C) u rastvoru 0.25% tripsina i 0.1% glukoze i propušten kroz najlon mrežice (50  $\mu$ m, BD Bioscience, Bedford, SAD), nakon čega je dobijena suspenzija epidermnih ćelija (EĆ). Sloj derma je isećan i inkubiran (2h, na 37°C) u rastvoru sa PBS (engl. Phosphate Buffer Saline, pH 7.4), kolagenazom (3mg/ml), hijaluronidazom (10mg/ml) i DNazom (10mg/ml). Izolovane epidermne i dermne ćelije su resuspendovane u kompletnom medijumu i razblažene u 0.1% rastvoru tripšana, kako bi se automatskim brojačem ćelija (LUNA-IITM, Logos Biosystems, Inc) odredili njihov broj i vijabilnost. Za dalju manipulaciju epidermne i dermne ćelije su podešene na 1 $\times$ 10<sup>6</sup> ćelija/ml.

### 3.10.2. Postavljanje kulture ćelija kože

#### 3.10.2.1. Postavljanje spontane i LPS-stimulisane kulture epidermnih i dermih ćelija kože

Nakon izolacije u mikrotitar ploče sa 96 mesta postavljeno je  $1 \times 10^5$  ćelija epiderma ili derma/ml kulture u finalnoj zapremini od 210  $\mu$ l, koje su kultivisane tokom 48h sa medijumom (spontana produkcija) ili lipopolisaharidom (LPS, 100 ng/ml kulture) (stimulisana produkcija). Nakon centrifugiranja (1200 rpm, 10 min) izdvojeni su supernatanti u kojima je određivana koncentracija citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10) i NO.

#### 3.10.2.2. Postavljanje spontane i *S.epidermidis*-stimulisane kulture epidermnih ćelija kože

U eksperimentima sa *S. epidermidis* BGHMC11 izolovanim iz humanog mleka (Begović i drugi, 2013),  $1 \times 10^5$  ćelija epiderma/ml kulture u finalnoj zapremini od 210  $\mu$ l, kultivisano je u trajanju od 48h sati sa medijumom (spontana produkcija) ili sa  $10^4$  bakterija *S. epidermidis* (stimulisana produkcija). Supernatanti su korišćeni za određivanje koncentracije citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10).

#### 3.10.2.3. Postavljanje kokulture epidermnih ćelija kože i saLČ

Epidermne ćelije ( $1 \times 10^5$  ćelija/ml kulture) izolovane iz kontrolnih ili životinja tretiranih Cd su kokultivisane sa  $5 \times 10^5$  ćelija saLČ/ml kulture (odnos 1:5) izolovanih iz netretiranih životinja (3.11. Izolacija ćelija drenirajućih limfnih čvorova kože) u trajanju od 72h (finalna zapremina 210  $\mu$ l), sa (stimulisana produkcija) ili bez (spontana) konkavalina A (ConA, 2.5  $\mu$ g/ml kulture). Supernatanti su korišćeni za određivanje koncentracije citokina (IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6 i IL-10). U svim ispitivanim testovima ćelije su kultivisane u inkubatoru za gajenje ćelija (Flow Laboratories CO2 incubator 1500, ICN Flow, SAD) u vlažnoj atmosferi, na 37°C, sa 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.10.3. Određivanje metaboličke vijabilnosti ćelija kože MTT testom

Metabolička vijabilnost EĆ i dermih ćelija određivana je odmah nakon njihove izolacije (0h) pomoću MTT redukcionog eseja (Oez i drugi, 1990). U mikrotitar ploče sa 96 mesta nalivano je  $1 \times 10^5$  ćelija i 10  $\mu$ l MTT sa ili bez prisustva stimulatora (LPS ili *S.epidermidis*). Nakon inkubacije u trajanju od 3h (na 37°C) reakcija je prekinuta dodavanjem 10% sodijum dodecil sulfata (SDS)–0.01 N HCl. Nastali formazan rastvoren je inkubacijom preko noći (na sobnoj temperaturi). Dobijena boja (čiji je intenzitet srazmeran vijabilnosti ćelija) očitana je pomoću automatskog ELISA čitača na 540 nm (sa korekcijom na 670 nm).

Metabolička vijabilnost određivana je i po završetku kultivacije ćelija epiderma i derma sa medijumom/LPS-om (48h), kao i kokultivacije EĆ sa saLČ (72h). Ploče sa kultivisanim ćelijama su centrifugirane (1200 rpm, 10 min, na sobnoj temperaturi) i sakupljen je supernatant, dok je na talog ćelija dodato 100  $\mu$ l medijuma (sa 5% FCS) i 10  $\mu$ l MTT. Dalji postupak isti je kao i u prethodno opisanom određivanju vijabilnosti sveže izolovanih ćelija.

### 3.10.4. Određivanje nivoa redukovanog glutationa (GSH) u epidermnim ćelijama kože

Nakon izolacije, epidermne ćelije ( $1 \times 10^6$ ) su centrifugirane ( $200 \times g$ , 10 min, na  $4^\circ C$ ) i dodato je  $80 \mu l$   $10 \text{ mM HCl}$ . Uzorci su sprovedeni kroz 3 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja (kako bi došlo do oslobađanja sadržaja iz ćelija) nakon čega je dodato  $20 \mu l$   $5\%$  sulfosalicilne kiseline. Po završenom centrifugiranju ( $8000 \times g$ , 10 min, na  $4^\circ C$ ) izdvojeno je po  $100 \mu l$  supernatanta iz svakog uzorka u kojima je određivan nivo GSH. Na talog ćelija dodat je  $1 \text{ ml } 1 \text{ M NaOH}$ , i nakon inkubacije (preko noći, na sobnoj temperaturi) u njemu je određivana koncentracija proteina (3.8.2. *Lowry metoda za određivanje koncentracije proteina*). U supernatante za određivanje GSH dodato je  $400 \mu l$  Tris-Cl (pH 8.9) i  $10 \mu l$  DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoična kiselina)) nakon čega su uzorci inkubirani (20 min, sobna temperatura) i nalivani u duplikatu u mikrotitar ploču sa 96 mesta. GSH se oksiduje od strane DTNB što dovodi do formiranja GSSG i TNB (5-tio-2-nitrobenzoična kiselina). Količina TNB proporcionalna je količini GSH prisutnog u uzorku. Apsorbance su očitane pomoću automatskog ELISA čitača na  $405 \text{ nm}$  (sa korekcijom na  $540 \text{ nm}$ ). Koncentracija GSH preračunata je pomoću krive konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija GSH i izražena je kao  $\mu M$  GSH/mg proteina. Protokol je prilagođen prema Rahman i drugi (2006).

### 3.10.5. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real time polymerase chain reaction, RT-PCR)

Kombinacijom reverzne transkripcije RNK u komplementarnu DNK (cDNK) i amplifikacije specifičnih delova DNK pomoću reakcije lančanog umnožavanja (PCR), nastala je reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real time polymerase chain reaction, RT-PCR) koja je korišćena u ovoj studiji za određivanje nivoa ekspresije gena za citokine (IL- $1\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-10), metalotioneine (MT-1 i MT-2), iNOS, hemoksigenazu (HO)-1, AHR i gene povezane sa ovim receptorom (CYP1A1, CYP1B1), i apoptotske markere (Bax i Bcl-2).

#### 3.10.5.1. Izolacija molekula RNK iz epidermnih ćelija

Nakon izolacije EĆ ( $5 \times 10^6$  ćelija/ml) dodato je po  $500 \mu l$  trizola tj rastvora za izolaciju RNK (mi-Total RNA Isolation Kit; Metabion, Martinsried, Nemačka). Nakon rastvaranja dodat je hloroform (Merck, Darmstadt, Nemačka) (1:5 u odnosu na trizol) i uzorci su centrifugirani ( $1200 \times g$ , 20 min, na  $4^\circ C$ ) usled čega su se izdvojila 3 sloja: gornji sa RNK, srednji sa DNK i donji sa proteinima. Gornji sloj sa RNK pažljivo je prebačen u nove ependorfice i dodato je  $300 \mu l$  izopropanola (Zorka, Šabac, Srbija) koji taloži RNK. Nakon centrifugiranja ( $1200 \times g$ , 20 min, na  $4^\circ C$ ) na talog je dodat  $70\%$  etanol ( $600 \mu l$ ) (Zorka, Šabac, Srbija), i nakon ponovnog centrifugiranja RNK je resuspendavana u  $15 \mu l$  vode sa dietilpirokarbonatom (DEPC  $H_2O$ ) koji inaktivira RNaze. Sledeći korak podrazumevao je merenje količine RNK u uzorcima i podešavanje njene koncentracije kako bi u reakciju reverzne transkripcije ušla ista količina RNK svakog uzorka ( $1 \mu g$  RNK).

#### 3.10.5.2. Reakcija reverzne transkripcije

Prvi korak u reakciji reverzne transkripcije jeste prepisivanje RNK u komplementarnu cDNK koje je omogućeno dodavanjem  $1 \mu l$  nasumičnih heksamernih prajmera (Applied Biosystems) i  $4 \mu l$

dezoksiribonukleotidtrifosfata (dNTP, Fermentas, Vilnius, Litvanija) u uzorke (10 µl ) rastvorene u vodi. Reakciona smeša sa RNK inkubirana je na temperaturi od 70°C u cilju denaturacije sekundarne strukture RNK. Po isteku vremena dodato je 1 µl enzima (reverzna transkriptaza izolovana iz Moloni leukemija virusa) (Fermentas), 4 µl pufera za reverznu transkripciju (5x Reaction buffer, Fermentas, Vilnius, Litvanija), 0.5 µl inhibitora RNaza i 2.5 µl visoko prečišćene vode po uzorku. Dalji koraci sprovedeni su prema zadatom programu na aparatu za reverznu transkripciju (Biometra T-personal Combi Thermo Cycler 050-552, Nemačka): inkubacija na 25°C (15 min), b) inkubacija na 42°C (60 min) i c) prekid inkubacije na 70°C (10 min) i 95°C (3 min). Dobijena cDNK razblažena je 10 puta u DEPC H<sub>2</sub>O i korišćena je za RT-PCR.

### 3.10.5.3. Reakcija lančanog umnožavanja (RT-PCR)

U mikrotitar ploču sa 96 mesta za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD) naliveno je u duplikatu 2 µl cDNK (razblažene 10 puta), 1 µl specifičnih prajmera (Metabion, Martinsried, Nemačka), 2 µl destilovane vode i 5 µl SybrGreen (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD) po uzorku. Kako bi se sprečilo ispravanje ploča je prekrivena zaštitnom folijom (Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD), centrifugirana (1000xg, 1 min) i stavljena u aparat za RT-PCR (ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD). Umnožavanje ciljnog gena vršeno je po unapred zadatom programu na aparatu za RT-PCR: a) 50°C (5 min), b) 95°C (10 min), i c) 40 ciklusa umnožavanja ciljnog gena. Dobijeni rezultati su analizirani pomoću softverskog programa (7000 System software, Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD). Nivo ekspresije informacione RNK (iRNK) u uzorku preračunat je na osnovu ekspresije iRNK za referentni protein (β-aktin) u uzorcima tj na osnovu formule  $2^{-dCt}$  koja izražava razliku između Ct vrednosti iRNK gena od interesa i iRNK β-aktina. Nukleotidne sekvence ciljnih gena predstavljene su u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Nukleotidne sekvence prajmera

Sekvenca prajmera		
	5' - 3' (Forward)	3' - 5' (Reverse)
<b>β-aktin</b>	CCCTGGCTCCTAGCACCAT	GAGCCACCAATCCACACAGA
<b>IL-1β</b>	CACCTCTCAAGCAGAGCA	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
<b>IL-6</b>	GCCCTTCAGGAACAGCTATGA	TGTCAACAACATCAGTCCCAAG
<b>TNF-α</b>	TCGAGTGACAAGCCCGTAGC	CTCAGCCACTCCAGCTGCTC
<b>IL-10</b>	GAAGACCCTCTGGATACAGCTGC	TGCTCCACTGCCTTGCTTTT
<b>iNOS</b>	TTCCCATCGCTCCGCTG	CCGGAGCTGTAGCACTGCA
<b>MT-1</b>	GAAGTCAAATGCACCTCCTGC	CAAGACTCTGAGTTGGTCCG
<b>MT2</b>	TGCAAGAAAAGCTGTGTTC	TTACACCATTGTGAGGACGCC
<b>AHR</b>	GCTGTGATGCCAAAGGGCAGC	TGAAGCATGTCAGCGGCGTGGAT
<b>CYP1A1</b>	GGGGAGGTTACTGGTTCTGG	CGGATGTGGCCCTTCTCAA

<b>CYP1B1</b>	CTCATCCTCTTTACCAGATACCCG	GACGTATGGTAAGTTGGGTTGGTC
<b>Bax</b>	AATTCGCCGGAGACTCG	TGAAGACAGGGGCCTTTTTG
<b>Bcl-2</b>	CCTGAAGAGTTCCTCCACCA	TCGCAGAGATGTCCAGTCAG
<b>HO-1</b>	CGTGCAGAGAATTCTGAGTTC	AGACGCTTTACGTAGTGCTG

---

### 3.10.6. Oslobađanje laktat dehidrogenaze od strane epidermnih ćelija

U cilju određivanja nivoa laktat dehidrogenaze (LDH), nakon centrifugiranja (1200 rpm, 10 min) sakupljeni su supernatanti kultivisanih EĆ. Nivo LDH izmeren je pomoću spektrofotometra SIEMENS ADVIA 1800 (Terytown, New York, SAD), korišćenjem komercijalno dostupnih reagenasa (ADVIA Chemistry LDLP Lactate Dehydrogenase Reagents) i izražen u jedinicama po litri (U/L).

### 3.10.7. Određivanje koncentracije citokina ELISA testom u epidermnim i dermnim ćelijama

Nivoi IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 (R&D Systems, Mineapolis, SAD) i TNF- $\alpha$  (eBioscience) u EĆ i dermnim ćelijama kože, kao i IL-6, IFN- $\gamma$  i IL-17 (eBioscience) u kokulturi EĆ sa T limfocitima dLČ, mereni su pomoću komercijalno dostupnih antitela za ove citokine, prema uputstvu proizvođača. Koncentracija ovih proteina preračunata je pomoću standardne krive konstruisane na osnovu apsorbanci njihovih poznatih koncentracija, i izražena je u pg/ml. Nivo citokina nakon dodatnog stimulusa (LPS ili *S. epidermidis*) izražen je kao indeks stimulacije (odnos stimulisane i spontane produkcije citokina) tj kao LPS/spontana produkcija ili *S. epidermidis*/spontana produkcija citokina.

### 3.10.8. Određivanje nivoa NO u epidermnim ćelijama

Određivanje koncentracije NO u EĆ rađeno je prema opisanom protokolu (3.9.4. *Određivanje nivoa nitrita Griess-ovom reakcijom*). Kao uzorak korišćeno je 50  $\mu$ l supernatanta sakupljenog nakon kultivacije (48h) EĆ sa ili bez stimulacije sa LPS. Nivo NO nakon LPS-a izražen je kao indeks stimulacije (odnos stimulisane i spontane produkcije citokina).

### 3.10.9. Određivanje nivoa proteina (Nrf2, casp-3 i PARP) Western blot metodom u epidermnim ćelijama

Nivoi Nrf2 (engl. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) i aktivnih formi proteina kaspaza-3 (casp-3) i poli (ADP-riboza) polimeraza (PARP) u EĆ određivani su u talogu proteina, koji se izdvajao kao donja frakcija nakon dodavanja hloroforma prilikom izoalcije RNK (3.10.5.1. *Izolacija molekula RNK iz epidermnih ćelija*). Naime, nakon izolacije RNK (gornja frakcija) i uklanjanja prstena DNK (srednja frakcija), u fenol-etanol talogu ostali su proteini. Na talog je dodato 3 puta više acetona u odnosu na zapreminu fenol-etanola nakon čega je usledila inkubacija (10 min, sobna temperatura). Uzorci su centrifugirani (12000xg, 10 min, na 4°C), i nakon izbacivanja supernatanta na talog je dodat 1 ml GEG (0.3 M guanidin-HCl, 95 % etanol, 2.5 % glicerol) rastvora. Po završetku sonifikacije i centrifugiranja (8000xg, 5 min, na 4°C), uzorci su isprani 2 puta sa GEG (dodavanje 1 ml GEG, inkubacija, centrifugiranje, odlivanje supernatanta). Poslednje ispiranje podrazumevalo je dodavanje 1



ml etanola (Zorka, Šabac, Srbija) sa 2.5% glicerolom, nakon čega su ponovo usledile inkubacija i centrifugiranje. Nakon odlivanja supernatanta proteini su resuspendovani u 100 µl pufera za lizu (50 mM DTT, 2% SDS, 10 % glicerol, 62.5 mM TRIS, destilovana voda) u koji su prethodno dodati PMSF(1 mM), EDTA (2 mM) i aprotinin (10 µg/ml). Koncentracije proteina u uzorcima određena je prema Lowry-jevoj metodi (3.8.2. *Lowry metoda za određivanje koncentracije proteina*). Dalji koraci su isti kao u opisanom protokolu za određivanje nivoa HMGB1 molekula (3.8.4. *Određivanje nivoa HMGB1 molekula Western Blot metodom u homogenatima tkiva*). Za blokiranje membrane korišćen je TBST sa 5% BSA, dok su primarno monoklonsko zečije anti-pacovsko anti-Nrf2 (Cell Signaling Technology, #12721S), poliklonsko zečije anti-pacovsko anti-casp-3 (Cell Signaling, #9662), poliklonsko zečije anti-pacovsko anti-PARP (Cell Signaling, #9542), monoklonsko zečije anti-β-aktin (Cell Signaling, #4970) i sekundarno kozije anti-zečije IgG antitelo (Invitrogen, #65-6120) rastvorena u TBST sa 1% BSA. Nivoi Nrf2, casp-3 i PARP proteina izraženi su u odnosu na referentni protein β-aktin.

### **3.11. Ispitivanje promena u drenirajućim limfnim čvorovima kože (saLČ) nakon oralnog unosa kadmijuma**

#### 3.11.1. Izolacija i postavljanje kulture ćelija dLČ kože

Nakon žrtvovanja životinja izolovani su saLČ od kojih je mehaničkim istiskivanjem kroz najlon mrežice (70 µm, Cell strainer, BD Falcon, BD Bioscience, Bedford, SAD) dobijena ćelijska suspenzija. Ćelije su isprane i resuspendovane u medijumu (sa 5% FCS), a zatim su automatskim brojačem ćelija određeni njihov broj i vijabilnost. Koncentracija ćelija je podešena na  $6 \times 10^6$  ćelija/ml i  $6 \times 10^5$  ćelija/ml kulture u finalnoj zapremini od 210 µl kultivisano je tokom 48h sa medijumom (spontana produkcija) ili ConA (1 µg/ml kulture) (stimulisana produkcija). Nakon centrifugiranja (1200 rpm, 10 min) izdvojeni su supernatanti u kojima je određivana koncentracija citokina IFN-γ i IL-17.

#### 3.11.2 Merenje metaboličke aktivnosti

Metabolička vijabilnost ćelija saLČ ( $6 \times 10^5$  ćelija/ml) određivana je kao što je opisano u protokolu (3.10.3. *Određivanje metaboličke vijabilnosti ćelija kože MTT testom*), sa medijumom (spontana produkcija) ili ConA (1 µg/ml kulture) (stimulisana produkcija).

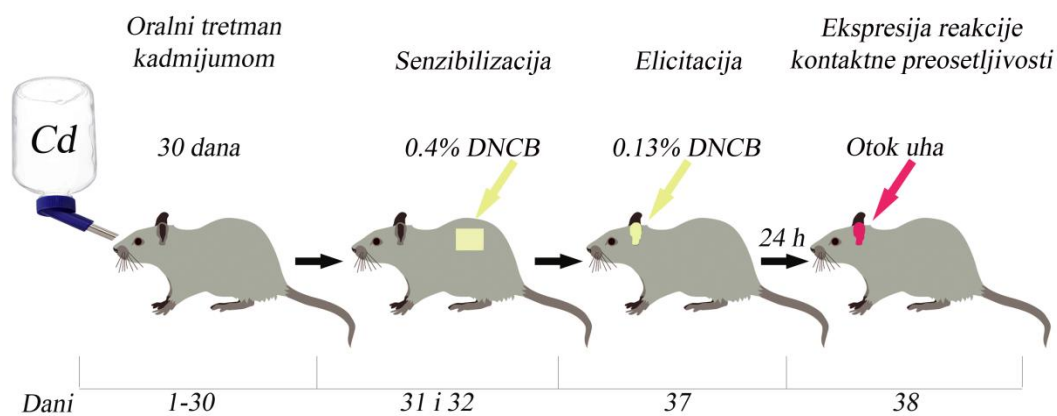
#### 3.11.3. Određivanje koncentracije citokina ELISA testom

U saLČ određivan je nivo spontane (spontane) i ConA (1 µg/ml) stimulisane produkcije IFN-γ i IL-17 (eBioscience) pomoću komercijalno dostupnih antitela za ove citokine, prema uputstvu proizvođača. Koncentracija ovih proteina preračunata je na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu apsorbanci njihovih poznatih koncentracija i izražena je u pg/ml. Nivo citokina nakon dodatnog ConA izražen je kao indeks stimulacije (odnos stimulisane i spontane produkcije citokina).

### 3.12. Ispitivanje efekta oralnog unosa kadmijuma na reakciju kontaktne preosetljivosti (na DNCB)

#### 3.12.1. Izazivanje reakcije kontaktne preosetljivosti i merenje otoka uva

Po završetku oralnog tretmana Cd (nakon 30 dana), kontrolne (koje nisu tretirane sa Cd) i tretirane (koje su tretirane sa 5 ppm ili 50 ppm Cd) životinje su senzibilisane primenom 0.4% DNCB-a rastvorenog u acetonu i maslinovom ulju (u odnosu 4:1), nanošenjem po 100  $\mu$ l pripremljenog rastvora na prethodno ošišanu površinu (oko 16 cm<sup>2</sup>) kože (dorzalne) tokom dva uzastopna dana. Pet dana nakon druge primene DNCB-a izazvana je ekspresija reakcije (faza elicitacije) gde je kontrolnim i tretiranim životinjama nanošeno po 50  $\mu$ l DNCB-a tri puta manje koncentracije (0.13%) na desno uvo. Na površinu levog uva tretiranih i kontrolnih životinja nanošeno je 50  $\mu$ l rastvarača (maslinovo ulje u acetonu). Otok levog i desnog uva meren je pomoću mikrometra sa po tri ponavljanja pre (0h) i 24h nakon izazivanja elicitacije (Slika 4). Razlika u debljini uva nakon i pre elicitacije (24h-0h) korišćena je kao mera ekspresije reakcije kontaktne preosetljivosti. S obzirom na to da oralni put unosa haptena izaziva tolerogenost, životinje su držane u zasebnim kavezima tokom tretmana.



**Slika 4.** Izazivanje reakcije kontaktne preosetljivosti nakon oralnog unosa kadmijuma

#### 3.12.2. Izolacija i postavka kulture ćelija epiderma i dLČ kože

Prvog i trećeg dana nakon senzibilizacije životinja izolovane su ćelije limfnih čvorova koji dreniraju kožu (saLČ), dok su 24h nakon elicitacije izolovane ćelije limfnih čvorova koji dreniraju uši (aurikularni) prema opisanom protokolu (3.11.1. *Izolacija ćelija dLČ kože*), i podešena im je koncentracija na  $6 \times 10^6$  ćelija/ml.  $6 \times 10^5$  ćelija/ml kulture u finalnoj zapremini od 210  $\mu$ l kultivisano je tokom 48h sa medijumom (spontana produkcija) ili DNBS-om (10  $\mu$ g/ml kulture) (haptenom stimulisana produkcija). Nakon centrifugiranja (1200 rpm, 10 min) izdvojeni su supernatanti u kojima je određivana koncentracija citokina IFN- $\gamma$  i IL-17.

Ćelije epiderma kože izolovane su prema opisanom protokolu (3.10.1. *Izolacija epidermih i dermih ćelija kože*) 24h nakon senzibilizacije životinja i podešena im je koncentracija na  $1 \times 10^6$  ćelija/ml.  $1 \times 10^5$  ćelija/ml kulture u finalnoj zapremini od 210  $\mu$ l kultivisano je tokom 48h sa medijumom (spontana produkcija) ili LPS-om (100 ng/ml kulture) (stimulisana produkcija). Nakon

centrifugiranja (1200 rpm, 10 min) izdvojeni su supernatanti u kojima je određivana koncentracija citokina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ .

### 3.12.3. Izolacija i postavka kulture ukupnih ćelija uva

Elicitacija je ispitivana na ukupnim ćelijama uva (EĆ+DĆ), u skladu sa drugim studijama gde su ispitivanja vezana za fazu ekspresije reakcije kontaktne preosetljivosti najčešće rađena na ukupnoj populaciji ćelija ovog tkiva (Weber i drugi, 2015; Fujimoto i drugi, 2018; Zemelka-Wiącek i drugi, 2013). Ćelije su izolovane samo iz desnog uva kontrolnih (0.4/0.13% DNCB+0ppm Cd) i tretiranih životinja (0.4/0.13% DNCB+5ppm i 50ppm Cd) na koje je nanošen DNCB. Pomoću pinceta razdvojene su ventralna i dorzalna straha uva i postavljene u ploču sa 24 mesta sa dodatim medijumom (1350  $\mu$ l, bez FCS) i dispazom (2.5 mg/ml kulture). Nakon inkubacije (preko noći, na 4°C) epiderm i derm su razdvojeni, iseckani i postavljeni u nove ploče sa 24 mesta, nakon čega su inkubirani sa kolagenazom (3 mg/ml) i DNazom (10 mg/ml) u trajanju od 2 sata (na 37°C). Nakon inkubacije, ćelije epiderma i derma su propuštene kroz najlon mrežice (50  $\mu$ m, BD Bioscience, Bedford, SAD) u istu epruvetu, resuspendovane u medijumu (sa 5% FCS) i razblažene u 0.1% rastvoru tripana kako bi se automatskim brojačem ćelija (LUNA-IITM, Logos Biosystems, Inc) odredili njihov broj i vijabilnost. Za dalju manipulaciju, ukupne ćelije uva (epidermne i dermne) su podešene na  $1 \times 10^6$  ćelija/ml.  $1 \times 10^5$  ćelija/ml kulture u finalnoj zapremini od 210  $\mu$ l kultivisano je tokom 48h sa medijumom (spontana produkcija), LPS-om (100 ng/ml kulture) ili DNBS-om (10  $\mu$ g/ml kulture) (stimulisana produkcija). Nakon centrifugiranja (1200 rpm, 10 min) izdvojeni su supernatanti u kojima je određivana koncentracija IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-17.

### 3.12.4. Određivanje vijabilnosti ćelija kože i dLČ

Metabolička vijabilnost ćelija epiderma kože ( $1 \times 10^5$ ), ukupnih ćelija uva ( $1 \times 10^5$ ) i njihovih drenirajućih limfnih čvorova (saLČ i aLČ, redom) ( $6 \times 10^5$  ćelija) određivana je kao što je opisano u protokolu (3.10.3. *Određivanje metaboličke vijabilnosti ćelija kože MTT testom*).

### 3.12.5. Određivanje koncentracije citokina ELISA testom u ćelijama uva i dLČ

U fazi senzibilizacije i elicitacije određivana je spontana (spontana) i stimulisana produkcija sa LPS-om (100 ng/ml) IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  u EĆ ćelijama senzibilisane kože ili ukupnim ćelijama uva, redom. Spontana (spontana) i stimulisana produkcija sa DNBS-om (10  $\mu$ g/ml) IFN- $\gamma$  i IL-17 određivana je u ćelijama saLČ 24h i 72h nakon senzibilizacije, kao i ukupnim ćelijama uva i aLČ 24h nakon elicitacije. Koncentracija citokina preračunata je pomoću standardne krive konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija gore navedenih citokina i izražena u pg/ml. Nivo citokina nakon LPS/DNBS izražen je kao indeks stimulacije (odnos stimulisane i spontane produkcije citokina).

### 3.12.6. Određivanje zastupljenosti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija u fazi elicitacije

Ispitivanje zastupljenosti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija rađeno je 24h nakon elicitacije životinja u ukupnoj populaciji ćelija uva i aLČ. Ekspresija membranskih proteina CD4<sup>+</sup> (CD4) i CD8<sup>+</sup> (CD8 $\alpha$ ) ćelija određivana je korišćenjem direktno obeležih mišjih anti-pacovskih anti-CD4 (sa fluorescein izotiocijanatom, FITC) i anti-CD8 (sa fikoeritriinom, PE) antitela (eBioscience Inc, San Diego, CA,

USA). Naime,  $1 \times 10^6$  ćelija/ml uva ili aLČ inkubirano (30 min, na  $4^\circ\text{C}$ ) je sa antitelima u finalnoj zapremini od 100  $\mu\text{l}$ . Nakon inkubacije ćelije su ispirane u PBS i fiksirane dodavanjem paraformaldehida (1%). Za analizu srednje procentualne zastupljenosti  $\text{CD4}^+$  i  $\text{CD8}^+$  pozitivnih ćelija u ukupnojulaciji ćelija uva ili aLČ, korišćen je FACScalibur protočni citofluorimetar (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), i analizirano je minimum 10000 događaja po uzorku. Mereni nivo autofluorecence u kontrolnim uzorcima (gde nisu dodata antitela) bio je manji od 0.5 %.

### **3.13. Statistička obrada rezultata**

Rezutati eksperimenata (iz najmanje tri, a najviše četiri zasebna eksperimenta) predstavljeni su kao srednja vrednost svih merenja sa standardnom devijacijom ( $\pm$  S.D.). Statistička obrada podataka je rađena na kompjuterskom softveru Statsoft STATISTIKA v7.0.61.0. (StatSoft Inc., Tulsa, OK) i korišćen je neparametarski Mann-Whitney  $U$  test. Statistički značajnim smatrane su  $P$  vrednosti manje od 0.05.

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Efekat oralnog unosa kadmijuma na telesnu masu i dnevni unos kadmijuma

Oralni tretman Cd u trajanju od 30 dana (produženi tretman) nije doveo do razlika u telesnoj masi i unosu vode između tretiranih i kontrolnih životinja kod oba soja pacova. Nisu zapažene razlike u dnevnom unosu Cd između DA i AO pacova, preračunatog na osnovu popijene vode i telesne mase životinja (Tabela 3).

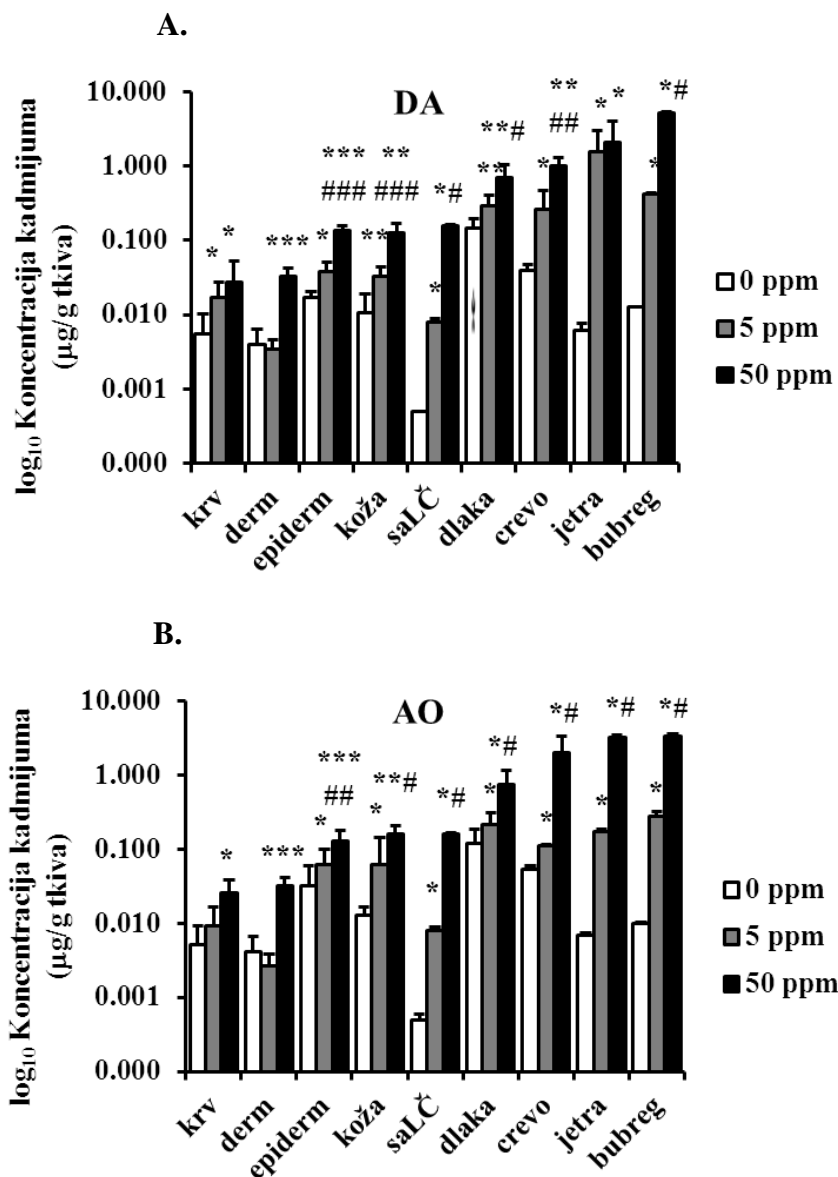
Tabela 3. Masa životinja i dnevni unos kadmijuma Cd

	DA Doza Cd (ppm)			AO Doza Cd (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
masa tela na kraju tretmana (g)	244±20	261±20	247±14	336±20 <sup>\$\$</sup>	345±23 <sup>\$\$</sup>	330±20 <sup>\$\$</sup>
dobijanje na težini (g)	44±18	53±8.1	42±10.4	41±17.3	45±13.9	37±13.4
unos vode (ml/kg t.m.)	140±22	131±19	132±18	132±16	125±12	128±13
prosečni dnevni unos Cd (mg/kg t.m.)	0.0±0.0	0.7±0.1	6.6±1.0	0.0±0.0	0.63±0.07	6.36±0.7

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± S.D; t.m. telesna masa. Statistički značajne razlike: \* <sup>\$\$</sup> $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.2. Koncentracija kadmijuma u tkivima

Merenje koncentracije Cd u tkivima izolovanih iz tretiranih životinja ukazalo je na veću koncentraciju ovog metala u krvi, koži, dlaci, saLČ, crevu, jetri i bubrezima (Slika 5) u poređenju sa kontrolnim životinjama. Najviši nivoi Cd izmereni su u bubrezima i jetri, praćeni visokim nivoima u crevu, dlaci, ukupnoj koži, epidermu i saLČ, dok su u krvi i dermu izmerene najniže vrednosti ovog metala. U svim ispitivanim tkivima uočena je povećana koncentracija Cd nakon unosa više doze (50 ppm) ovog metala, dok je nakon primene niže doze (5 ppm) povećanje izostalo u dermu (oba soja pacova) i krvi (AO pacovi). Dozno-zavisno (veće na 50 ppm u poređenju sa 5 ppm Cd) povećanje koncentracije Cd zapaženo je u svim ispitivanim tkivima oba soja pacova, izuzev u krvi, dermu (oba soja pacova) i jetri gde je bilo prisutno samo kod DA pacova. Koncentracija Cd nije se razlikovala između DA i AO sojeva pacova (Slika 5).



**Slika 5. Deponovanje kadmijuma u tkivima.** (A) DA soj. (B) AO soj. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.1$ , \*\*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , # $P < 0.001$  u odnosu na 50 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.3. Efekat oralnog unosa kadmijuma na akutno-fazne proteine i citokine u perifernoj krvi pacova

Sa ciljem dobijanja podataka o mogućem inflamatornom efektu kadmijuma na sistemskom nivou, određivana je koncentracija akutno-faznih proteina i citokina u perifernoj krvi pacova. Nivoi haptoglobina, fibrinogena i albumina kod životinja tretiranih sa Cd bili su istog opsega kao i kod kontrolnih životinja, i nisu uočene razlike između sojeva (Tabela 4). Koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  merene u plazmi bile su ispod nivoa detekcije kod kontrolnih i tretiranih životinja oba soja pacova.

Tabela 4. Nivo akutno-faznih proteina u perifernoj krvi

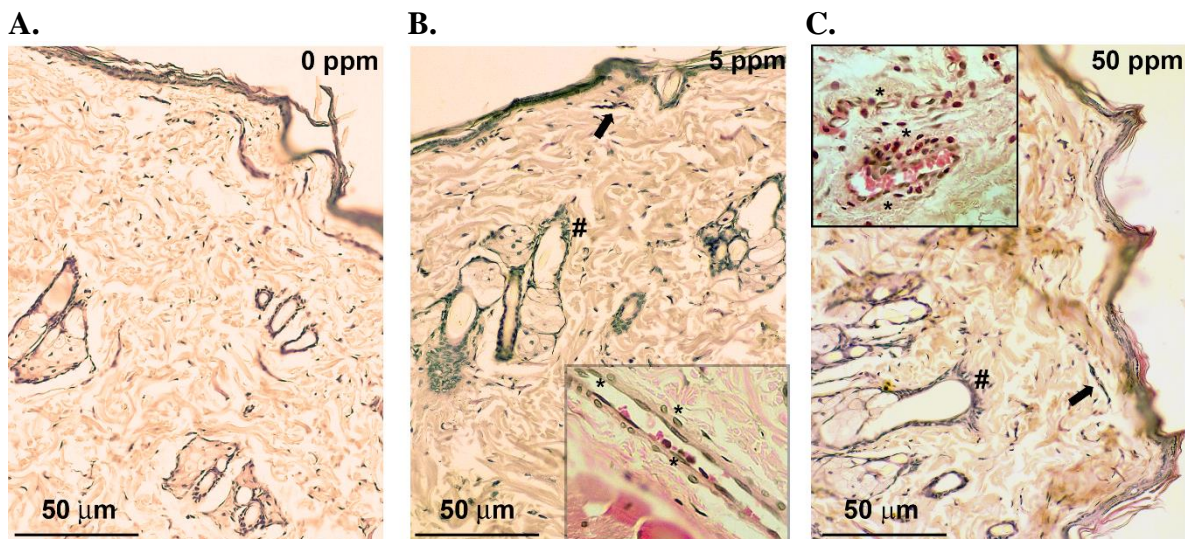
	DA Doza Cd (ppm)			AO Doza Cd (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
<b>haptoglobin</b>	1.0±0.001	0.9±0.26	1.0±0.15	1.0±0.001	1.0±0.4	1.0±0.2
<b>fibrinogen</b>	1.0±0.001	0.9±0.03	1.0±0.003	1.0±0.001	9±0.03	1.0 0.1
<b>albumin</b>	1.0±0.001	1.1±0.12	1.2±0.10	1.0±0.001	0.1±0.2	0.9±0.2

Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti životinja tretiranih Cd u odnosu na kontrolne životinje (kojima je dodeljena vrednost 1) i prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± S.D.

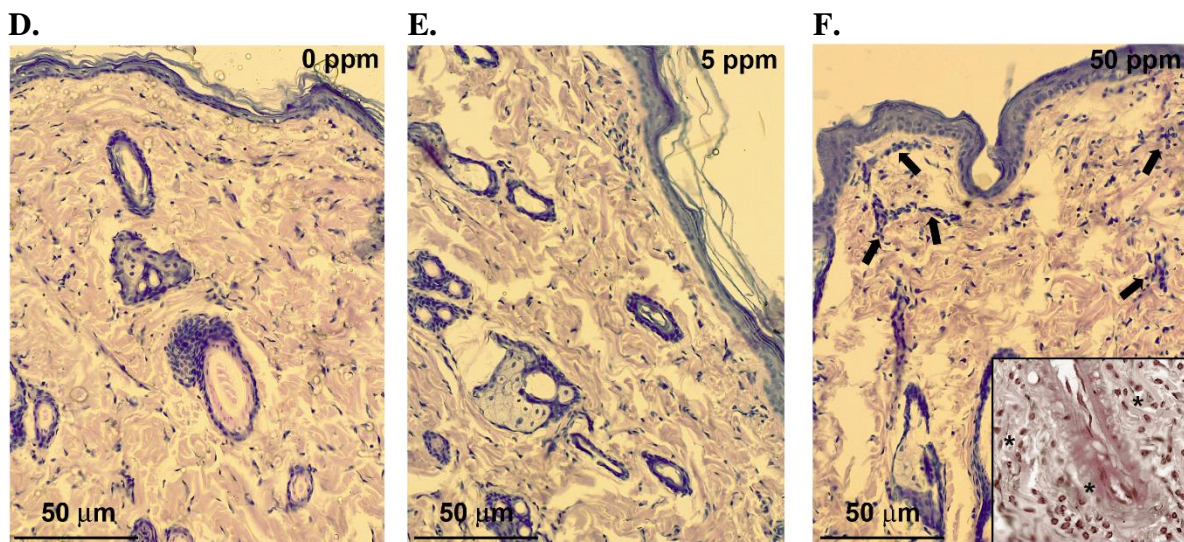
#### 4.4. Histološka analiza kože nakon oralnog unosa kadmijuma

##### 4.4.1. Histološka analiza kože nakon hematoksilin-eozin bojenja

Histološka analiza kože nakon hematoksilin-eozin (H&E) bojenja ukazala je da oralni tretman Cd dovodi do morfoloških i strukturnih promena ovog tkiva kod tretiranih u poređenju sa kontrolnim životinjama. Formiranje novih vaskularnih prostora, hiperkeratoza i hipergranuloza zapaženi su nakon primene obe doze (5 ppm i 50 ppm) Cd kod oba soja pacova. Prisustvo neutrofila uočeno je pri nižoj dozi Cd kod DA pacova i na višoj dozi kod oba soja pacova, dok su prošireni sebaceozni folikuli primećeni samo kod DA pacova (Slika 6). Pored neutrofila, zapaženo je i prisustvo mast ćelija kod jedinki oba soja pacova, nakon primene obe doze (5 ppm i 50 ppm) Cd (Slika 7).



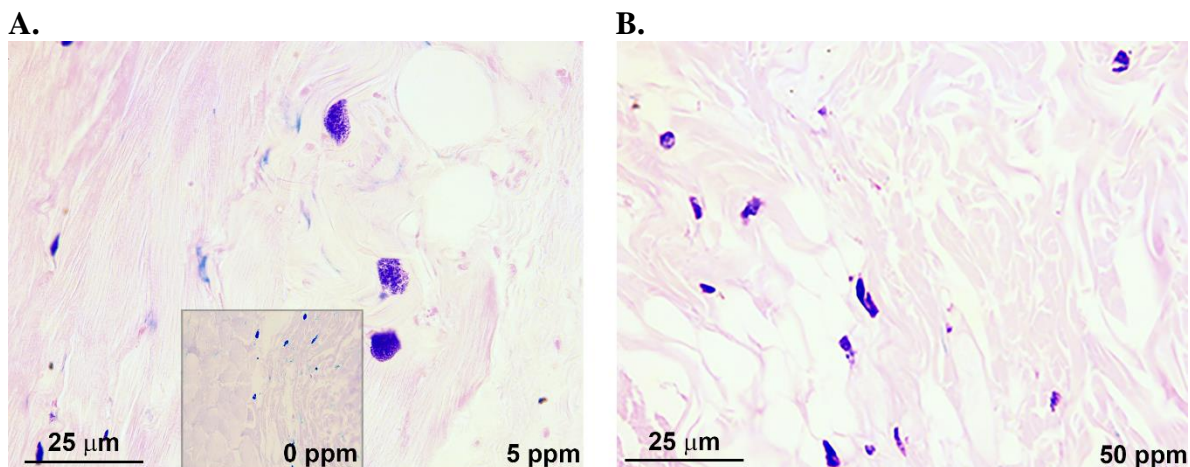


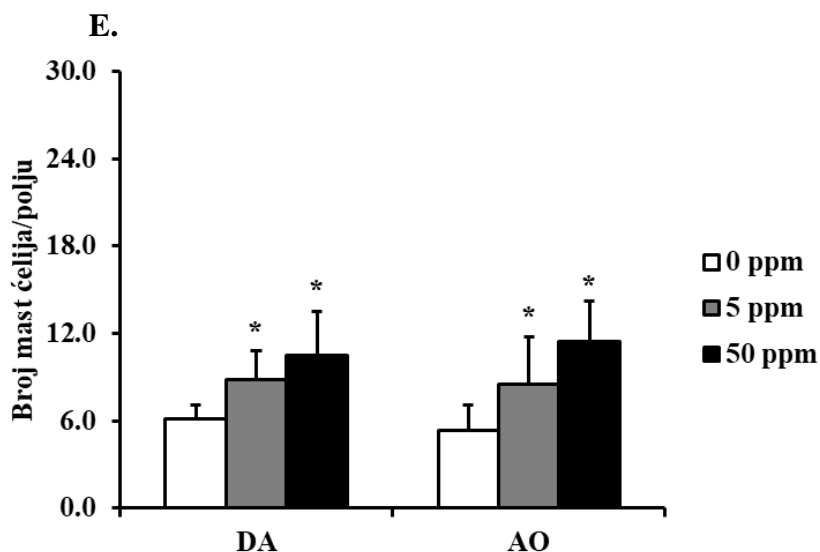
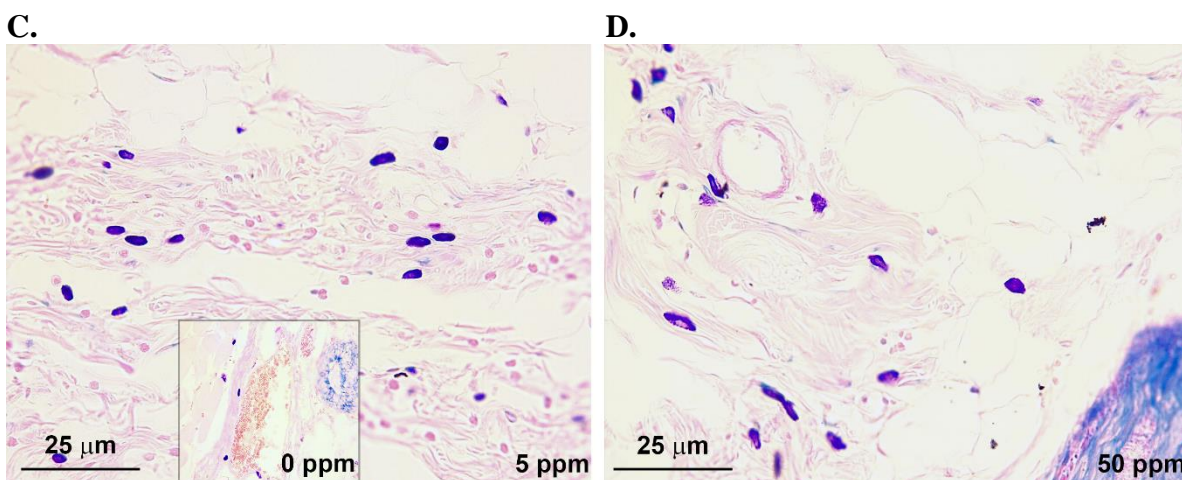


**Slika 6. Histološka analiza kože (H&E bojenje) nakon unosa kadmijuma.** DA (gore), uveličanje  $\times 20$ ; (A, B, C) Epiderm i derm kože DA pacova na 0 ppm, 5 ppm i 50 ppm, redom. (D, E, F) Epiderm i derm kože AO pacova na 0 ppm, 5 ppm i 50 ppm, redom. Novoformirani vaskularni prostori (strelica), dilatacija sebaceoznih folikula (taraba), hiperkeratoza i hipergranuloza. Inserti prikazuju infiltraciju neutrofila (zvezdica).

#### 4.4.2. Efekat oralnog unosa kadmijuma na brojnost mast ćelija u koži

Kvantifikacija mast ćelija (Giemsa bojenje) pokazala je povećan broj mast ćelija kod oba soja nakon primene obe doze Cd (Slika 7A, B, C, D), bez razlika u njihovom broju između sojeva (Slika 7E).

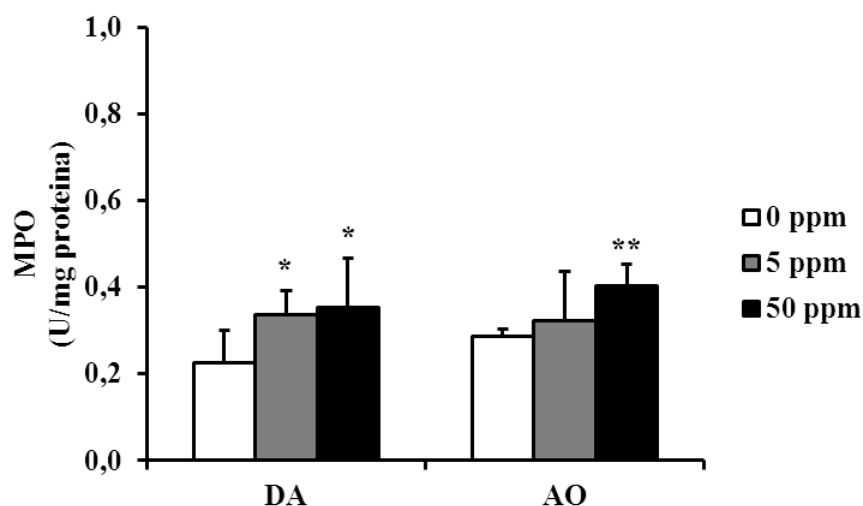




**Slika 7. Broj mast ćelija nakon oralnog unosa kadmijuma.** (A, B) DA soj i (C, D) AO soj na 5 ppm i 50 ppm, redom. Inseti pokazuju kontrole (A) DA i (C) AO pacova. (E) Broj mast ćelija kvantifikovan po polju, uvećanje 400× (10× okular/40× objektiv).

#### 4.4.3. Efekat kadmijuma na aktivnost neutrofila kože

Infiltracija neutrofila u kožu, zapažena nakon histomorfološke analize ovog tkiva (H&E preseci), potvrđena je MPO testom koji se koristi prilikom ispitivanja tkivne infiltracije polimorfonuklearnih leukocita (Schierwagen i drugi, 1990), pri čemu se enzim mijeloperoksidaza (MPO) smatra markerom aktiviranih neutrofila (Bradley i drugi, 1982). Nivo MPO bio je povećan nakon oralnog unosa Cd u homogenatima kože (Slika 8). Porast aktivnosti MPO prisutan je kod DA pacova već nakon primene niže doze Cd (5 ppm), dok je viša doza (50 ppm) Cd dovela do njegove povećane aktivnosti kod oba soja pacova, ali bez razlika među sojevima.

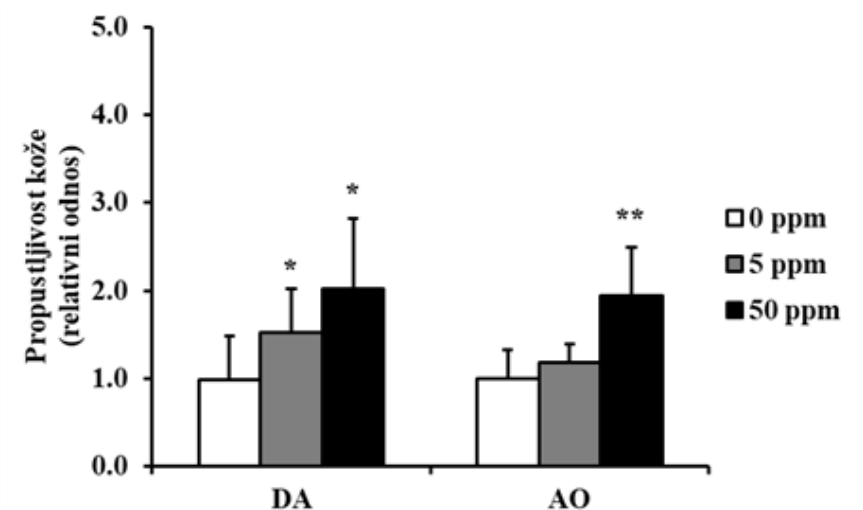


**Slika 8. Aktivnost MPO u homogenatima kože.** Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.5. Efekat oralnog unosa kadmijuma na parametre oštećenja kože

##### 4.5.1. Propustljivost kože

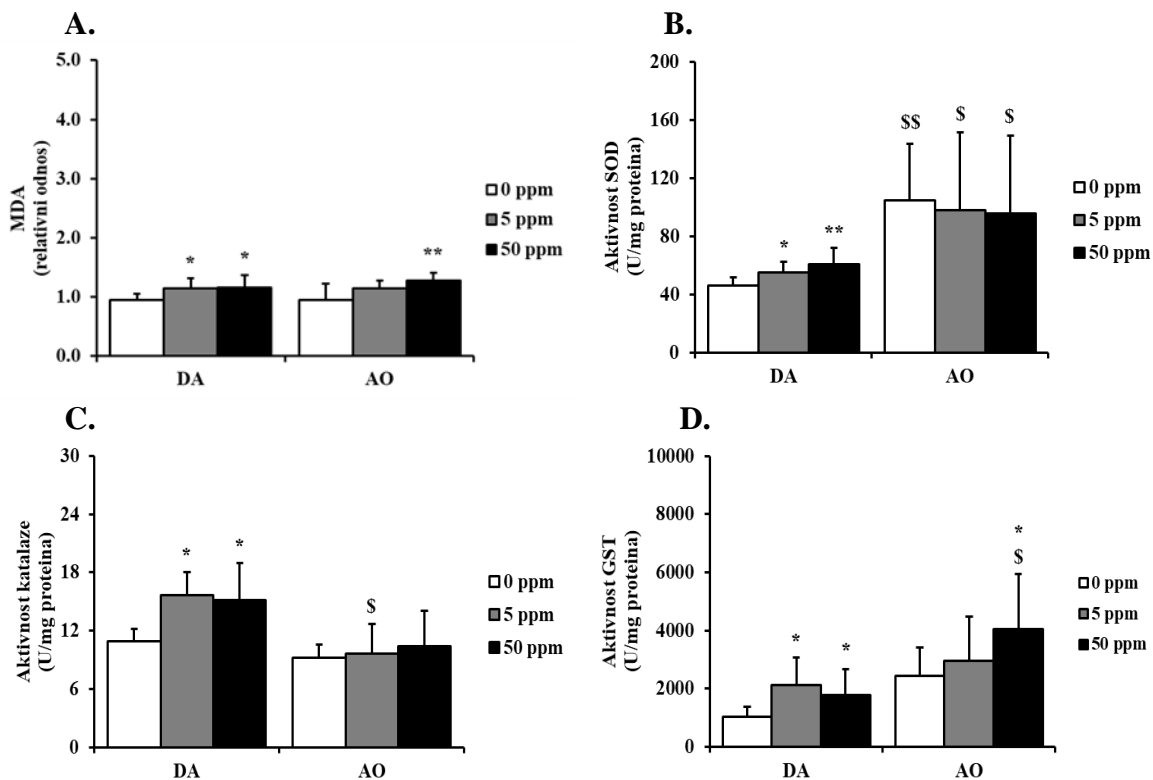
Unošenje više doze (50 ppm) Cd dovelo je do povećane propustljivosti kože kod oba soja (DA i AO) pacova, za razliku od niže doze koja je ovakav efekat ispoljila samo kod životinja DA soja. Nisu zabeležene razlike u propustljivosti kože između sojeva (Slika 9).



**Slika 9. Propustljivost kože.** Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.5.2. Markeri oksidativnog oštećenja u homogenatima kože

Povećanje MDA, markera lipidne oksidacije (Gawel i drugi, 2004) koji se koristi kao mera oštećenja ćelija (Kato, 2016) zapažen je nakon unosa Cd. Kod DA pacova unos obe doze (5 ppm i 50 ppm) ovog metala doveo je do povećanja nivoa MDA, dok je kod AO pacova povećanje uočeno samo nakon unosa više doze (50 ppm) Cd. Nisu uočene razlike u nivou ovog produkta oksidacije između sojeva (Slika 10A). Merenje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, SOD (Slika 10B), CAT (Slika 10C) i GST (Slika 10D), pokazalo je povećanje njihove aktivnosti nakon oralnog unosa obe (5 ppm i 50 ppm) doze Cd kod DA pacova. Kod AO pacova Cd je doveo do povećanja GST na 50 ppm, dok su aktivnosti ostalih enzima ostale nepromenjene. Poređenje aktivnosti ovih enzima između AO i DA soja pokazalo je generalnu veću aktivnost SOD (0 ppm, 5 ppm i 50 ppm Cd) i GST (50 ppm Cd) kod AO pacova.

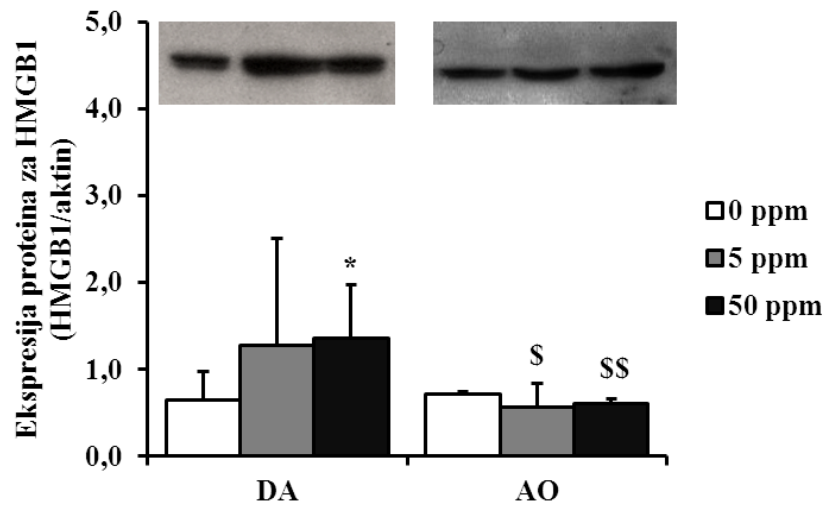


**Slika 10. Pokazatelji oksidativnih oštećenja u homogenatima kože.** (A) MDA. (B) SOD. (C) CAT. (D) GST. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$ $P < 0.05$ , \$\$ $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.5.3. Nivo HMGB1 molekula u homogenatima kože

Nivo HMGB1 molekula, koji se oslobađa iz oštećenih ili nekrotičnih ćelija (Scaffidi i drugi, 2002), povišen je samo kod DA pacova nakon unosa obe doze ( $P=0.08$ , na 5 ppm) Cd u odnosu na kontrolne životinje. Kod AO pacova nisu uočene razlike u koncentraciji ovog molekula između

kontrolnih i tretiranih životinja, i njihov nivo bio je niži u poređenju sa DA pacovima (nakon obe doze Cd) (Slika 11).



Slika 11. Nivo HMGB1 molekula u homogenatima kože. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.6. Efekat oralnog unosa kadmijuma na vijabilnost kože i produkciju proinflamatornih citokina metodom organokulture eksplanata kože

##### 4.6.1. Metabolička vijabilnost

Korišćenjem MTT testa za određivanje metaboličke vijabilnosti pokazano je da Cd ne dovodi do promene metaboličke aktivnosti ćelija u sveže kultivisanim eksplantima kože i u 24-satnoj organokulturi eksplanata kože (Tabela 5). MTT indeks (odnos redukovano MTT u organokulturi gajenoj 24h i 0h tj sveže postavljenoj kulturi) nije se razlikovao između kontrolnih i tretiranih životinja kod DA i AO pacova nakon unosa obe doze (5 ppm i 50 ppm) Cd.

Tabela 5. Metabolička vijabilnost organokulture eksplanata kože

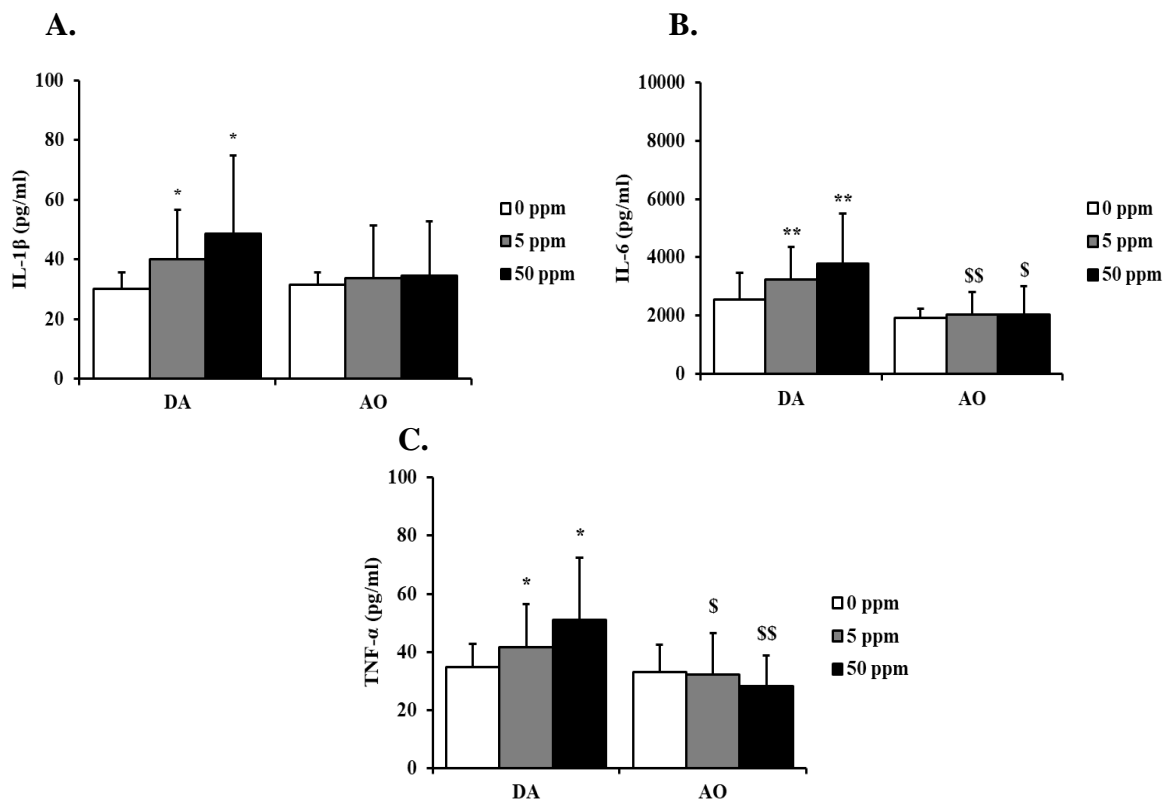
MTT (A540 nm/g tkiva)	DA Doza Cd (ppm)			AO Doza Cd (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
0h	31.2 $\pm$ 11.2	37.2 $\pm$ 12.3	33.7 $\pm$ 9.3	25.1 $\pm$ 6.8	21.9 $\pm$ 7.5	25.8 $\pm$ 6.2
24h	21.3 $\pm$ 6.2	26.4 $\pm$ 18.5	17.4 $\pm$ 8.4	12.7 $\pm$ 4.1	13.8 $\pm$ 9.0	11.9 $\pm$ 3.4

<b>24h/0h</b>	0.7±0.2	0.8±0.6	0.6±0.3	0.5±0.2	0.7±0.2	0.5±0.2
---------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± S.D.

#### 4.6.2 Produkcija proinflamatornih (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) citokina

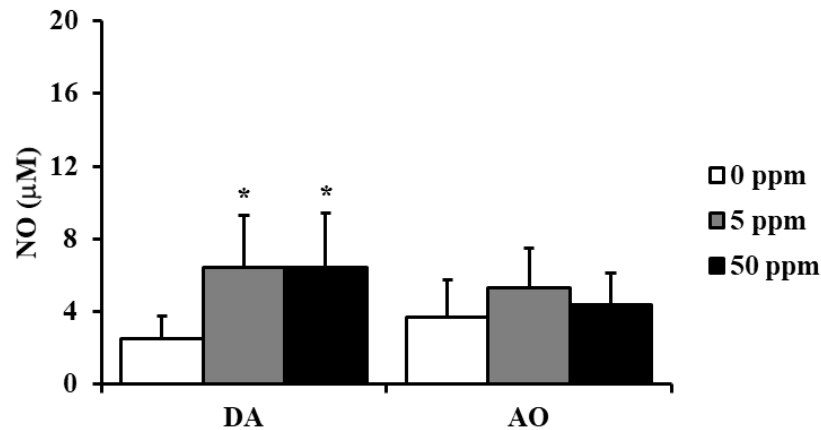
U kondicioniranom medijumu organokulture eksplanata kože zapaženo je povećanje proinflamatornih (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) citokina kod DA pacova tretiranih Cd, dok je njihov nivo ostao nepromenjen kod AO pacova. Nivoi IL-1 $\beta$  (Slika 12B), IL-6 (Slika 12B) i TNF- $\alpha$  (Slika 12C) kod DA soja bili su povećani nakon obe doze (5 ppm i 50 ppm) Cd, dok su niže koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  zapažene kod AO soja (u poređenju sa DA sojem).



**Slika 12. Produkcija proinflamatornih citokina u organokulturi eksplanata kože.** (A) IL-1 $\beta$ . (B) IL-6. (C) TNF- $\alpha$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja;  $\$P < 0.05$ ,  $\$\$P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.6.3. Produkcija azot-monoksida (NO)

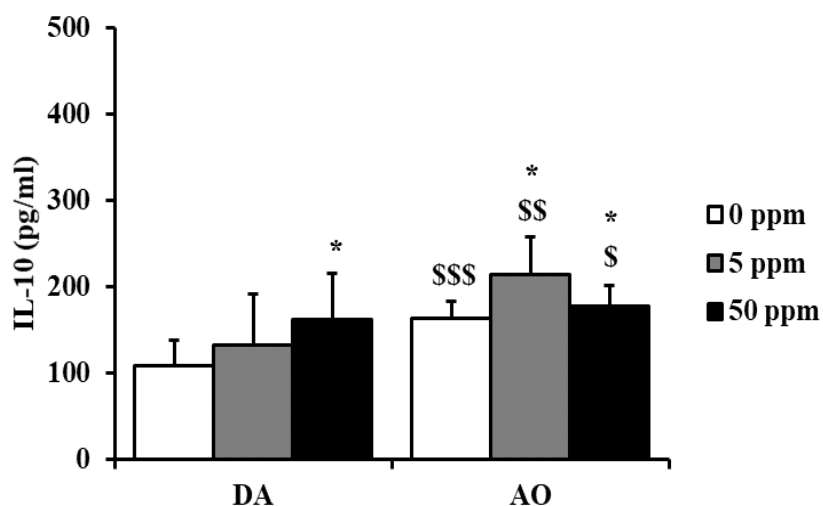
Ispitivanje stvaranja NO, još jednog medijatora inflamacije (Sharma i drugi, 2007), pokazalo je da koža DA pacova na prisustvo Cd (obe doze) može da odgovori povećanom produkcijom ovog molekula. Količina oslobođenog NO kod AO pacova ostala je nepromenjena nakon primene Cd, i nisu uočene sojne razlike između DA i AO pacova (Slika 13).



**Slika 13. Produkcija azot-oksida u organokulturi eksplanata kože.** Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.6.4. Produkcija antiinflamatornog citokina IL-10

Ispitivanje produkcije IL-10 u kondicioniranom medijumu organokulture eksplanata kože pokazalo je da Cd dovodi do njegove povećane produkcije kod tretiranih u poređenju sa kontrolnim životinjama. Nivo IL-10 povećan je već pri nižoj dozi (5 ppm), i praćen je povećanjem i nakon više doze (50 ppm) Cd kod AO pacova, dok je njegov efekat na produkciju IL-10 kod DA pacova zapažen samo pri višoj dozi (50 ppm). Na postojanje sojnih razlika u produkciji IL-10 od strane eksplanata kože, ukazao je i generalno veći nivo ovog citokina kod sve tri grupe (0 ppm, 5 ppm i 50 ppm) AO soja u odnosu na DA soj (Slika 14).



**Slika 14. Produkcija IL-10 u organokulturi eksplanata kože.** Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja;  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{SS}P < 0.01$ ,  $^{SSS}P < 0.001$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.7. Efekat oralnog unosa kadmijuma na epidermne ćelije kože

Kako je zapaženo da se Cd u većoj meri deponuje u epidermu kože u poređenju sa dermom (Slika 5), naša dalja istraživanja usmerili smo na ispitivanje efekta oralnog unosa Cd na EĆ.

##### 4.7.1. Vijabilnost epidermnih ćelija

Tretman Cd nije doveo do promena u procentualnoj zastupljenosti vijabilnih ćelija epiderma i njihovoj metaboličkoj vijabilnosti merenoj MTT testom odmah nakon njihove izolacije (0h), kod tretiranih u poređenju sa kontrolnim životinjama (oba soja pacova) (Tabela 6).

**Tabela 6. Vijabilnost ćelija epiderma**

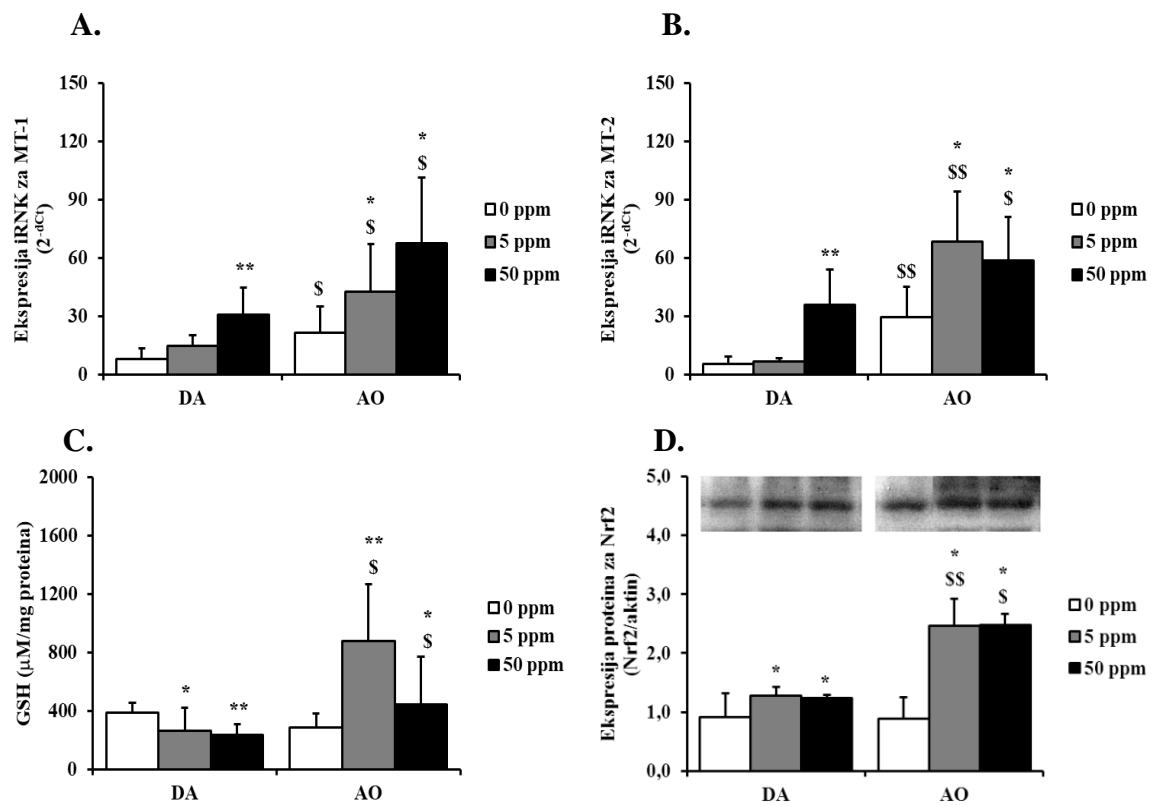
	DA Doza Cd (ppm)			AO Doza Cd (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
<b>vijabilnost (%)</b>	66.2 $\pm$ 11.2	69.2 $\pm$ 12.3	64.9 $\pm$ 12.3	63.5 $\pm$ 5.5	64.6 $\pm$ 7.4	61.7 $\pm$ 9.8
<b>MTT (0h) (A540nm)</b>	0.16 $\pm$ 0.11	0.18 $\pm$ 0.11	0.15 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.10	0.15 $\pm$ 0.09	0.17 $\pm$ 0.09

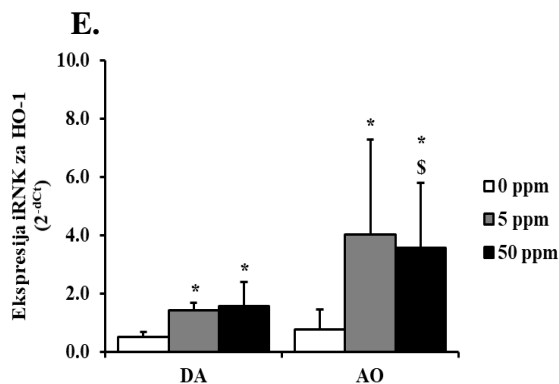
Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D.



#### 4.7.2. Odgovor epidermnih ćelija na stres izazvan kadmijumom

Odgovor ćelija kože na kadmijum je ispitivan merenjem osnovnih parametara stres odgovora (iRNK za metalotioneine, koncentraciju GSH), kao i put transkripcionog faktora Nrf2. Tretman Cd izazvao je stres odgovor EĆ kod oba soja pacova. Nivoi ekspresije iRNK za MT-1 (Slika 15A) i MT-2 (Slika 15B) povećani su u EĆ DA i AO pacova na 50 ppm Cd, dok je kod AO pacova ovakav efekat Cd primećen već na 5 ppm. Povećan bazalni nivo (u kontrolnim životinjama) ekspresije gena za MT kod AO pacova u poređenju sa DA pacova, praćen je dodatnim povećanjem ovih gena kod tretiranih životinja (na obe doze Cd). Različiti obrazac promena nakon tretmana Cd uočen je u nivou GSH (Slika 15C) kod DA i AO pacova, odnosno smanjenje kod DA pacova, a povećanje ovog antioksidanta kod AO pacova (veće u poređenju sa DA pacovima) nakon obe doze Cd. U EĆ oba soja pacova zapaženo je i povećanje Nrf2 proteina (Slika 15D) i ekspresije iRNK za HO-1 (Slika 15E) na 5 ppm i 50 ppm Cd. Analiza sojnih razlika ukazala je na veći nivo Nrf2 proteina (5ppm i 50 ppm) i HO-1 (50 ppm) kod jedinki AO soja u poređenju sa DA pacovima (Slika 15D, E).

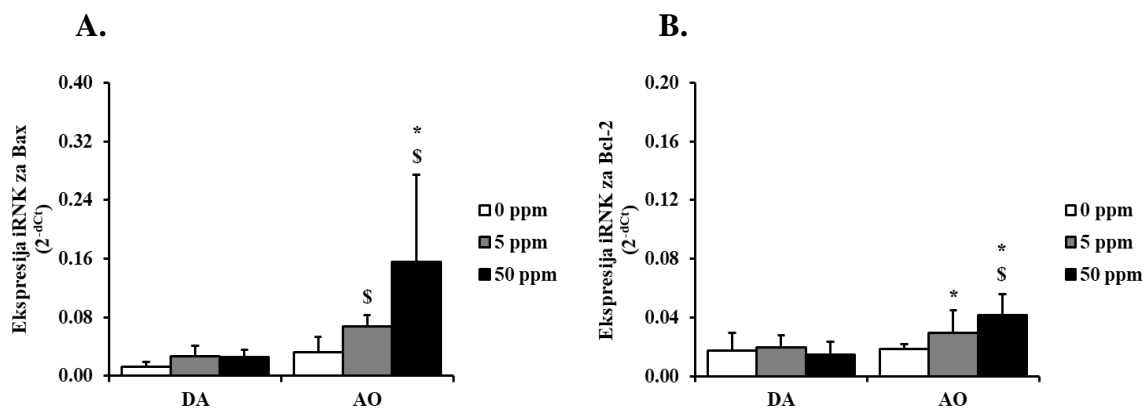


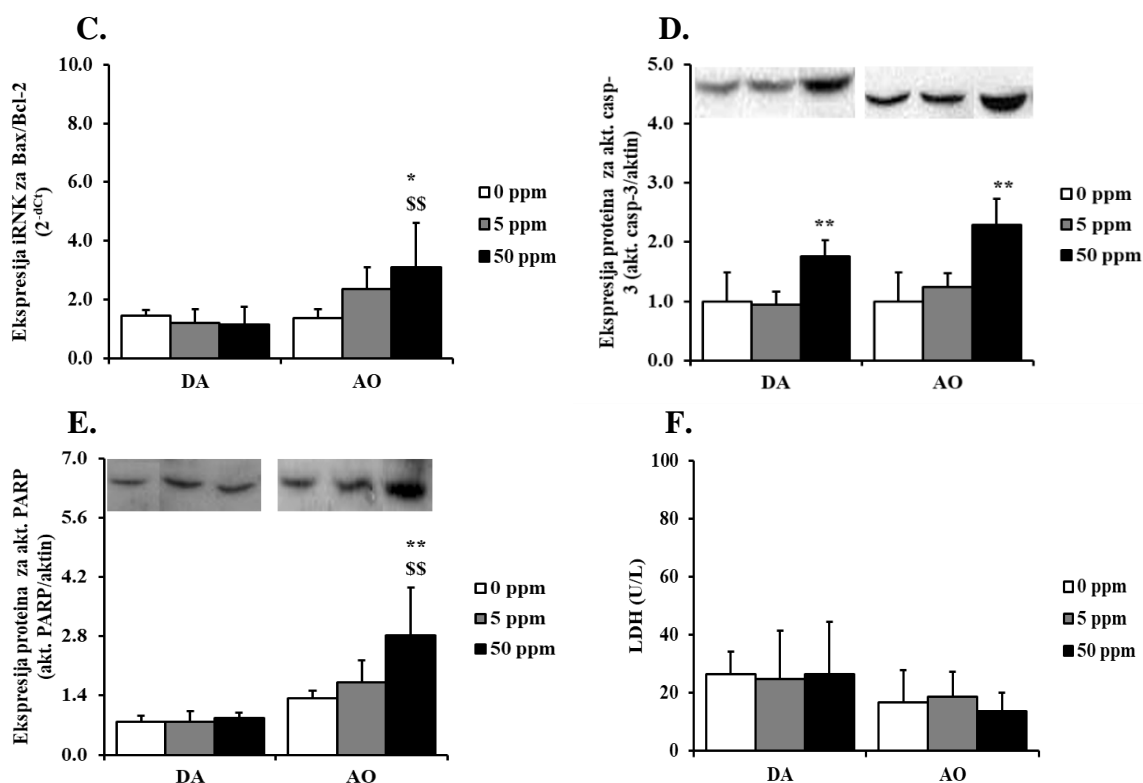


**Slika 15. Efekat kadmijuma na stres odgovor epidermnih ćelija.** (A) Ekspresija iRNK za MT-1 i (B) MT-2. (C) GSH. (D) Ekspresija proteina za Nrf2. (E) Ekspresija iRNK za HO-1. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva ili tri nezavisna eksperimenta ± S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$ $P < 0.05$ , \$\$ $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.7.3. Ispitivanje efekta kadmijuma na apoptozu i nekrozu epidermnih ćelija

Ispitivanje apoptotskih gena pokazalo je da tretman Cd kod AO pacova dovodi do povećanja iRNK za Bax (Slika 16A) i Bcl-2 (Slika 16B) na obe doze Cd (Bax na 5 ppm  $P=0.07$ ), kao i njihovog odnosa (Bax/Bcl-2) (Slika 16C) koji se koristi za procenu apoptoze (Halder i drugi, 2008; Lončarević-Vasiljković i drugi, 2016) na 50 ppm Cd. Sa druge strane, promene u nivou ovih apoptotskih gena nisu uočene kod DA soja pacova nakon tretmana Cd, dok je analiza nivoa ekspresije između sojeva ukazala na generalno višu ekspresiju Bax (obe doze Cd), kao i Bcl-2 i Bax/Bcl-2 (50 ppm Cd) kod AO pacova u poređenju sa DA pacovima. Zapaženo povećanje apoptoze kod AO soja dodatno je potvrđeno analizom aktiviranih proteinskih formi casp-3 (Slika 16D) i PARP (Slika 16E), čiji su nivoi veći nakon primene više (50 ppm) doze Cd u poređenju sa kontrolom. Iako je kod DA soja takođe uočen povećani nivo aktivirane forme casp-3 (50 ppm Cd), nivo ekspresije proteina PARP ostao je nepromenjen usled oralnog unosa Cd. Ispitivanje nivoa LDH, markera nekroze, nije ukazalo na razlike između kontrolnih i tretiranih grupa unutar sojeva, kao ni između njih (Slika 16F).

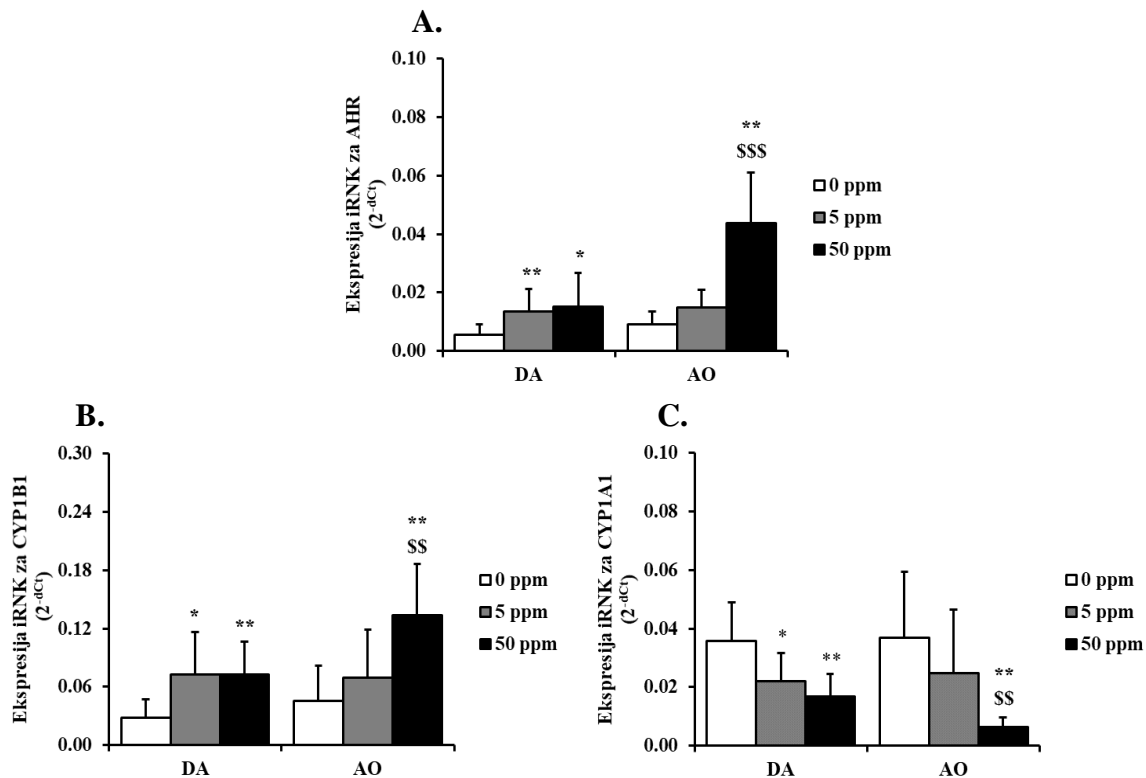




**Slika 16. Ispitivanje apoptoze i nekroze epidermnih ćelija nakon oralnog unosa kadmijuma.** (A) Ekspresija iRNK za Bax i (B) Bcl-2. (C) Odnos iRNK Bax/Bcl-2. (D) Ekspresija proteina za aktiviranu formu casp-3 i (E) PARP. (F) LDH. Bax/Bcl-2 predstavlja odnos ekspresije Bax i Bcl-2 gena. Akt. casp-3/aktin i akt. PARP/aktin predstavljaju odnose ekspresije casp-3 i PARP proteina u odnosu na aktin, redom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 2 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$ $P < 0.05$ , \$\$ $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.7.4. Ekspresija gena uključenih u AHR put u epidermnim ćelijama

S obzirom da AHR poseduje bitnu ulogu u održavanju integriteta kože (Esser i drugi, 2013) i da je uključen u odgovor na ksenobiotike generalno, (o čemu, kada je Cd u pitanju skoro da nema podataka) (Kluxen i drugi, 2012), analiziran je efekat oralnog unosa Cd na ekspresiju gena za AHR i gena asociranih sa ovim receptorom tj CYP1A1 i CYP1B1 (Lin i drugi, 2003) u EĆ. Povećana ekspresija gena za AHR (Slika 17A) i CYP1B1 (Slika 17B), a smanjena ekspresija za CYP1A1 (Slika 17C), zapažena je kod DA (5 ppm i 50 ppm) i AO (50 ppm) pacova nakon primene Cd. Viša doza (50 ppm) Cd dovela je do izraženijih promena kod AO (povećanje AHR i CYP1B1, smanjenje CYP1A1) u poređenju sa DA pacovima.

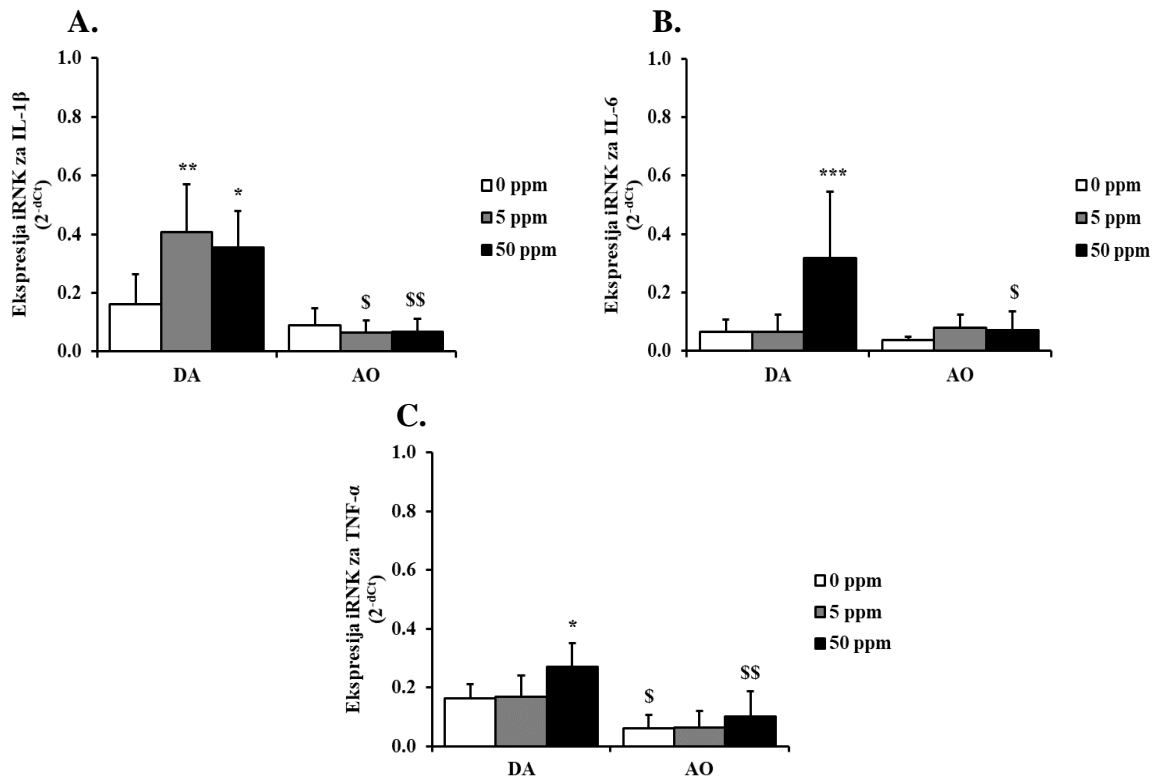


**Slika 17. Efekat kadmijuma na ekspresiju gena AHR puta u epidermnim ćelijama.** (A) AHR. (B) CYP1B1. (C) CYP1A1. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$\$ $P < 0.01$ , \$\$\$ $P < 0.001$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.7.5. Citokinski odgovor epidermnih ćelija

##### 4.7.5.1. Ekspresija iRNK za proinflamatorne ( $IL-1\beta$ , $IL-6$ , $TNF-\alpha$ ) citokine

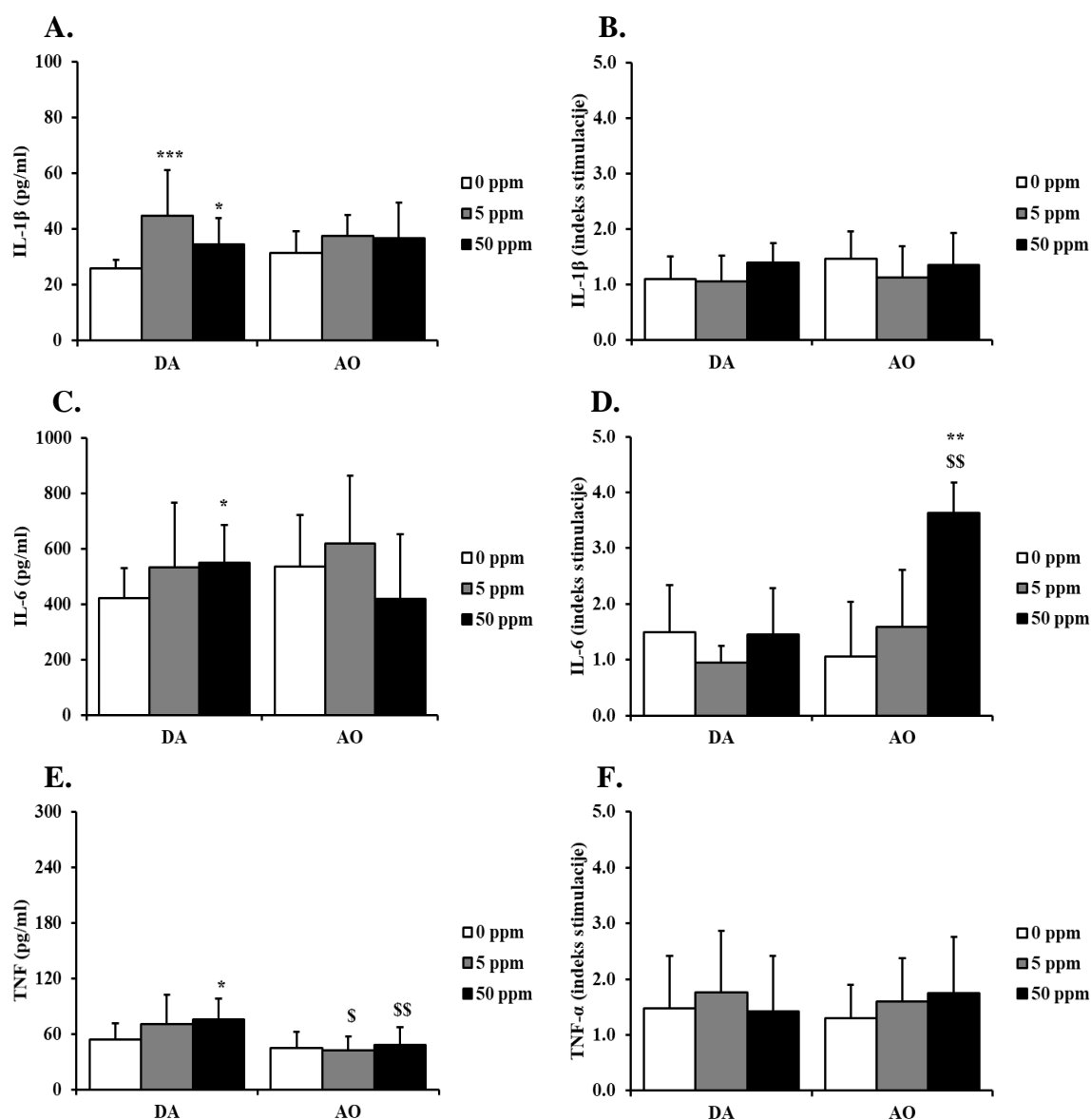
Tretman Cd uzrokovao je povećanu ekspresiju gena za proinflamatorne citokine ( $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $TNF-\alpha$ ) u EĆ DA pacova, dok su njihovi nivoi ostali nepromenjeni kod AO pacova (Slika 18). Niža doza (5 ppm) Cd kod DA pacova povećala je nivo ekspresije iRNK samo za  $IL-1\beta$  (Slika 18A), dok je viša (50 ppm) doza povećala ekspresiju gena za  $IL-6$  (Slika 18B) i  $TNF-\alpha$  (Slika 18C), pored  $IL-1\beta$ . Poređenjem nivoa između sojeva, uočena je generalno niža ekspresija gena za  $IL-1\beta$  (5 ppm i 50 ppm),  $IL-6$  (50 ppm) i  $TNF-\alpha$  (50 ppm) kod AO pacova.



**Slika 18. Efekat kadmijuma na ekspresiju gena za proinflamatorne citokine u epidermnim ćelijama.** (A) IL-1 $\beta$ . (B) IL-6. (C) TNF- $\alpha$ . Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>\$</sup> $P < 0.05$ , <sup>\$\$</sup> $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.7.5.2. Produkcija proinflamatornih (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) citokina

Unos Cd povećao je produkciju proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) u kondicioniranom medijumu EĆ izolovanih iz tretiranih u poređenju sa kontrolnim životinjama DA pacova, dok su njihovi nivoi ostali nepromenjeni kod AO pacova (Slika 19). Spontana produkcija IL-1 $\beta$  (Slika 19A) nakon primene obe doze Cd, i IL-6 (Slika 19C) i TNF- $\alpha$  (Slika 19E) samo na 50 ppm Cd od strane EĆ DA pacova, u korelaciji je sa njihovom genskom ekspresijom. Manja produkcija TNF- $\alpha$  kod AO pacova u poređenju sa DA pacovima, zapažena je na 5 ppm i 50 ppm Cd. Analiza indeksa stimulacije (LPS/spontana produkcija), ukazala je na povećanje nivoa IL-6 (50 ppm Cd) (Slika 19D) kod jedinki AO soja, za razliku od IL-1 $\beta$  (Slika 19B) i TNF- $\alpha$  (Slika 19F) čiji su indeksi stimulacije ostali nepromenjeni kod oba soja pacova.

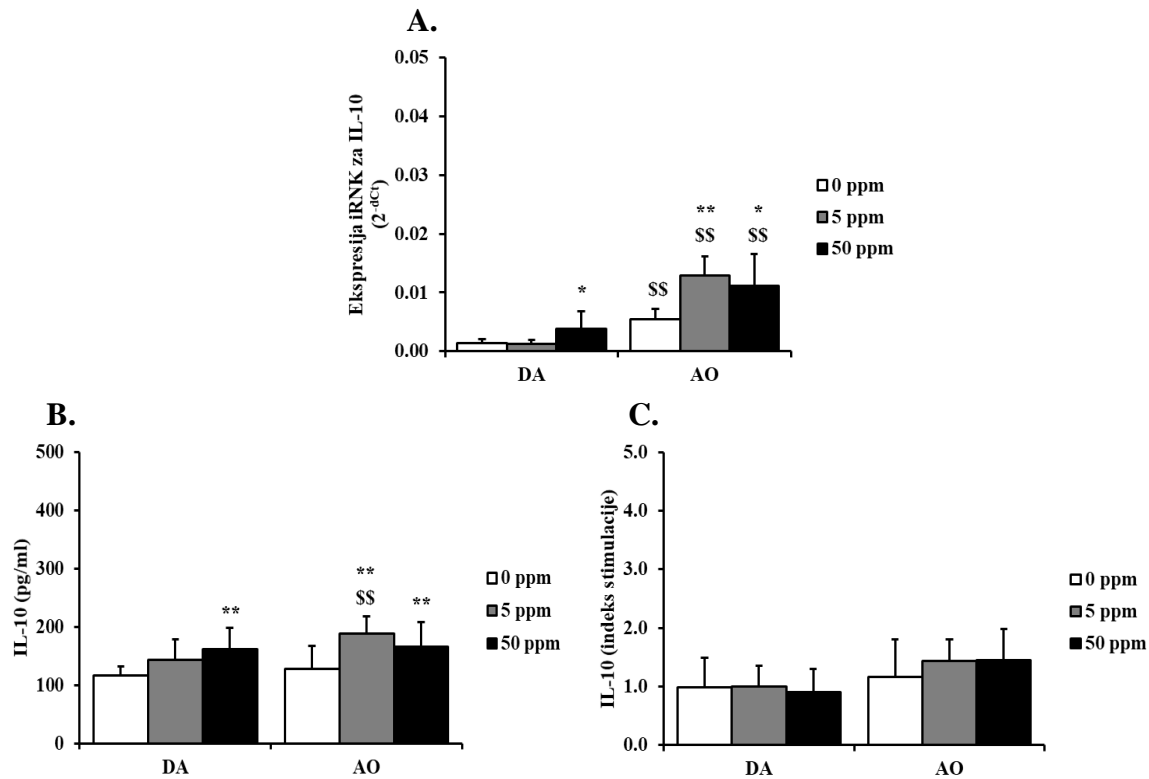


**Slika 19. Efekat kadmijuma na produkciju proinflamatornih citokina od strane epidermih ćelija.** (A, B) Spontana produkcija i indeks stimulacije za IL-1 $\beta$ , (C, D) IL-6 i (E, F) TNF- $\alpha$ . Indeks stimulacije predstavlja odnos LPS-stimulisane produkcije i spontane produkcije (LPS/spontana produkcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$ $P < 0.05$ , \$\$ $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.7.5.3. Ekspresija gena i produkcija IL-10

Na nivou ekspresije gena za IL-10 (Slika 20A) uočeno je povećanje iRNK za ovaj citokin kod AO pacova već pri nižoj (5 ppm) dozi, ali i kod oba soja pacova pri višoj (50 ppm) dozi Cd, dok je uporedna analiza između sojeva ukazala na generalno veću ekspresiju gena (na 0 ppm, 5 ppm i 50 ppm Cd) kod AO soja u poređenju sa DA sojem. Produkcija IL-10 od strane EĆ (Slika 20B) pratila je ekspresiju gena, odnosno bila je povećana kod oba soja na 50 ppm, a kod AO pacova i na 5 ppm Cd (veće u odnosu na DA soj). Indeks stimulacije (LPS/spontana produkcija) za IL-10 nije ukazao na

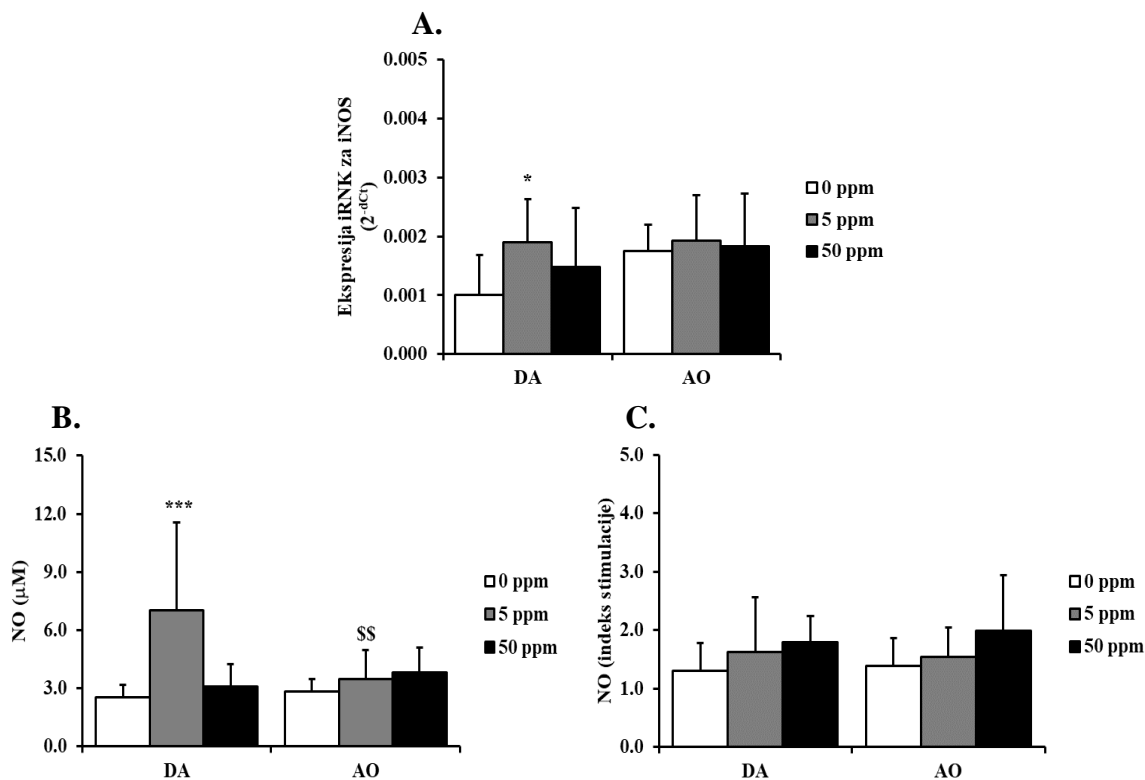
promenu u nivou produkcije ovog citokina između tretiranih i kontrolnih grupa, kao ni između sojeva (Slika 20C).



**Slika 20. Efekat kadmijuma na IL-10 epidermih ćelija.** (A) Ekspresija iRNK. (B) Spontana produkcija. (C) Indeks stimulacije. Indeks stimulacije predstavlja odnos LPS-stimulisane produkcije i spontane produkcije (LPS/spontana produkcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$\$ $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.7.6. Produkcija NO od strane epidermih ćelija

Zapaženo povećanje nivoa ekspresije gena za iNOS (Slika 21A) kod DA pacova na 5 ppm Cd, praćeno je povećanjem nivoa spontane produkcije NO (Slika 21B) merenog u kondicioniranom medijumu EĆ. Tretman Cd nije uticao na spontanu produkciju NO od strane EĆ AO pacova (iako je zapažen niži nivo na 5 ppm Cd u poređenju sa DA pacovima), dok analiza odnosa stimulisane produkcije NO sa LPS-om i spontane produkcije nije ukazala na promene njegovog nivoa kod oba soja pacova (Slika 21C).

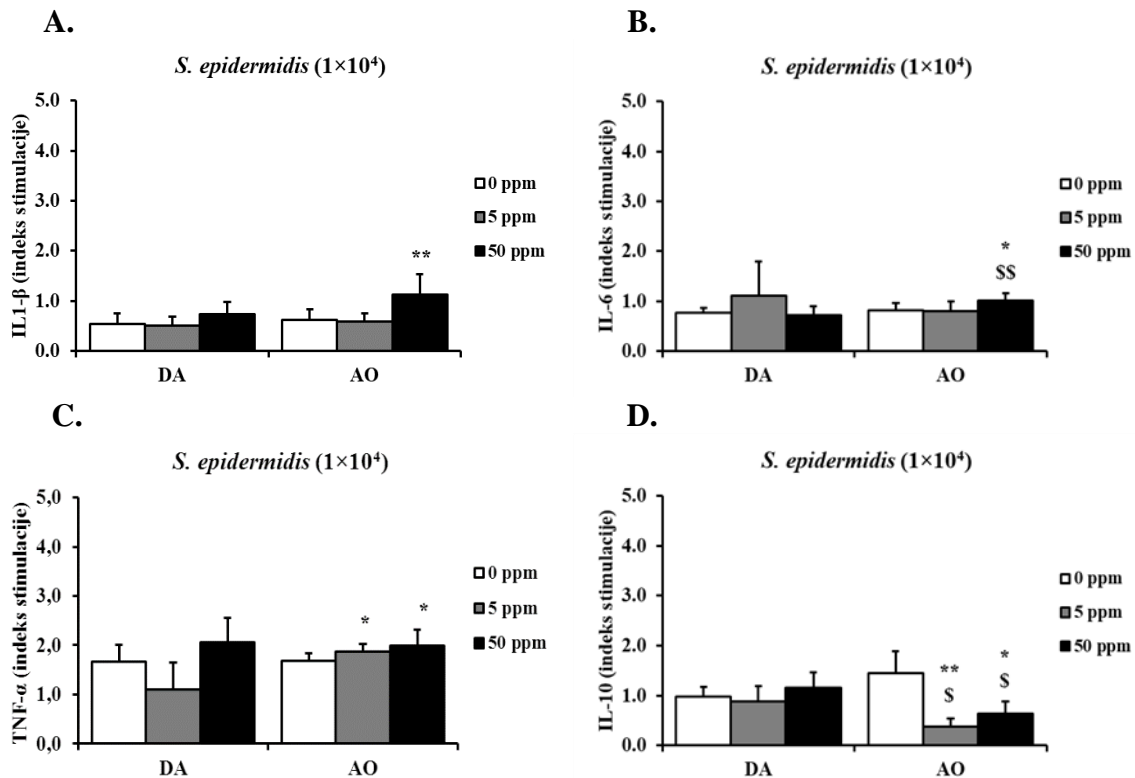


**Slika 21. Efekat kadmijuma na NO u epidermnim ćelijama.** (A) Ekspresija iRNK za iNOS. (B) Spontana produkcija NO. (C) Indeks stimulacije za NO. Indeks stimulacije predstavlja odnos LPS-stimulisane produkcije i spontane produkcije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>SS</sup> $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.7.7. Odgovor epidermnih ćelija na *S. epidermidis*

Kako bi se dalje ispitalo da li Cd može da pripremi EĆ za odgovor na dodatni imunološki stimulus, analizirana je reaktivnost EĆ (izolovanih iz životinja izloženih ovom metalu ili kontrolnih) na *ex vivo* stimulaciju komensalnom bakterijom kože *S. epidermidis*. Ova bakterija u nekim uslovima može da dovede do inflamacije, što je pokazano i u *in vitro* istraživanjima (Dong i drugi, 2019; Megyeri i drugi, 2002; Wilsson i drugi, 2008). Analiza indeksa stimulacije (*S. epidermidis*/spontana produkcija) citokina u kondicioniranom medijumu EĆ AO pacova pokazala je povećanje proinflamatornih (IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ), a smanjenje antiinflamatornog citokina IL-10. Povećani indeksi stimulacije citokina pokazani su za TNF- $\alpha$  (Slika 22C) nakon primene obe doze Cd, kao i IL-1 $\beta$  (Slika 22A) i IL-6 (Slika 22B) samo nakon primene više (50 ppm) Cd kod AO pacova, kao i smanjeni indeks stimulacije za IL-10 nakon obe doze Cd (Slika 22D). Kod DA pacova indeks stimulacije nije ukazao na promene u produkciji ovih citokina (Slika 22). Na viši nivo IL-6 (50 ppm), a niži nivo IL-10, (obe doze Cd) kod AO pacova ukazala je uporedna analiza citokina između dva soja pacova.





**Slika 22. Efekat kadmijuma na produkciju citokina nakon *ex vivo* stimulacije epidermih ćelija sa *S. epidermidis*.** (A) IL-1 $\beta$ . (B) IL-6. (C) TNF- $\alpha$ . (D) IL-10. Indeks stimulacije predstavlja odnos *S. epidermidis*-stimulisane produkcije i spontane produkcije (*S. epidermidis*/spontana produkcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 2 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$ $P < 0.05$ , \$\$ $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.7.8. Vijabilnost epidermih ćelija u kulturi

Ispitivanje efekta Cd na metaboličku vijabilnost ćelija u kulturi EĆ nakon kultivacije (48h), nije ukazao na kompromitovanu redukciju MTT kod DA pacova (0.15 $\pm$ 0.02, 0.16 $\pm$ 0.02, 0.17 $\pm$ 0.02 kod spontane produkcije i 0.15 $\pm$ 0.02, 0.15 $\pm$ 0.02, 0.16 $\pm$ 0.02 kod stimulacije LPS-om na 0 ppm, 5 ppm i 50 ppm, redom) i AO pacova (0.13 $\pm$ 0.02, 0.14 $\pm$ 0.02, 0.16 $\pm$ 0.02 kod sponatne i 0.16 $\pm$ 0.02, 0.15 $\pm$ 0.02, 0.15 $\pm$ 0.03 kod stimulacije LPS-om).

#### 4.7.9. Produkcija citokina u kokulturi epidermih ćelija i limfocita

Kako je poznato da EĆ interaguju sa T ćelijama u koži (Nestle i drugi, 2009), naročito tokom razvoja hroničnih inflamatornih bolesti kože (Albanesi, 2010; Orlik i drugi, 2019), ispitan je efekat oralnog unosa Cd na imunski potencijal EĆ da stimulišu T ćelije, u kokulturi naivnih limfocita (izolovanih iz dLČ kože netretiranih životinja) i EĆ izolovanih iz kontrolnih ili životinja tretiranih sa Cd (Slike 23, 24). Procena aktivnosti T ćelija uključivala je ispitivanje produkcije proinflamatornih (IFN- $\gamma$ , IL-17 i IL-6) i antiinflamatornog citokina (IL-10). Naime, pokazano je da keratinociti mogu da dovedu do polarizacije T<sub>H1</sub> i T<sub>H17</sub> odgovora i produkcije IFN- $\gamma$  i IL-17 od strane T ćelija (Orlik i

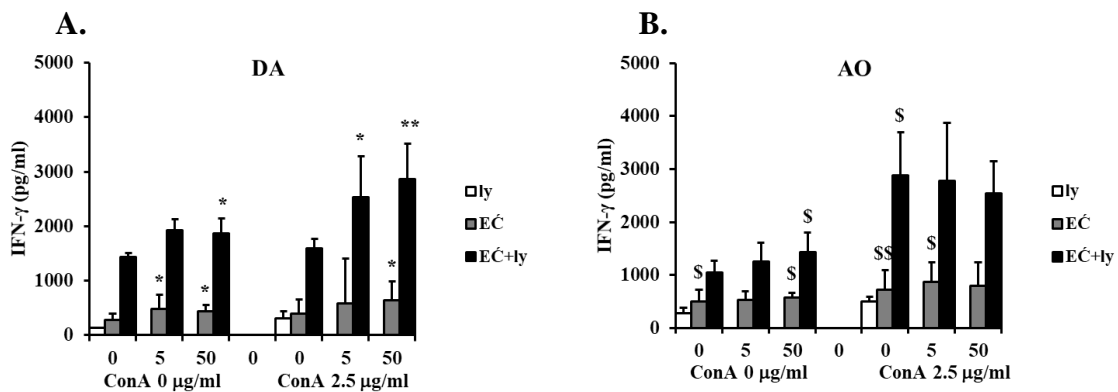
drugi, 2019), dok IL-6 promoviše proliferaciju T ćelija (Li i drugi, 2018) i učestvuje u diferencijaciji T<sub>H</sub>17 ćelija (Bettelli i drugi, 2006; Mangan i drugi, 2006; Veldhoen i drugi, 2006; Fujimoto i drugi, 2011).

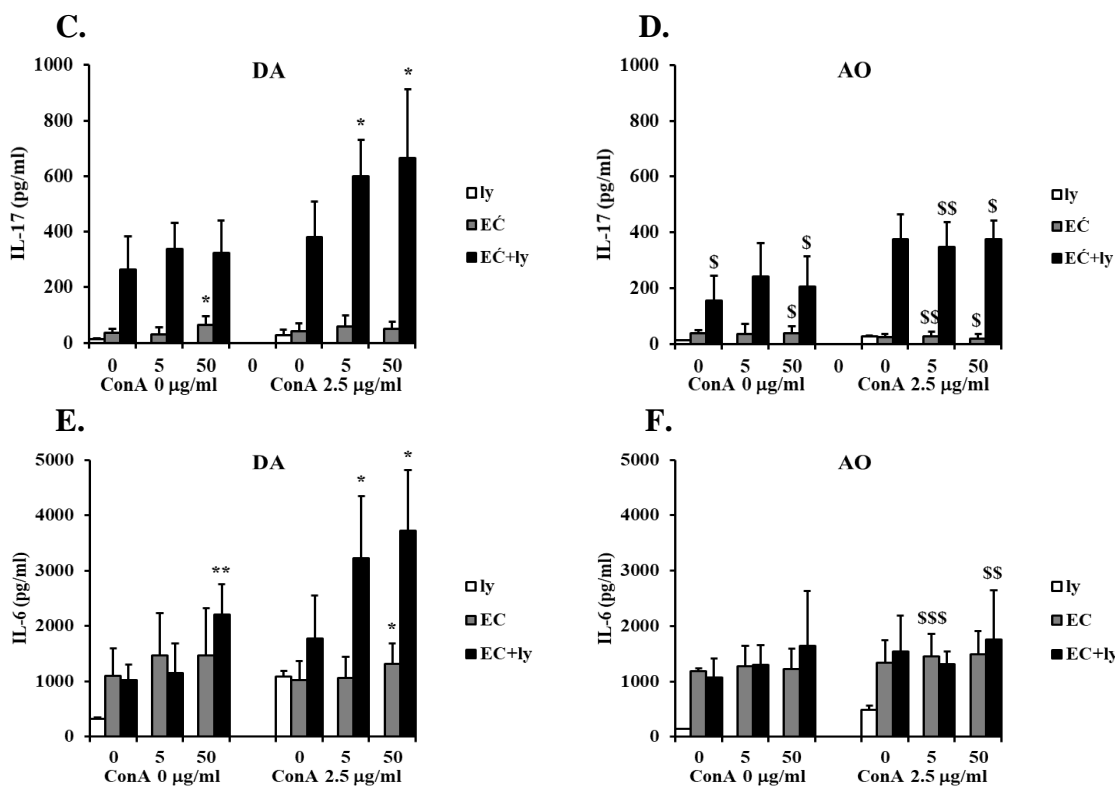
#### 4.7.9.1. Produkcija proinflammatoryh (IL-6, IFN- $\gamma$ i IL-17) citokina u kokulturi epidermalnih ćelija i naivnih limfocita

Kod DA pacova zapažena je povećana spontana produkcija IFN- $\gamma$  od strane samih EĆ nakon primene obe (5 ppm i 50 ppm) doze Cd, praćena dodatnim povećanjem ovog citokina (na 50 ppm Cd) nakon dodavanja ConA. U kokulturi EĆ i limfocita ovog soja zapažen je porast u spontanoj (50 ppm Cd) i ConA-stimulisanoj (5 ppm i 50 ppm Cd) produkciji IFN- $\gamma$  u poređenju sa kontrolama (Slika 23A), kao i u poređenju sa individualnim ćelijama (Slika 23A). Iako je generalno povećanje IFN- $\gamma$  bilo zapaženo u kokulturi EĆ i limfocita (u poređenju sa individualnim ćelijama) AO soja pacova, nisu zapažene razlike između kontrolnih i tretiranih životinja (Slika 23B).

Ispitivanje nivoa IL-17 pokazalo je da uprkos njegovoj generalno niskoj produkciji od strane EĆ oba soja, primena više doze (50 ppm) Cd povećala je spontanu produkciju ovog citokina kod DA pacova u poređenju sa kontrolama. Kao i kod IFN- $\gamma$ , u kokulturi EĆ i naivnih limfocita došlo je povećane produkcije IL-17 kod pacova ovog soja koji su pili (5 ppm i 50 ppm) Cd u poređenju sa kontrolnim ćelijama, ali samo nakon dodatne stimulacije sa ConA, a uočeno je i dodatno povećanje ovog citokina u poređenju sa individualnim ćelijama (sve grupe) (Slika 23C). Kod AO pacova došlo do generalnog povećanja ovog citokina u kokulturi EĆ i naivnih limfocita u odnosu na individualne ćelije, ali nisu uočene razlike između kontrolnih i tretiranih životinja u spontanoj produkciji, kao ni nakon stimulacije sa ConA (Slika 23D).

Analiza citokina urođene imunosti pokazala je povećanu produkciju IL-6 od strane samih EĆ DA pacova nakon stimulacije sa ConA (Slika 23E), koje je bilo praćeno povećanom spontanom (50 ppm Cd) i ConA-stimulisanom produkcijom (5 ppm i 50 ppm Cd) u kokulturi EĆ i naivnih limfocita. Poređenje nivoa IL-6 od strane samih EĆ i u kokulturi, ukazalo je na povećanu produkciju ovog citokina nakon kokultivacije EĆ i limfocita (sve grupe). Kod jedinki AO soja nisu uočene razlike između kontrolnih i Cd tretiranih EĆ u produkciji IL-6, kao ni nakon kultivacije EĆ sa naivnim limfocitima (Slika 23F). Ispitivanje sojnih razlika ukazalo je na nižu spontanu (IFN- $\gamma$  i IL-17) i produkciju stimulisanu sa ConA (IL-6) na 50 ppm Cd u kokulturi EĆ i limfocita AO soja, u poređenju sa DA sojem.

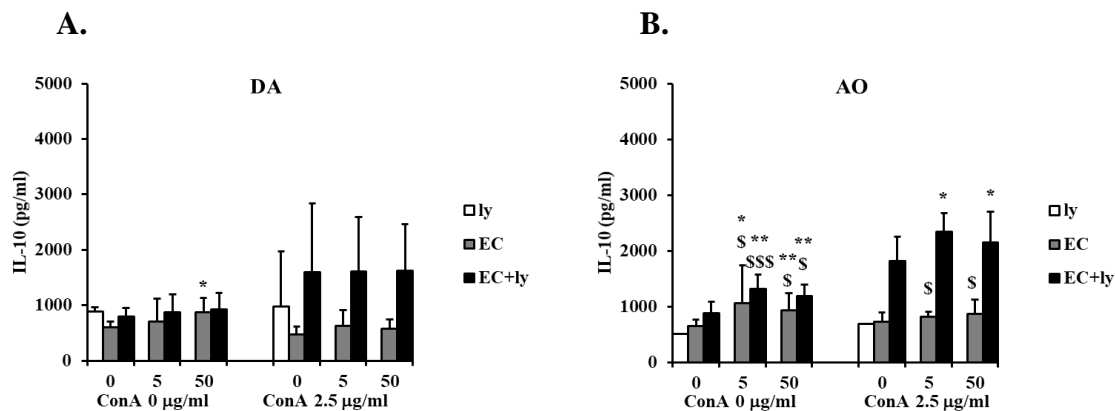




**Slika 23. Efekat kadmijuma na produkciju proinflamatornih citokina u kokulturi epidermnih ćelija i limfocita.** (A, B) IFN- $\gamma$ . (C, D) IL-17. (E, F) IL-6. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 3 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$ $P < 0.05$ , \$\$ $P < 0.01$ , \$\$\$ $P < 0.001$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.7.9.2. Produkcija antiinflamatornog citokina IL-10 u kokulturi epidermnih ćelija i limfocita

Oralni tretman Cd doveo je povećanja spontane produkcije IL-10 od strane samih EĆ (50 ppm Cd) kod jedinki DA soja. Uprkos generalno višem nivou ovog citokina u kokulturi (nakon stimulacije sa ConA) u poređenju sa individualnim ćelijama, nisu zapažene razlike u spontanoj i produkciji stimulisanoj sa ConA između kontrolnih i tretiranih grupa (Slika 24A). Sa druge strane, kod AO soja oralni unos Cd (5ppm i 50 ppm) doveo je do povećanja spontane produkcije IL-10 od strane EĆ, kao i u kokulturi EĆ i limfocita (spontana i nakon stimulacije sa ConA), u poređenju sa kontrolama (0 ppm Cd). Dodatno, kod ovog soja uočena je i generalno veća produkcija IL-10 u kokulturi u poređenju sa individualnim ćelijama, nakon stimulacije sa ConA (Slika 24B). Ispitivanje sojnih razlika ukazalo je na veći nivo IL-10 kod AO soja (5 ppm i 50 ppm Cd) u EĆ (spontana produkcija i stimulacija sa ConA) i kokulturi EĆ sa limfocitima (spontana produkcija), u poređenju sa DA sojem.



**Slika 24. Efekat kadmijuma na produkciju IL-10 u kokulturi epidermih ćelija i limfocita.** (A) Životinje DA soja (B) Životinje AO soja. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 3 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja;  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{\$\$}P < 0.01$ ,  $^{\$ \$ \$}P < 0.001$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.7.9.3. Vijabilnost ćelija u kokulturi EĆ i limfocita

Efekat Cd na metaboličku vijabilnost ćelija u kokulturi EĆ i limfocita ispitana je nakon kokultivacije (72h), kako bi videli da se ona nalazi u osnovi nepromenjene produkcije citokina kod AO pacova. MTT test nije pokazao kompromitovanu redukciju MTT kod AO pacova ( $0.28 \pm 0.07$ ,  $0.24 \pm 0.08$ ,  $0.29 \pm 0.08$  kod spontane i  $0.47 \pm 0.2$ ,  $0.46 \pm 0.2$ ,  $0.51 \pm 0.3$  kod ConA-stimulisane produkcije na 0 ppm, 5 ppm i 50 ppm, redom) kao ni promene kod DA pacova ( $0.3 \pm 0.1$ ,  $0.34 \pm 0.1$ ,  $0.29 \pm 0.1$  kod spontane i  $0.47 \pm 0.2$ ,  $0.46 \pm 0.3$ ,  $0.51 \pm 0.3$  kod ConA-stimulacije).

## 4.8. Efekat oralnog unosa kadmijuma na ćelije derma

### 4.8.1. Vijabilnost ćelija derma

Tretman Cd nije doveo do promena u procentualnoj zastupljenosti vijabilnih ćelija derma kao ni metaboličkoj vijabilnosti ovih ćelija, merenoj MTT testom odmah nakon njihove izolacije (0h), kod tretiranih u poređenju sa kontrolnim životinjama (oba soja pacova) (Tabela 7).

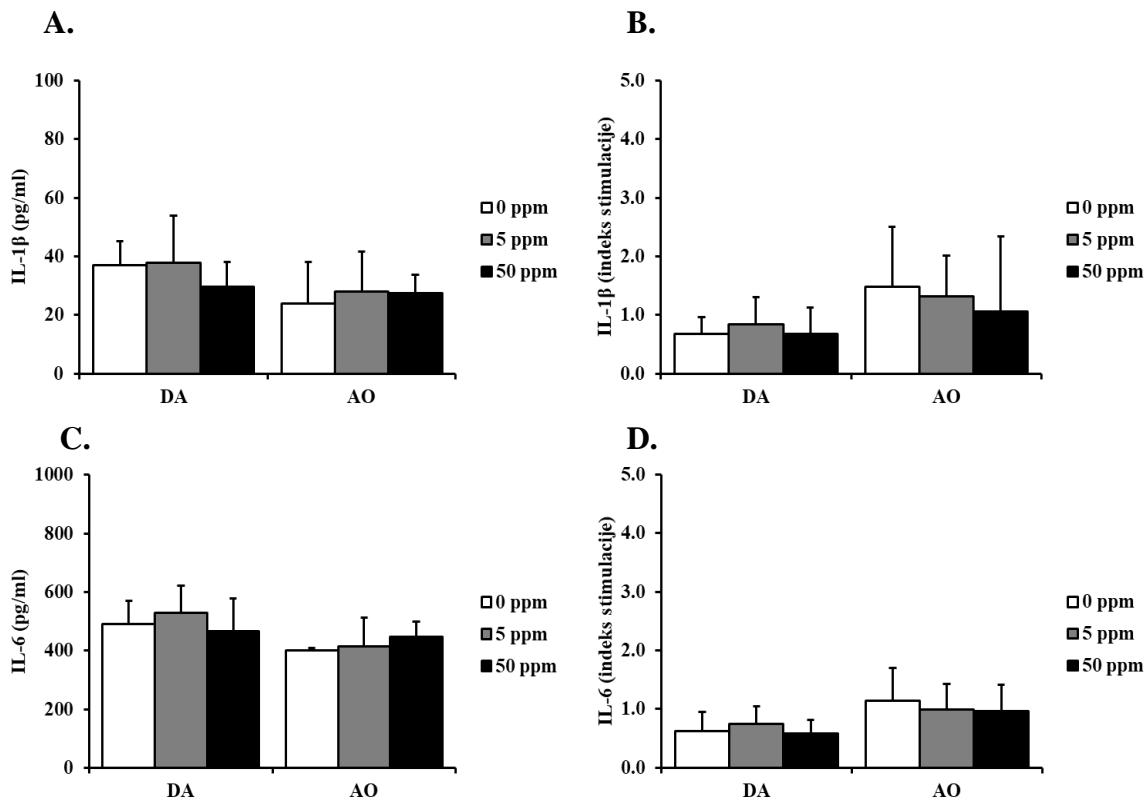
Tabela 7. Vijabilnost ćelija derma

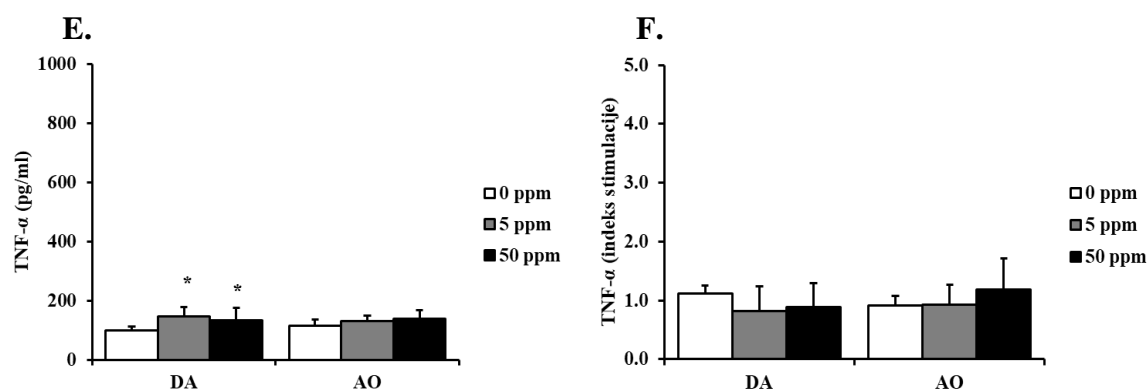
	DA Doza Cd (ppm)			AO Doza Cd (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
vijabilnost (%)	65.3±9.0	63.1±9.8	66.3±3.4	68.3±4.1	69.6±9.1	67.67±2.1
MTT (0h) (A540 nm)	0.11±0.02	0.12±0.02	0.13±0.02	0.09±0.01	0.10±0.01	0.107±0.02

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± S.D.

#### 4.8.2. Produkcija proinflammatoryh (IL-1β, IL-6, TNF-α) citokina

Analiza citokina produkovanih od strane ćelija derma (Slika 24) pokazala je povećanje nivoa spontane produkcije TNF-α (Slika 25E) samo kod DA pacova, nakon primene obe (5 ppm i 50 ppm) Cd, dok su nivoi IL-1β (Slika 25A) i IL-6 (Slika 25C) ostali nepromenjeni kod oba soja pacova. Indeks stimulacije (LPS/spontana produkcija) nije ukazao na razlike u produkciji ovih citokina između kontrolnih i tretiranih životinja (Slika 25B, D, F).

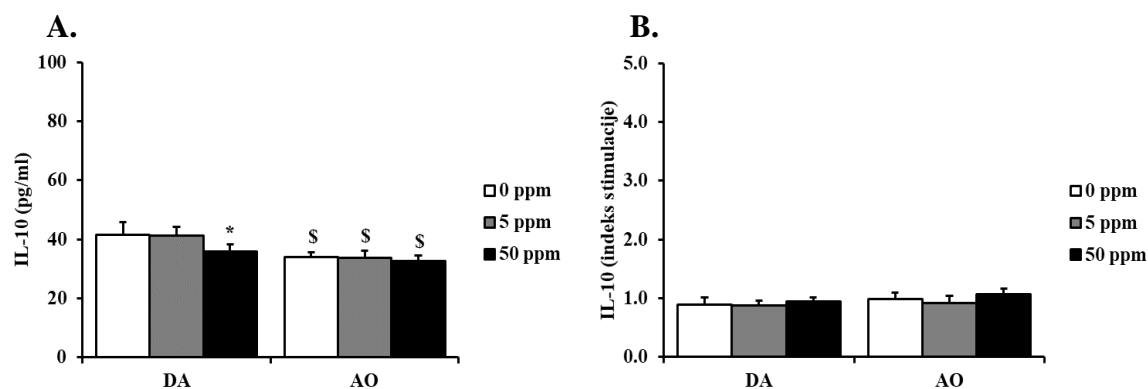




**Slika 25. Efekat kadmijuma na produkciju proinflamatornih citokina od strane ćelija derma.** (A, B) Spontana produkcija i indeks stimulacije za IL-1 $\beta$ , (C, D) IL-6 i (E, F) TNF. Indeks stimulacije predstavlja odnos LPS-stimulisane produkcije i spontane produkcije (LPS/spontana produkcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja;  $^{\S}P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.8.3. Produkcija antiinflamatornog citokina IL-10

Ispitivanje produkcije IL-10 od strane ćelija derma pokazalo je da oralni tretman višom (50 ppm) dozom Cd dovodi do smanjenja ovog antiinflamatornog citokina kod DA pacova. Iako kod AO pacova nisu uočene razlike u produkciji između kontrola i tretiranih životinja, zapažen je generalno manji nivo (čak i kod kontrole) IL-10 kod ovog soja u poređenju sa DA pacovima (Slika 26A). Indeks stimulacije (LPS/spontana produkcija) nije ukazao na razlike u produkciji ovog citokina (Slika 26B).



**Slika 26. Efekat kadmijuma na produkciju IL-10 od strane ćelija derma kože.** (A) Spontana produkcija IL-10. (B) Indeks stimulacije za IL-10. Indeks stimulacije predstavlja odnos LPS-stimulisane produkcije i spontane produkcije (LPS/spontana produkcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 3 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja;  $^{\S}P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.8.4. Vijabilnost ćelija derma u kulturi

Ispitivanje efekta Cd na metaboličku vijabilnost ćelija u kulturi EĆ nakon kultivacije (48h), nije ukazao na kompromitovanu redukciju MTT kod DA pacova ( $0.20\pm 0.03$ ,  $0.22\pm 0.04$ ,  $0.18\pm 0.04$  kod spontane produkcije i  $0.17\pm 0.05$ ,  $0.22\pm 0.04$ ,  $0.19\pm 0.04$  kod stimulacije LPS-om) na 0 ppm, 5 ppm i 50 ppm, redom) i AO pacova ( $0.11\pm 0.01$ ,  $0.13\pm 0.2$ ,  $0.12\pm 0.01$  kod spontane i  $0.14\pm 0.01$ ,  $0.14\pm 0.01$ ,  $0.13\pm 0.02$  stimulacije LPS-om).

#### 4.9. Efekat oralnog unosa kadmijuma na drenirajuće limfne čvorove (supraskapularne i aksilarne) kože

Pored efekta Cd na kožu, ispitan je i uticaj ovog metala na aktivnost ćelija koji dreniraju dorzalnu površinu kože, saLČ. Nisu primećene razlike u celularnosti, procentualnoj zastupljenosti vijabilnih ćelija, kao ni metaboličkoj vijabilnosti ćelija između kontrolnih i tretiranih životinja kod oba soja pacova. Analiza produkcije citokina od strane ćelija ovog tkiva DA i AO pacova pokazala je nepromenjene nivoe spontane i ConA-stimulisane produkcije IFN- $\gamma$  i IL-17 na 5 ppm i 50 ppm Cd u poređenju sa kontrolama. Kako bi proverili da li je ovakav nepromenjeni citokinski odgovor ćelija saLČ posledica pada njihove vijabilnosti, ispitana je vijabilnost ćelija MTT testom 48h sati nakon postavljanja kulture. Dobijeni rezultati nisu ukazali na promenu u vijabilnosti ćelija (Tabela 8).

Tabela 8. Parametri aktivnosti ćelija supraskapularnih i aksilarnih limfnih čvorova

Parametri	AO Doza kadmijuma (ppm)			DA Doza kadmijuma (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
<b>celularnost</b> ( $1\times 10^6$ ćelija)	28.1 $\pm$ 10.2	19.7 $\pm$ 7.0	30.3 $\pm$ 8.2	32.8 $\pm$ 11.2	28.6 $\pm$ 10.8	34.8 $\pm$ 5.5
<b>vijabilnost (%)</b>	93.5 $\pm$ 1.8	92.6 $\pm$ 1.6	95.1 $\pm$ 1.6	93.4 $\pm$ 2.4	93.4 $\pm$ 1.0	93.7 $\pm$ 1.6
<b>MTT 0h</b> (A540 nm)	0.12 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.03
<b>IL-17 (pg/ml)</b>						
ConA 0 $\mu$ g/ml	425 $\pm$ 233	352 $\pm$ 126	452 $\pm$ 173	303 $\pm$ 154	278 $\pm$ 70	236 $\pm$ 28
ConA 1 $\mu$ g/ml	1474 $\pm$ 357	1559 $\pm$ 326	1448 $\pm$ 432	1609 $\pm$ 218	1788 $\pm$ 221	1476 $\pm$ 461
<b>IFN-<math>\gamma</math> (pg/ml)</b>						
ConA 0 $\mu$ g/ml	374 $\pm$ 64	311 $\pm$ 24	369 $\pm$ 54	347 $\pm$ 78	347 $\pm$ 33	319 $\pm$ 37
ConA 1 $\mu$ g/ml	2037 $\pm$ 163	2122 $\pm$ 125	2171 $\pm$ 138	1849 $\pm$ 406	1898 $\pm$ 167	2104 $\pm$ 129
<b>MTT 48h</b> (A540 nm)						
ConA 0 $\mu$ g/ml	0.36 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.09	0.43 $\pm$ 0.10	0.046 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.04
ConA 1 $\mu$ g/ml	0.92 $\pm$ 0.12	0.86 $\pm$ 0.04	0.89 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.18	0.75 $\pm$ 0.21	0.90 $\pm$ 0.08

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D.

#### 4.10. Ispitivanje efekta kadmijuma na imunsku reaktivnost kože nakon nanošenja haptena (DNCB) u reakciji kontaktne preosetljivosti

Kako bi dodatno analizirali uticaj Cd na imunsku reaktivnost kože, životinje koje su pile Cd (ali i kontrolnih) senzibilisane su topikalnim nanošenjem eksperimentalnog haptena DNCB-a, i ispitan je odgovor EĆ i ćelija dLČ. Naime, nakon oralnog tretmana Cd (30 dana) svim životinjama (uključujući i kontrole koje su pile dejH<sub>2</sub>O bez Cd) je topikalno nanošen 0.4% DNCB rastvoren u smeši acetona i maslinovog ulja dva dana zaredom, izazivajući na taj način senzibilizaciju životinja (Popov i drugi, 2011). Takođe, ispitan je efekat oralnog Cd i na ekspresiju reakcije kontaktne preosetljivosti (faza elicitacije) gde je životinjama pet dana nakon senzibilizacije nanošena tri puta manja koncentracija DNCB-a (0.13%) na površinu uva (desno). Eksperimentalne grupe životinja prikazane su u tabeli ispod (Tabela 9).

Tabela 9. Doze kadmijuma i DNCB-a korišćene u fazi senzibilizacije i elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti

Doza Cd	Doza DNCB-a (senzibilizacija)	Doza DNCB-a (elicitacija)	Grupa DNCB/Cd (senzibilizacija)	Grupa DNCB/Cd (elicitacija)
0 ppm	0.4%	0.13%	0.4 % DNCB +0ppm Cd	0.4/0.13 % DNCB +0ppm Cd
5 ppm	0.4%	0.13%	0.4 % DNCB +5ppm Cd	0.4/0.13 % DNCB +5ppm Cd
50 ppm	0.4%	0.13%	0.4 % DNCB +50ppm Cd	0.4/0.13 % DNCB +50ppm Cd

##### 4.10.1. Ispitivanje efekta kadmijuma na aktivnost epidermnih ćelija u fazi senzibilizacije reakcije kontaktne preosetljivosti

###### 4.10.1.1. Vijabilnost epidermnih ćelija

Tretman Cd nije doveo do promena u procentualnoj zastupljenosti vijabilnih ćelija epiderma, dok je viša doza Cd (50 ppm) povećala metaboličku vijabilnost ovih ćelija, merenoj MTT testom odmah nakon njihove izolacije (0h), kod tretiranih u poređenju sa kontrolnim životinjama (oba soja pacova) (Tabela 10).



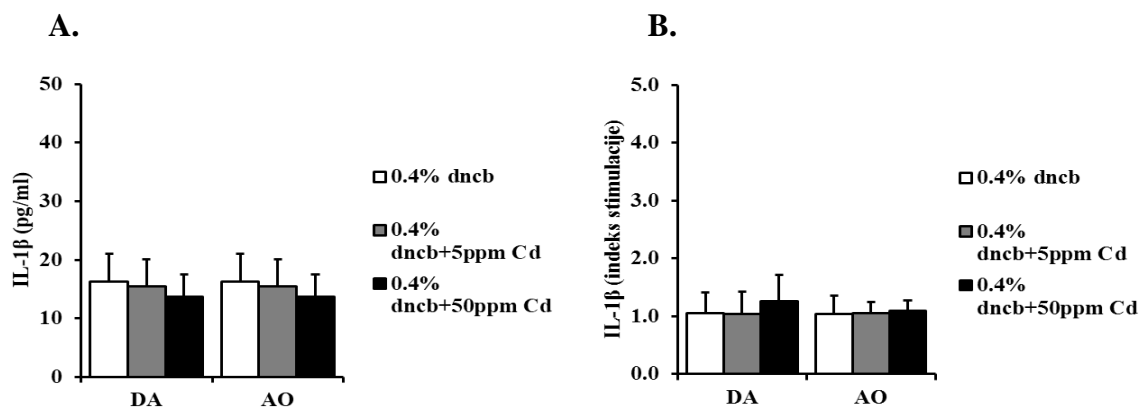
Tabela 10. Vijabilnost epidermnih ćelija

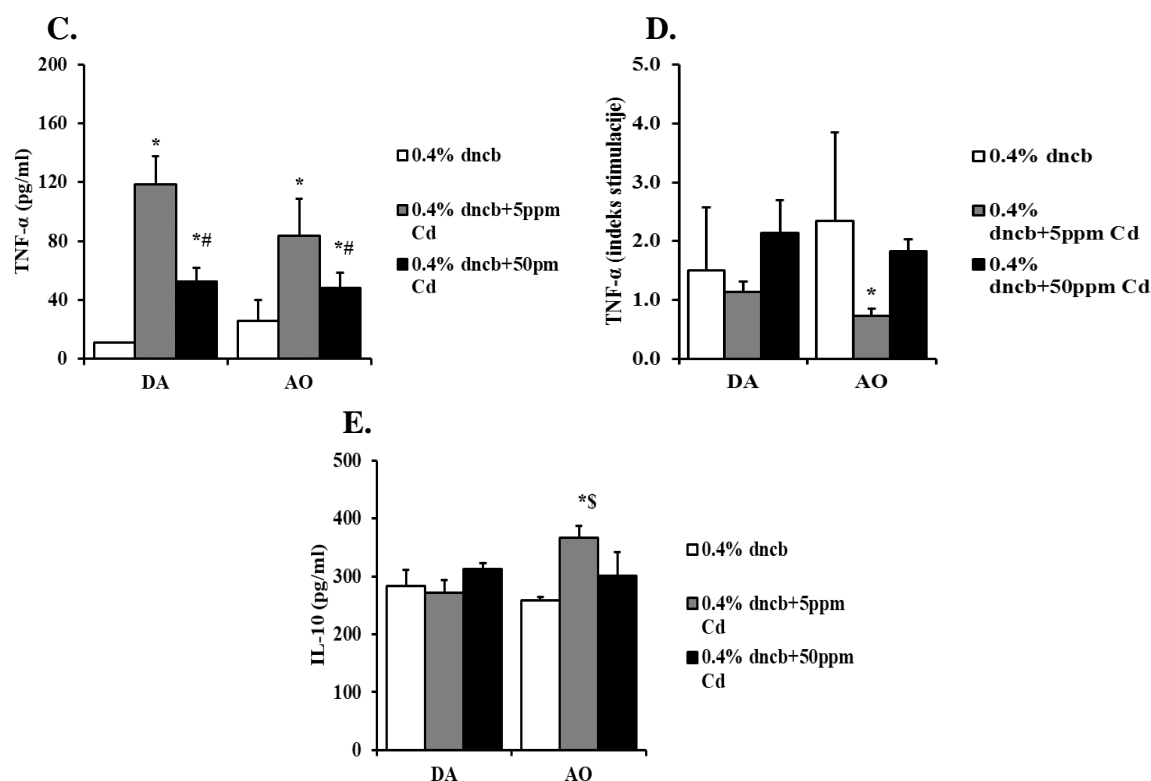
	DA			AO		
	0.4% DNCB +0ppm Cd	0.4% DNCB +5ppm Cd	0.4% DNCB +50ppm Cd	0.4% DNCB +0ppm Cd	0.4% DNCB +5ppm Cd	0.4% DNCB +50ppm Cd
<b>vijabilnost (%)</b>	72.8±8.8	78.1±2.2	79.7±2.5	79.4±4.5	80.1±8.5	80.7±6.8
<b>MTT (0h) (A540 nm)</b>	0.048±0.02	0.07±0.03	0.11±0.02**	0.06±0.04	0.08±0.05	0.14±0.05*

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.10.1.2. Ispitivanje citokinskog odgovora epidermnih ćelija 24h nakon senzibilizacije

Dvadeset četiri časa nakon senzibilizacije ispitan je efekat Cd na produkciju citokina urođene imunosti od strane EĆ kože. Kod oba soja pacova zapažena je nepromenjena spontana produkcija IL-1 $\beta$  (Slika 27A), a povećana produkcija TNF- $\alpha$  (Slika 27C) od strane EĆ. Povećana produkcija (spontana) TNF- $\alpha$  primećena je nakon primene obe doze Cd (0.4% DNCB+5ppm Cd i 0.4% DNCB+50ppm Cd) u poređenju sa senzibilisanim životinjama koje nisu pile Cd (0.4% DNCB+0ppm Cd grupom) kod DA i AO pacova, pri čemu je veća produkcija zapažena na 5 ppm (0.4% DNCB+5ppm Cd) u poređenju sa 50 ppm (0.4% DNCB+50ppm Cd) Cd. Analiza indeksa stimulacije (LPS/spontana produkcija) nije ukazala na promenu nivoa IL-1 $\beta$  (Slika 27B) i TNF (Slika 27D) nakon dodavanja LPS-a kod oba soja pacova, čak je uočeno smanjenje TNF- $\alpha$  kod AO pacova na 5 ppm (0.4% DNCB+5ppm Cd) Cd. Povećana produkcija antiinflamatornog citokina IL-10 (0.4 DNCB+5ppm Cd), zapažena je samo kod jedinki AO soja, i bila je viša u poređenju sa DA sojem (Slika 27E).





**Slika 27. Efekat kadmijuma na produkciju citokina urođene imunosti od strane epidermih ćelija kože 24h nakon nanošenja DNCB-a u fazi senzibilizacije.** (A, B) Spontana produkcija i indeks stimulacije za IL-1 $\beta$ , (C, D) TNF- $\alpha$  i (E) IL-10. Indeks stimulacije predstavlja odnos LPS-stimulisane produkcije i spontane produkcije (LPS/spontana produkcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 3 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; # $P < 0.05$  u odnosu na 5 ppm odgovarajućeg soja; § $P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.10.1.3. Vijabilnost epidermih ćelija u kulturi

Ispitivanje efekta Cd na metaboličku vijabilnost epidermih ćelija u kulturi nakon kultivacije (48h), nije ukazao na kompromitovanu redukciju MTT kod DA ( $0.28 \pm 0.07$ ,  $0.24 \pm 0.08$ ,  $0.29 \pm 0.08$  kod spontane produkcije i  $0.47 \pm 0.2$ ,  $0.46 \pm 0.2$ ,  $0.51 \pm 0.3$  nakon stimulacije LPS-om) na 0.4% DNCB+0ppm Cd, 0.4% DNCB+5ppm Cd i 0.4% DNCB+50 ppm Cd, redom) kao ni kod AO ( $0.3 \pm 0.1$ ,  $0.34 \pm 0.1$ ,  $0.29 \pm 0.1$  kod spontane produkcije i  $0.47 \pm 0.2$ ,  $0.46 \pm 0.3$ ,  $0.51 \pm 0.3$  stimulacije LPS-om) pacova.

#### 4.10.2. Ispitivanje efekta kadmijuma na aktivnost ćelija drenirajućih limfnih čvorova (saLČ) kože u fazi senzibilizacije

Dalje je ispitan efekat Cd na aktivnost ćelija LČ koji dreniraju dorzalnu površinu kože (saLČ), jer je pokazano da topikalno nanošenje DNCB-a (0.4%) na kožu pacova dovodi do povećane produkcije IFN- $\gamma$  24h i 72h nakon senzibilizacije, kao i IL-17 nakon 72h, u ovom tkivu (Popov i drugi, 2011), bitnih za aktivaciju haptent-specifičnih T ćelija (Kish i drugi, 2009).

##### 4.10.2.1. Celularnost i vijabilnost ćelija saLČ

Tretman Cd (obe doze) 24h nakon senzibilizacije nije doveo do povećanja celularnosti, kao ni u procentualnoj zastupljenosti vijabilnih ćelija saLČ kao ni metaboličkoj vijabilnosti ovih ćelija, 24h i 72h nakon senzibilizacije, merenoj MTT testom odmah nakon njihove izolacije (0h), kod tretiranih u poređenju sa kontrolnim životinjama (oba soja pacova) (Tabela 11).

**Tabela 11. Celularnost i vijabilnost ćelija saLČ**

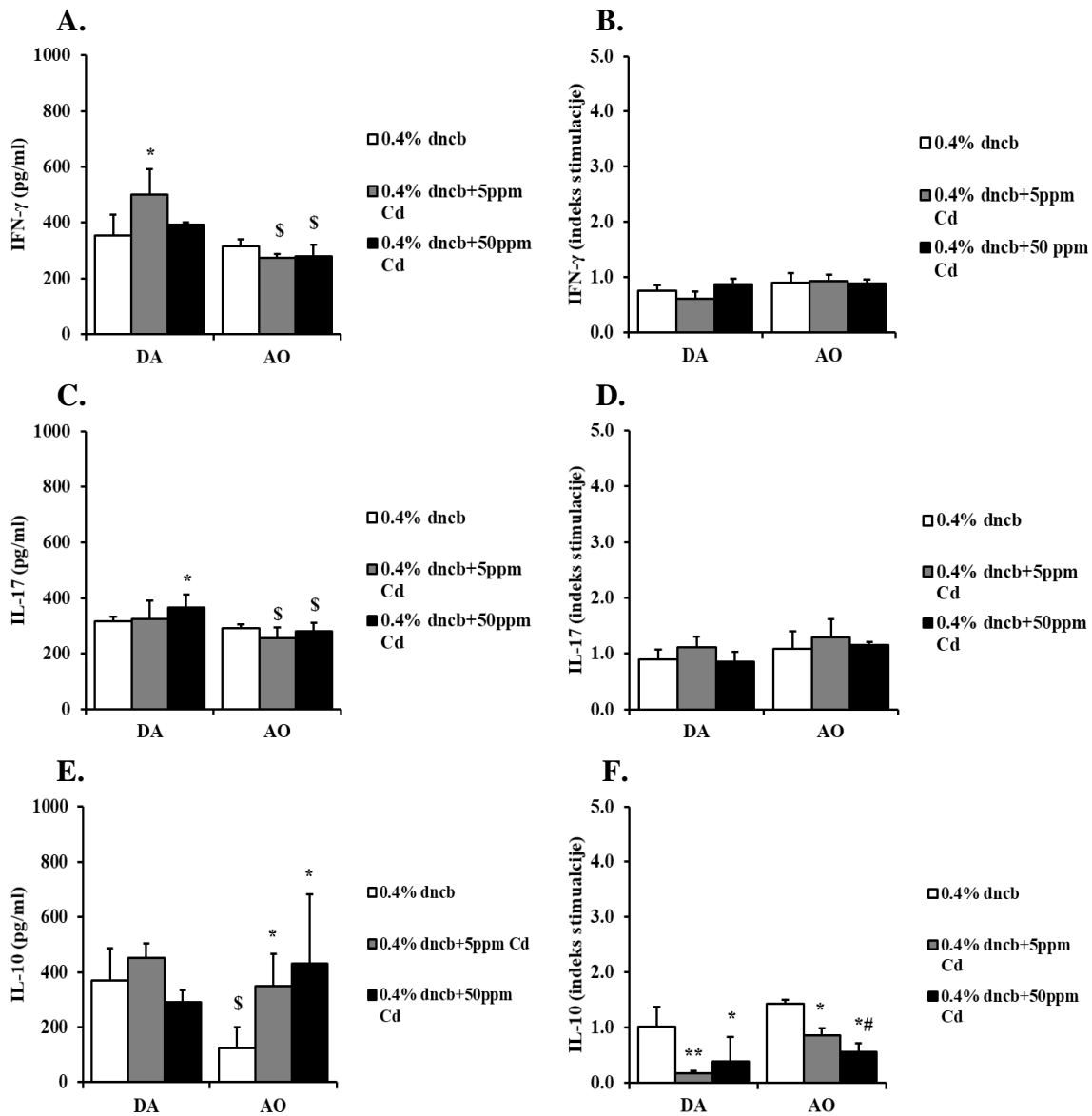
	DA			AO		
	0.4% DNCB +0ppm Cd	0.4% DNCB +5ppm Cd	0.4% DNCB +50ppm Cd	0.4% DNCB +0ppm Cd	0.4% DNCB +5ppm Cd	0.4% DNCB +50ppm Cd
<b>24h nakon senzibilizacije</b>						
celularnost ( $1 \times 10^6$ ćelija)	99.7 $\pm$ 26.3	101.2 $\pm$ 14.1	110.3 $\pm$ 47.7	42.9 $\pm$ 22.4	38.9 $\pm$ 12.2 <sup>s</sup>	31.9 $\pm$ 12.0 <sup>s</sup>
vijabilnost (%) MTT (0h) (A540 nm)	91.6 $\pm$ 2.6	93.6 $\pm$ 2.3	92.6 $\pm$ 2.1	89.5 $\pm$ 3.1	90.6 $\pm$ 0.9	90.7 $\pm$ 0.6
	0.01 $\pm$ 0.006	0.01 $\pm$ 0.004	0.01 $\pm$ 0.007	0.01 $\pm$ 0.007	0.01 $\pm$ 0.004	0.01 $\pm$ 0.005
<b>72h nakon senzibilizacije</b>						
celularnost ( $1 \times 10^6$ ćelija)	176.9 $\pm$ 22.0	150.3 $\pm$ 56.8	197.5 $\pm$ 35.0	63.4 $\pm$ 17.4 <sup>s</sup>	55.7 $\pm$ 16.4 <sup>s</sup>	69.2 $\pm$ 12.8 <sup>s</sup>
vijabilnost (%) MTT (0h) (A540 nm)	86.9 $\pm$ 2.7	88.1 $\pm$ 5.1	90.1 $\pm$ 1.9	83.9 $\pm$ 2.3	81.6 $\pm$ 3.0	86.3 $\pm$ 5.1
	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.005	0.06 $\pm$ 0.001	0.06 $\pm$ 0.007	0.07 $\pm$ 0.009	0.06 $\pm$ 0.007

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D.

##### 4.10.2.2 Ispitivanje citokinskog odgovora ćelija saLČ 24h nakon faze senzibilizacije

Analiza aktivnosti ćelija saLČ ukazala je na povećanu produkciju citokina IFN- $\gamma$  i IL-17, nakon oralnog unosa Cd samo kod DA soja (Slika 28), IFN- $\gamma$  (Slika 28A) nakon primene 5 ppm (0.4% DNCB+5ppm Cd) i IL-17 (Slika 28C) nakon primene 50 ppm (0.4% DNCB+50ppm Cd) Cd, dok je njihov nivo ostao nepromenjen kod AO pacova (i niži u odnosu na DA), uz povećanje IL-10 (0.4% DNCB+5ppm i 50ppm Cd) (Slika 28E), u odnosu na senzibilisane kontrole. Specifičan odgovor ćelija saLČ ispitan je nakon dodavanja DNBS-a, vodosolubilne forme DNCB-a, u kulturu ovih ćelija

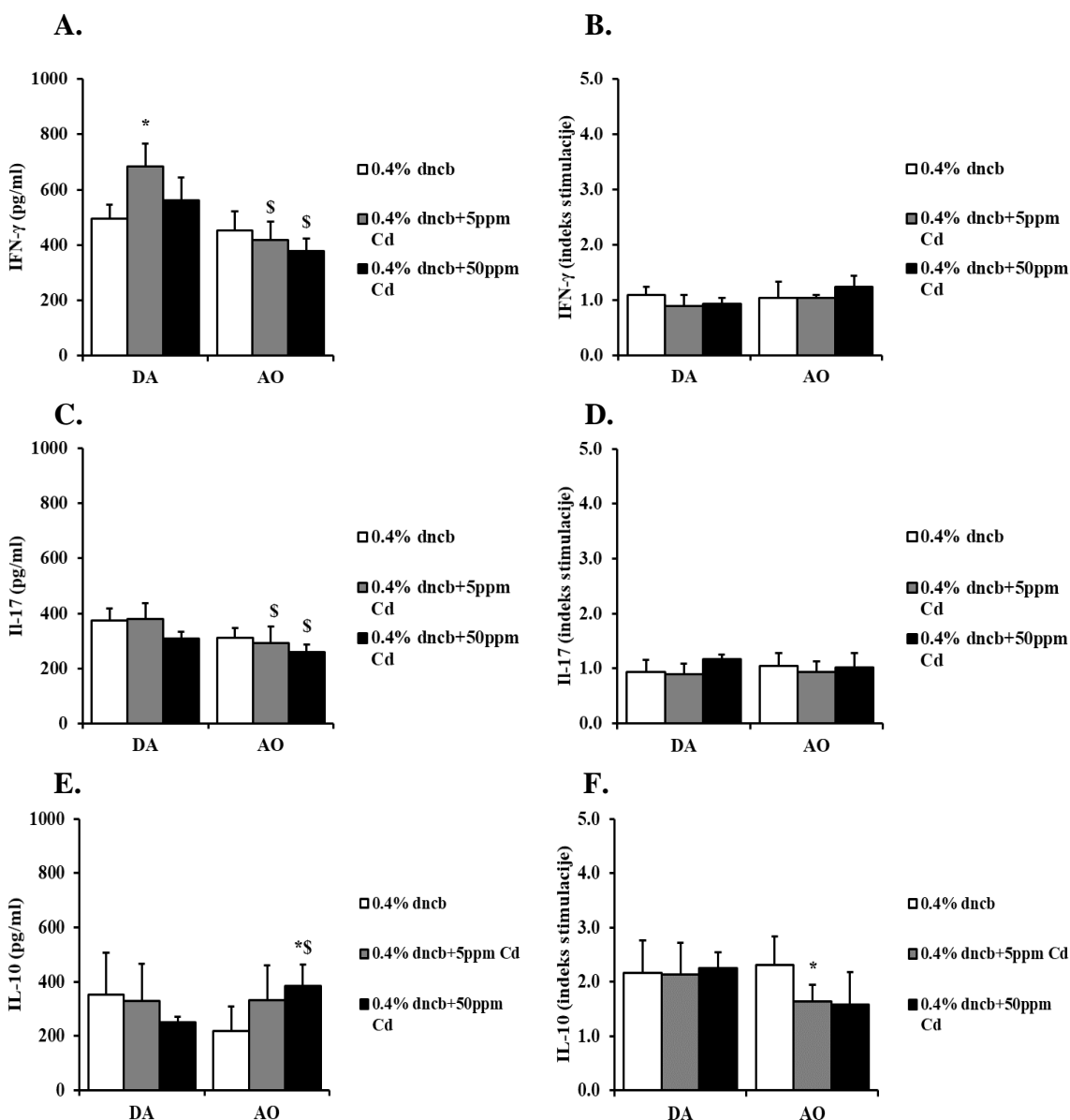
analizom indeksa stimulacije (DNBS/spontana produkcija). Indeksi stimulacije nisu ukazali na promenu nivoa IFN- $\gamma$  (Slika 28B) i IL-17 (Slika 28D), dok je IL-10 bio snižen (Slika 30F) kod oba soja pacova.



**Slika 28. Efekat kadmijuma na produkciju citokina od strane ćelija saLČ 24h nakon nanošenja DNCB-a u fazi senzibilizacije.** (A, B) Spontana produkcija i indeks stimulacije za IFN- $\gamma$ , (C, D) L-17 i (E, F) IL-10. Indeks stimulacije predstavlja odnos DNBS-stimulisane produkcije i spontane produkcije (DNBS/spontana produkcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 3 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>#</sup> $P < 0.05$  u odnosu na 50 ppm odgovarajućeg soja; <sup>S</sup> $P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

### 4.10.2.3 Ispitivanje citokinskog odgovora ćelija saLČ 72h nakon faze senzibilizacije

U cilju ispitivanja potencijalno odložene aktivnosti ćelija saLČ kod AO soja pacova nakon unosa Cd, analizirali smo produkciju citokina od strane ovih ćelija i 72h nakon nanošenja DNCB-a. Međutim, ni 72h nakon senzibilizacije nije zapažena promena u spontanjoj (Slika 29B) produkciji IFN- $\gamma$  i IL-17 kod jedinki AO soja (koja je bila manja u odnosu na DA soj) uz povećanje IL-10 (Slika 29E) kod senzibilisanih životinja koje su pile Cd (0.4% DNCB+ 5ppm i 50 ppm Cd, na 5 ppm  $P=0.09$ ) u odnosu na kontrolne životinje (samo senzibilisane). Sa druge strane, kod DA pacova zapažena je samo povećana spontana produkcija IFN- $\gamma$  (veća u odnosu na AO soj) na 5 ppm (0.4% DNCB+5ppm Cd) Cd (Slika 29A). Analiza hapten-specifične produkcije (izražene preko indeksa stimulacije) nije pokazala promenu nivoa IFN- $\gamma$  (Slika 29B) i IL-17 (Slika 29D) kod oba soja pacova, dok je nivo IL-10 bio snižen kod AO soja nakon obe doze Cd (na 0.4% DNCB+50ppm Cd,  $P=0.08$ ).



**Slika 29. Efekat kadmijuma na produkciju citokina od strane ćelija saLČ 72h nakon nanošenja DNCB-a u fazi senzibilizacije.** (A, B) Spontana produkcija i indeks stimulacije za IFN- $\gamma$ , (C, D) IL-17 i (E, F) IL-10. Indeks stimulacije predstavlja odnos DNBS-stimulisane produkcije i spontane produkcije (DNBS/spontana produkcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 3 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja;  $^{\$}P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.10.2.4. Vijabilnost ćelija saLČ u kulturi

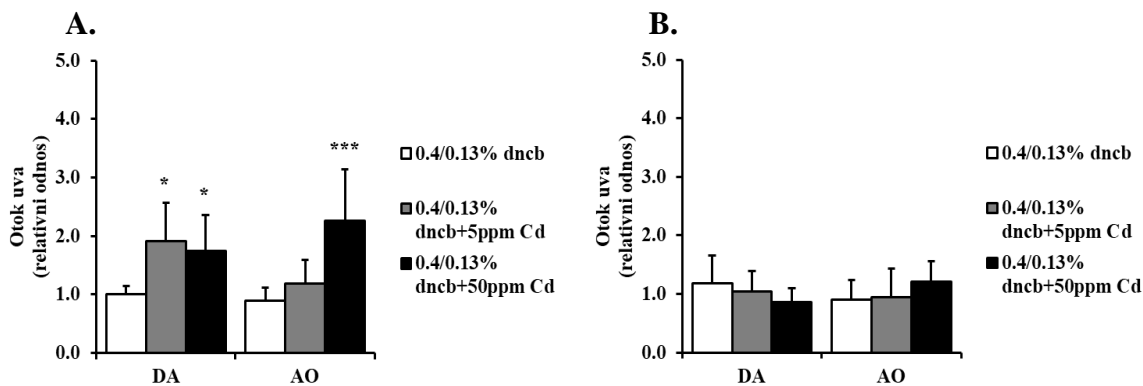
Ispitivanje efekta Cd na metaboličku vijabilnost ćelija saLČ u kulturi nakon kultivacije (48h), nije ukazao na kompromitovanu redukciju MTT 24h (DA pacovi,  $0.28 \pm 0.07$ ,  $0.24 \pm 0.08$ ,  $0.29 \pm 0.08$  kod spontane produkcije i  $0.47 \pm 0.2$ ,  $0.46 \pm 0.2$ ,  $0.51 \pm 0.3$  kod stimulacije DNBS-om na 0.4% DNCB+0ppm Cd, 0.4% DNCB+5ppm Cd i 0.4% DNCB+50 ppm Cd, redom, i AO pacovi  $0.3 \pm 0.1$ ,  $0.34 \pm 0.1$ ,  $0.29 \pm 0.1$  i  $0.47 \pm 0.2$ ,  $0.46 \pm 0.3$ ,  $0.51 \pm 0.3$ ), kao ni 72h (DA pacovi  $0.28 \pm 0.07$ ,  $0.24 \pm 0.08$ ,  $0.29 \pm 0.08$  kod spontane produkcije i  $0.47 \pm 0.2$ ,  $0.46 \pm 0.2$ ,  $0.51 \pm 0.3$  kod stimulacije DNBS-om, i AO pacovi  $0.3 \pm 0.1$ ,  $0.34 \pm 0.1$ ,  $0.29 \pm 0.1$  i  $0.47 \pm 0.2$ ,  $0.46 \pm 0.3$ ,  $0.51 \pm 0.3$ ) nakon senzibilizacije.

#### 4.10.3. Ispitivanje efekta kadmijuma na aktivnost ćelija uva u fazi ekspresije reakcije kontaktne preosetljivosti

Efekat Cd na aktivnost ćelija uva i aLČ u fazi elicitanje reakcije kontaktne preosetljivosti, ispitan je 24h nakon nanošenja 0.13% DNCB-a na uvo (desno), jer je u ovom terminu pokazan maksimalni nivo reakcije kontaktne preosetljivosti (KP) (Cho i Hough, 1986; Ferguson i drugi, 1994).

##### 4.10.3.1. Ispitivanje otoka uva

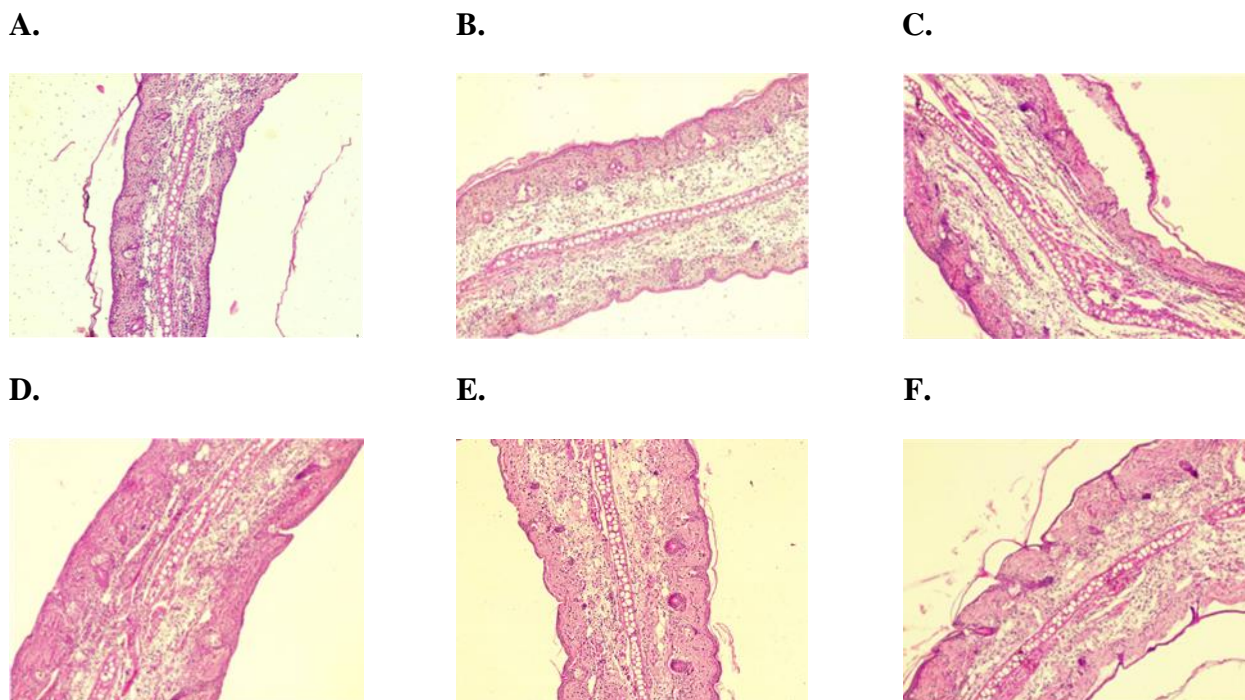
U cilju kvantifikacije edema uva, koji nastaje usled infiltracije imunskih ćelija u ovo tkivo i ispoljavanja njihovih efektorski aktivnosti, a koji se koristi kao mera ekspresije reakcije KP, analizirana je razlika u debljini uva nakon i pre elicitanje (24h-0h) kod životinja oba soja, i izražena kao relativni odnos (u odnosu na kontrolu). Povećan otok zapažen je u desnom uhu (na koje je nanošen 0.13% DNCB) na obe doze (0.4/0.13% DNCB+5ppm i 0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) Cd kod DA, a samo nakon primene više doze (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) kod AO pacova (Slika 31A), bez razlika u nivou otoka između sojeva. Nije zapažen otok levog uva na koje je nanošen rastvor acetona i maslinovog ulja kod oba soja pacova (Slika 30B).



**Slika 30. Efekat kadmijuma na otok uva u fazi elicitacije.** (A) Desno uvo. (B) Levo uvo. Otok uva predstavljen je kao razlika u debljini uva izmerena 24 časa nakon elicitacije reakcije i pre elicitacije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 2 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.10.3.2. Histološka analiza tkiva uva

Histopatološka analiza tkiva uva u fazi ekspresije reakcije KP ukazala je na povećani edem ovog tkiva nakon oralnog unosa obe doze (0.4/0.13% DNCB+5ppm i 50ppm Cd) kod jedinki DA soja, a samo nakon primene više doze (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) Cd kod AO soja, u poređenju sa kontrolnim životinjama (0.4/0.13% DNCB+0ppm Cd). Iako su nekrotične promene epiderma i infiltracija imunskih ćelija prisutni i kod kontrola, nakon oralnog unosa Cd ove promene bile su većeg intenziteta, Naime, kod DA soja (nakon obe doze Cd) zapaža se masivan edem, praćen nekrozom tkiva i infiltracijom mononuklearnih ćelija, i u manjoj meri neutrofila (Slika 33A, B, C), dok se nakon primene više doze Cd kod jedinki AO soja uočavaju odvajanje nekrotičnog epiderma (sa obe strane), nekroza subkutisa i folikula, takođe praćeno prisutvov mononuklearnih ćelija i neutrofila (Slika 33D, E, F).



**Slika 33. Histološka analiza uva (H&E bojenje) nakon unosa kadmijuma u fazi ekspresije reakcije kontaktne preosetljivosti.** DA (gore), uveličanje  $\times 10$ ; (A, B, C) Epiderm i derm kože DA pacova na 0.4/0.13% DNCB+0 ppm Cd, 0.4/0.13% DNCB+5 ppm Cd i 0.4/0.13% DNCB+50 ppm Cd, redom i (D, E, F) AO pacova.

#### 4.10.3.3. Vijabilnost ćelija uva

Tretman Cd nije doveo do promena u procentualnoj zastupljenosti vijabilnih ćelija uva kao ni u metaboličkoj vijabilnosti ovih ćelija, merenoj MTT testom odmah nakon njihove izolacije (0h), kod tretiranih u poređenju sa kontrolnim životinjama (oba soja pacova) (Tabela 12).

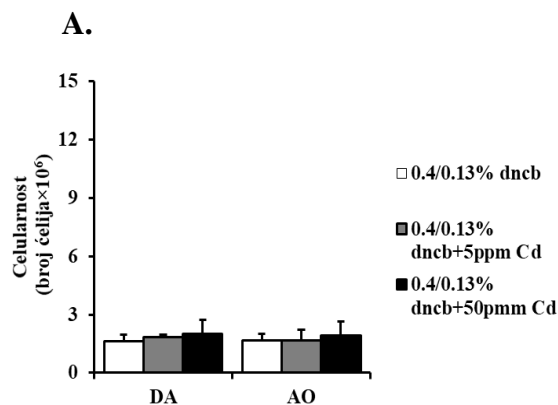
**Tabela 12. Vijabilnost ćelija uva**

	DA			AO		
	0.4/0.13% DNCB +0ppm Cd	0.4/0.13% DNCB +5ppm Cd	0.4/0.13% DNCB +50ppm Cd	0.4/0.13% DNCB +0ppm Cd	0.4/0.13% DNCB +5ppm Cd	0.4/0.13% DNCB +50ppm Cd
<b>vijabilnost (%)</b>	66.7 $\pm$ 3.3	69.7 $\pm$ 4.4	75.7 $\pm$ 7.8	59.2 $\pm$ 5.0	61.8 $\pm$ 4.5	64.0 $\pm$ 7.1
<b>MTT (0h) (A540 nm)</b>	0.16 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.03

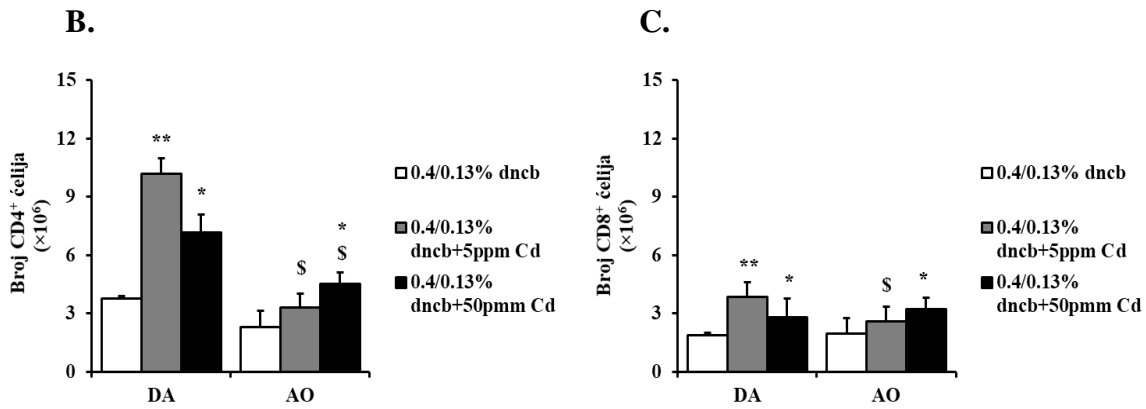
Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D.

#### 4.10.3.4. Promena broja glavnih subpopulacija T ćelija u tkivu uva

Analiza broja ćelija uva (Slika 31A) ukazala je da oralni unos Cd nije ugrozio celularnost i proliferaciju ćelija aLČ između tretiranih i kontrolnih životinja, kao ni između sojeva. S obzirom da je zapažen povećan otok uva (desnog) nakon primene Cd u odnosu na senzibilisanu kontrolu (0.4/0.13% DNCB) (Slika 31B), dalje je ispitan broj CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija u ovom tkivu. Primećeno je povećanje CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija nakon primene obe (0.4/0.13% DNCB+5ppm i 0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) doze Cd kod DA pacova, a samo nakon primene više doze Cd kod AO pacova (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd), i niže u odnosu na DA soj (Slika 31B, C).



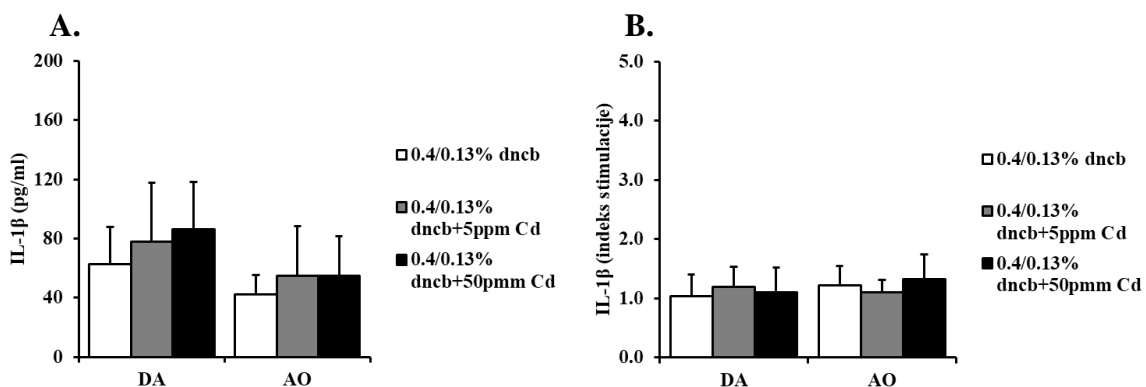


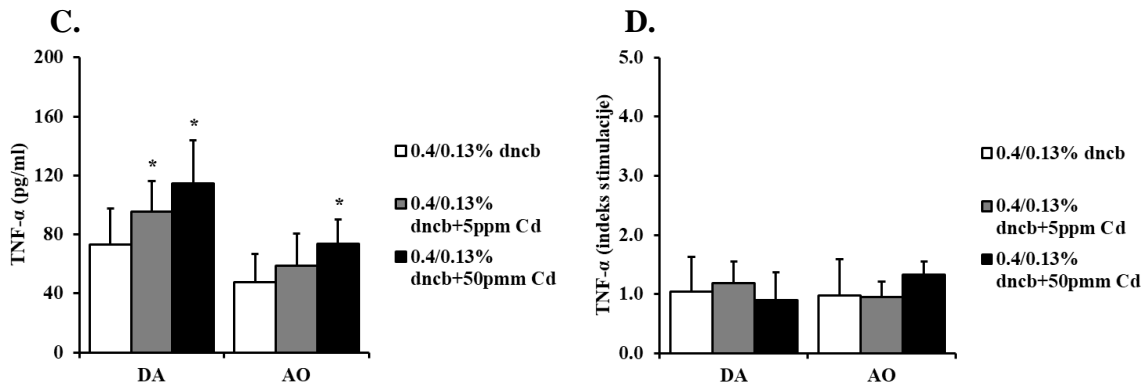


**Slika 31. Efekat kadmijuma na infiltraciju CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija u tkivu uva tokom faze elicitacije u reakciji kontaktne preosetljivosti.** (A) Broj ćelija uva. (B) CD4<sup>+</sup> ćelije. (C) CD8<sup>+</sup> ćelije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 3 nezavisna eksperimenta ± S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$ $P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.10.3.5. Produkcija citokina urođene imunosti (IL-1 $\beta$ i TNF- $\alpha$ ) od strane ćelija uva

Kako bi se ispitao efekat Cd na funkcionalnost ćelija urođene imunosti u fazi elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti, analizirana je produkcija citokina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  (Slika 32). Kod oba soja pacova zapažena je nepromenjena spontana produkcija IL-1 $\beta$  (Slika 32A), a povećana produkcija TNF- $\alpha$  (Slika 32C). Povećana produkcija (spontana) TNF- $\alpha$  primećena je nakon primene obe doze Cd (0.4/0.13% DNCB+5ppm Cd i 0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) u poređenju sa 0.4/0.13% DNCB+0ppm Cd grupom kod DA pacova, a samo nakon primene više doze (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) Cd kod AO pacova. Analiza indeksa stimulacije (LPS/spontana produkcija) nije ukazala na promene u IL-1 $\beta$  (Slika 32B) i TNF- $\alpha$  (Slika 32D) citokina nakon dodavanja LPS-a kod oba soja pacova.

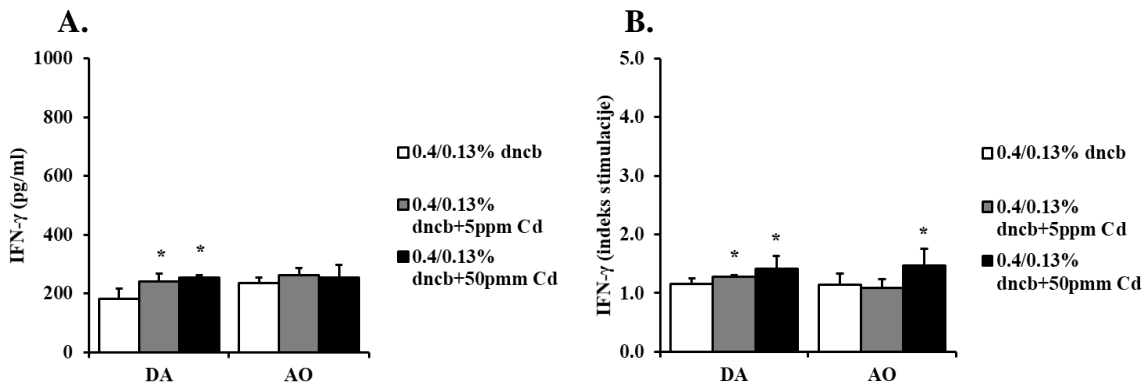


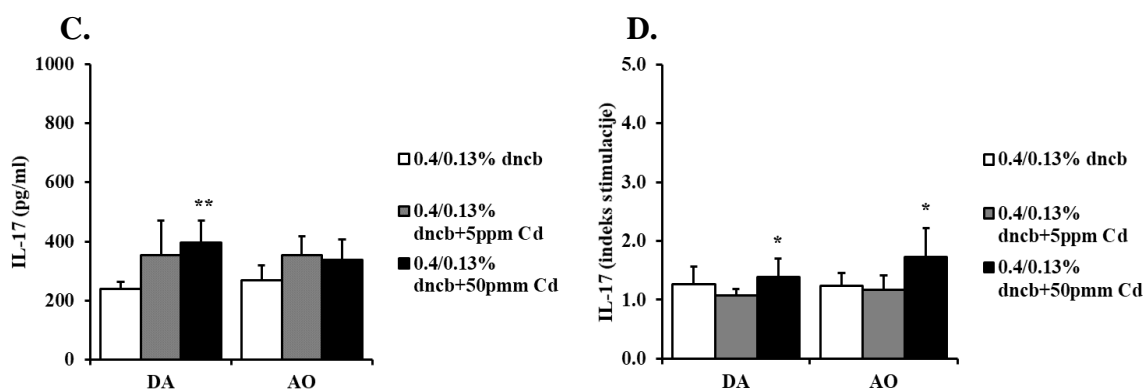


**Slika 32. Efekat kadmijuma na produkciju citokina urođene imunosti od strane ćelija uva tokom faze elicitacije u reakciji kontaktne preosetljivosti.** (A, B) Spontana produkcija i indeks stimulacije za IL-1 $\beta$  i (C, D) TNF- $\alpha$ . Indeks stimulacije predstavlja odnos LPS-stimulisane produkcije i spontane produkcije (LPS/spontana produkcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 3 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.10.3.6. Produkcija citokina adaptivne imunosti (IFN- $\gamma$ i IL-17) od strane ćelija uva

Sa ciljem ispitivanja efekta Cd na funkcionalnost ćelija adaptivne imunosti u fazi elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti, analizirana je produkcija IFN- $\gamma$  i IL-17 (Slika 33). Kod jedinki DA soja uočeno je povećanje spontane produkcije IFN- $\gamma$  i IL-17 nakon više doze (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) Cd (Slika 33A, B), a samo IFN- $\gamma$  i nakon niže doze (0.4/0.13% DNCB+5ppm Cd) Cd (Slika 33A). Indeks stimulacije (DNBS/spontana produkcija) ukazuju na dodatno povećanje ovih citokina nakon dodavanja DNBS-a, dok je efekat Cd kod AO pacova zapažen samo nakon stimulacije ćelija uva sa DNBS-om, u smislu povećanih indeksa stimulacije za IFN- $\gamma$  (Slika 33B) i IL-17 (Slika 33D) nakon unosa više (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) doze Cd.





**Slika 33. Efekat kadmijuma na produkciju citokina adaptivne imunosti od strane ćelija uva tokom faze elicitacije u reakciji kontaktne preosetljivosti.** (A, B) Spontana produkcija i indeks stimulacije za IFN- $\gamma$  (C, D) i IL-17. Indeks stimulacije predstavlja odnos DNBS-stimulisane produkcije i spontane produkcije (DNBS/spontana produkcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 3 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.10.3.7. Vijabilnost ćelija uva u kulturi

Ispitivanje efekta Cd na metaboličku vijabilnost ćelija uva u kulturi nakon kultivacije (48h), nije ukazao na kompromitovanu redukciju MTT kod DA ( $0.25 \pm 0.02$ ,  $0.25 \pm 0.02$ ,  $0.28 \pm 0.02$  kod spontane produkcije,  $0.20 \pm 0.04$ ,  $0.22 \pm 0.05$ ,  $0.24 \pm 0.02$  kod stimulacije LPS-om i  $0.21 \pm 0.02$ ,  $0.20 \pm 0.02$ ,  $0.22 \pm 0.03$  kod stimulacije DNBS-om na 0.4/0.13% DNCB+0ppm Cd, 0.4/0.13% DNCB+5ppm Cd i 0.4/0.13% DNCB+50 ppm Cd, redom) kao ni kod AO ( $0.25 \pm 0.02$ ,  $0.24 \pm 0.02$ ,  $0.22 \pm 0.03$  kod spontane produkcije,  $0.21 \pm 0.02$ ,  $0.24 \pm 0.03$ ,  $0.20 \pm 0.02$  kod LPS-stimulisane i  $0.19 \pm 0.02$ ,  $0.18 \pm 0.01$ ,  $0.19 \pm 0.01$  kod stimulacije DNBS-om) pacova.

#### 4.10.4 Ispitivanje efekta kadmijuma na aktivnost ćelija aLČ u fazi ekspresije reakcije kontaktne preosetljivosti

##### 4.10.4.1. Vijabilnost ćelija aLČ

Tretman Cd nije doveo do promena u procentualnoj zastupljenosti vijabilnih ćelija aLČ kao ni metaboličkoj vijabilnosti ovih ćelija, merenoj MTT testom odmah nakon njihove izolacije (0h), kod tretiranih u poređenju sa kontrolnim životinjama (oba soja pacova) (Tabela 13).

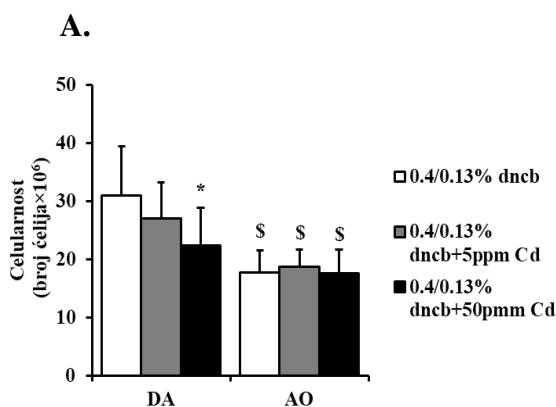
Tabela 13. Vijabilnost ćelija aLč

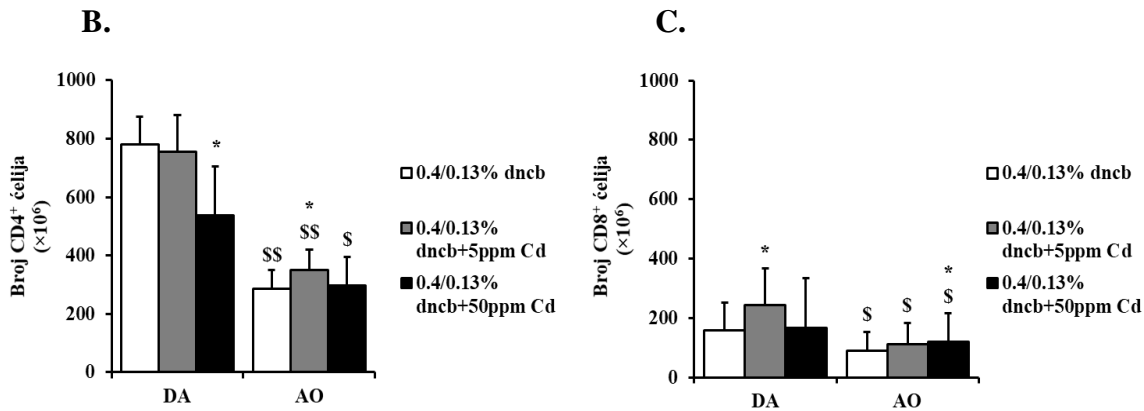
	DA			AO		
	0.4/0.13% DNCB +0ppm Cd	0.4/0.13% DNCB +5ppm Cd	0.4/0.13% DNCB +50ppm Cd	0.4/0.13% DNCB +0ppm Cd	0.4/0.13% DNCB +5ppm Cd	0.4/0.13% DNCB +50ppm Cd
	<b>vijabilnost (%)</b>	91.6±2.4	92.0±1.2	88.8±2.9	89.7±3.7	87.1±4.0
<b>MTT (0h) (A540 nm)</b>	0.21±0.08	0.23±0.04	0.51±0.26	0.19±0.04	0.19±0.01	0.17±0.02

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje tri nezavisna eksperimenta ± S.D.

#### 4.10.4.2. Promena broja CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija u aLč u fazi elicitacije

Smanjenje celularnosti (broja ćelija) zapaženo je samo kod DA soja nakon primene više doze Cd (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd), dok su ovi osnovni parametri aktivnosti ćelija aLč ostali nepromenjeni kod jedinki AO soja pacova. Poređenje broja ćelija između sojeva pokazalo je generalno manju celularnosti aLč kod AO soja u poređenju sa DA sojem (Slika 34A). Analiza broja ćelija u aLč, kod jedinki DA soja ukazala je na smanjenje CD4<sup>+</sup> (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) (Slika 34B), a povećanje CD8<sup>+</sup> (0.4/0.13% DNCB+5ppm Cd) (Slika 34C) ćelija nakon primene više (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) tj niže (0.4/0.13% DNCB+5ppm Cd) doze Cd, redom. Sa druge strane, kod jedinki AO soja zabeleženo je povećanje broja obe subpopulacije ćelija, CD4<sup>+</sup> pri nižoj dozi (0.4/0.13% DNCB+5ppm Cd) (Slika 34B) i CD8<sup>+</sup> pri obe doze (0.4/0.13% DNCB+5ppm i 0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) metala (Slika 34C). Uporedna analiza između sojeva ukazala je na generalno niži broj CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija kod AO pacova u odnosu na DA pacove (Slika 34B, C).

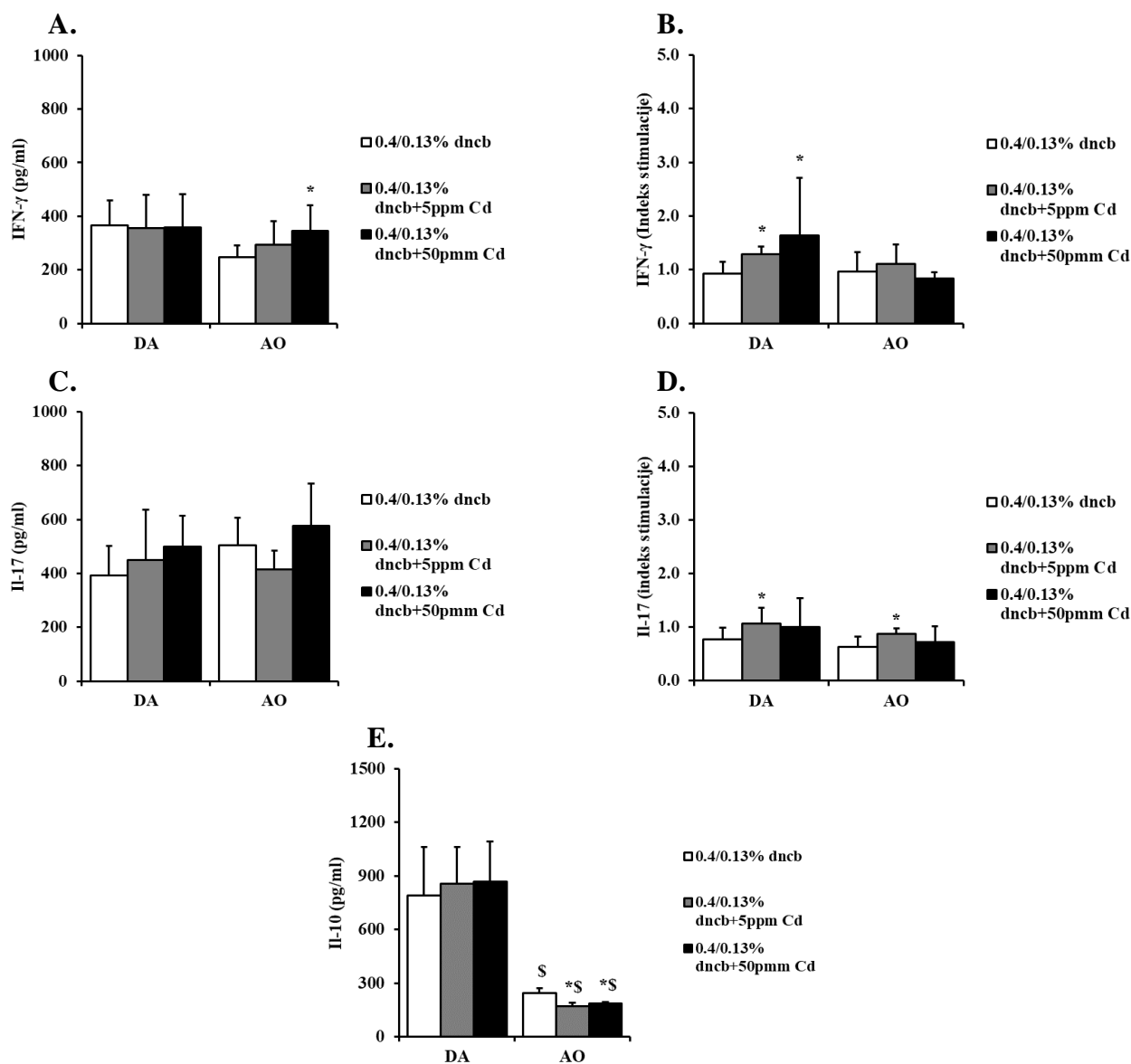




**Slika 34. Efekat kadmijuma na infiltraciju T limfocita u aLČ tokom faze elicitacije u reakciji kontaktne preosetljivosti. (A) Prinos ćelija uva. (B) CD4<sup>+</sup> T ćelije. (C) CD8<sup>+</sup> T ćelije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 3 nezavisna eksperimenta ± S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja;  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{\$\$}P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.**

#### 4.10.4.3. Produkcija citokina adaptivne imunosti (IFN- $\gamma$ i IL-17) u aLČ u fazi elicitacij

Efekat Cd na spontanu produkciju IFN- $\gamma$  (Slika 35A), IL-17 (Slika 35C) i IL-10 (Slika 35E) od strane aLČ DA pacova izostao je u fazi elicitacije reakcije kontaktne preosetljivosti. Nakon stimulacije ćelija aLČ DNBS-om dobijen je sličan obrazac odgovora, mada je u nekim slučajevima došlo do odsustva razlike između kontrolnih i tretiranih grupa, što ukazuje na moguću imunosupresiju, mada rezultati nisu konzistentni (rezultati nisu prikazani). Međutim, indeks stimulacije pokazao je kod ovog soja porast nivoa IFN- $\gamma$  (Slika 35B) nakon obe (0.4/0.13% DNCB+5ppm Cd i 0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) doze Cd i IL-17 (Slika 35D) samo nakon primene niže (0.4% DNCB+5ppm Cd) doze Cd. Sa druge strane, jedinke AO soja odgovorile su na prisustvo Cd povećanom spontanom produkcijom IFN- $\gamma$  (0.4% DNCB+50ppm Cd) i smanjenom produkcijom IL-10 nakon primene obe doze (0.4/0.13% DNCB+5ppm i 50ppm Cd) Cd (manje u odnosu na DA soj kod svih grupa), a povećanom DNBS-stimulisanom produkcijom (indeks stimulacije) IL-17 (0.4/0.13% DNCB+5ppm Cd). Nisu uočene razlike u produkciji ovih citokina između sojeva, izuzev smanjenog nivoa IFN- $\gamma$  nakon primene više (grupa 0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) doze Cd nakon stimulacije DNBS-om (Slika 35B).



**Slika 35.** Efekat kadmijuma na produkciju citokina adaptivne imunosti od strane ćelija aLČ tokom faze elicitacije u reakciji kontaktne preosetljivosti. (A, B) Spontana produkcija i indeks stimulacije za IFN- $\gamma$  i (C, D) IL-17. Indeks stimulacije predstavlja odnos DNBS-stimulisane produkcije i spontane produkcije (DNBS/spontana produkcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz 3 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; § $P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.10.4.4. Vijabilnost ćelija aLČ u kulturi

Ispitivanje efekta Cd na metaboličku vijabilnost ćelija aLČ u kulturi nakon kultivacije (48h), nije ukazao na kompromitovanu redukciju MTT kod DA ( $0.60 \pm 0.15$ ,  $0.71 \pm 0.20$ ,  $0.66 \pm 0.248$  kod spontane produkcije i  $0.38 \pm 0.13$ ,  $0.57 \pm 0.25$ ,  $0.40 \pm 0.30$  kod indeksa stimulacije (DNBS/spontana produkcija) na 0.4/0.13% DNCB+0ppm Cd, 0.4/0.13% DNCB+5ppm Cd i 0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd, redom) kao ni kod AO ( $0.39 \pm 0.1$ ,  $0.34 \pm 0.1$ ,  $0.31 \pm 0.1$  kod spontane produkcije i  $0.20 \pm 0.15$ ,  $0.13 \pm 0.02$ ,  $0.12 \pm 0.01$  kod indeksa stimulacije (DNBS/spontana produkcija) pacova).

## **5. DISKUSIJA**

U ovom radu ispitan je efekat oralnog (30 dana) unosa dve sredinski bitne doze kadmijuma (Cd) na markere sistemske inflamacije (periferna krv), kao i na aktivnost kože i limfnih čvorova koji dreniraju ovo tkivo, kod Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO) sojeva pacova. U ukupnoj koži (homogenati i organo-kultura eksplanata kože) ispitan su parametri oksidativnog stresa i inflamacije, dok je efekat Cd na izolovane EĆ kože procenjivan analizom stres odgovora, imunske/inflamatorne aktivnosti ovih ćelija, kao i reaktivnosti EĆ na dodatni *ex vivo* stimulus, komensalnu bakteriju *S.epidermidis*, i potencijala EĆ da stimulišu naivne limfocite u kokulturi. Efekat oralnog unosa Cd ispitan je i na osnovne parametre imunske aktivnosti ćelja derma i dLČ kože (saLČ). Dodatno, ispitana je i reaktivnost kože na dodatni zapaljenski stimulus (DNCB), analizom parametara imunske aktivnosti ćelija kože i dLČ u fazi senzibilizacije (koža i saLČ) i elicitacije (uši i aLČ) reakcije kontaktne preosetljivosti (KP), nakon oralnog unosa Cd.

Oralni unos Cd predstavlja glavni put njegovog dospevanja u organizam (Klaassen i drugi, 2009). Različite studije pokazale su da izlaganje Cd predstavlja veliku opasnost po zdravlje ljudi (Satarug i drugi, 2010), gde sredinsko izlaganje niskim dozama ovog metala vodi ka povećanom riziku za razvoj bolesti kostiju, bubrega, pluća, srca i nervnog tkiva (Nair i drugi, 2014). Doze Cd korišćene u ovoj studiji, odgovaraju sredinskom zagađenju kojem su bile izložene žene obbolele od „*itai itai*“ bolesti (5 ppm Cd) (Bhattacharyya i drugi, 1988), kao i koncentraciji ovog metala (50 ppm Cd) u visoko zagađenim područjima ili okruženjima gde su ljudi profesionalno izloženi Cd (Wang i drugi, 2003), i u skladu su sa koncentracijama Cd korišćenim u drugim studijama na životinjama (Lukačinová i drugi, 2011; Lafuente i drugi, 2004; Ansari i Khan, 2015). Iako je pokazano da Cd može da utiče na imunološke (npr. produkcija citokina) i biohemijske (npr. aktivnost enzima koji metabolišu ksenobiotike) procese, za koje se zna da su važni za održavanje homeostaze kože (Merk, 2009), podataka o efektu oralnog unosa Cd na kožu gotovo da nema.

Poznato je da genetska genska varijabilnost predstavlja bitan faktor koji doprinosi osetljivosti ljudi na Cd (Satarug i drugi, 2000). Kako bi identifikovali potencijalne sojne razlike u odgovoru kože na prisustvo Cd, ispitana je njegova dermatotoksičnost kod dva soja pacova (DA i AO) koja se široko koriste u imunološkim istraživanjima, usled razlika u osetljivosti imunskih ćelija na različite agense (Miljkovic i drugi, 2006; Popov Aleksandrov i drugi, 2015; Kovacevic-Jovanovic i drugi, 2015; Mirkov i drugi, 2015). Tako su jedinke DA soja osetljivije na razvoj eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa, eksperimentalno indukovano artritisa i reakcija kontaktne preosetljivosti u poređenju sa AO pacovima (Miljkovic i drugi, 2006; Popov Aleksandrov i drugi, 2015; Kovacevic-Jovanovic i drugi, 2015). Takođe ova dva soja su pokazala različitu osetljivost na imunotoksične efekte Cd u gastrointestinalnom traktu, slezini i plućima (Ninkov i drugi, 2016; Demenesku i drugi, 2016).

## 5.1. Efekat oralne primene Cd na osnovne parametre toksičnosti

Prilikom testiranja supstanci koje se primenjuju oralno, putem hrane ili vode, neophodno je pratiti unos vode i potencijalnu promenu telesne mase svake pojedinačne životinje, pre tretmana i najmanje jednom nedeljno tokom tretmana, kao i pre žrtvovanja životinja (OECD, 2005). Osnovni parametri koji ukazuju na toksične efekte neke supstance, jesu smanjenje telesne mase životinja i smanjen unos vode (Ajani i drugi, 1990). Oralni tretman Cd nije doveo do promene telesne mase ni kod jednog soja pacova (iako je telesna masa AO pacova generalno viša), kao ni do razlika u unosu vode (po kg t.m.) u odnosu na kontrolne životinje. Rezultati dobijeni u ovom radu u skladu su sa studijom Mei i drugi (2017), u kojoj su miševi tretirani Cd rastvorenim u vodi za piće (10, 30 i 50 mg/kg) u trajanju od 8 nedelja, kao i sa rezultatima dobijenim na pacovima nakon hroničnog



tretmana (12 nedelja) istim dozama (5 ppm i 50 ppm) (Brzoska i drugi, 2003) Cd.

## 5.2. Deponovanje kadmijuma u tkivima i esencijalnih metala u koži (Fe, Cu, Zn)

Oralni unos Cd doveo je do dozno-zavisnog povećanja ovog metala u dlaci, ukupnoj koži, epidermu, saLČ, duodenumu, bubrezima i jetri (samo kod AO pacova), dok je povećanje u dermu zapaženo samo nakon primene više doze, kod oba soja pacova. Kao što je i očekivano, najveća koncentracija Cd u koži, pronađena je u dlaci, koja služi kao sistem za akumulaciju i izbacivanje teških metala iz organizma (Friberg i drugi, 1985; Morton i drugi, 2002), i već dugo se koristi kao pouzdan biomarker izloženosti ljudi teškim metalima (Harkins i Susten, 2003; Agusa i drugi, 2005; Rashed i Hossam, 2007), pa tako i Cd (Patra i drugi, 2006). Nivo deponovanja Cd u dlaci bio je sličan nivoima ovog metala u jetri i bubrezima, primarnih ciljnih organa njegovog delovanja (Satarug i drugi, 2010; Hiratsuka i drugi, 1999). Deponovanje Cd u dlaci pokazano je i u brojnim epidemiološkim studijama (Wibowo i drugi, 1986; Lauwerys i drugi, 1994). Odsustvo regionalnih razlika u deponovanju Cd, odnosno između dorzalne i ventralne ( $0.017 \pm 0.005$ ,  $0.044 \pm 0.02$ ,  $0.112 \pm 0.03$  kod DA i  $0.011 \pm 0.004$ ,  $0.02 \pm 0.004$ ,  $0.466 \pm 0.004$  kod AO na 0 ppm, 5ppm i 50 ppm, redom) kože kod oba soja pacova, u skladu je sa studijom Mei i drugi (2017) na miševima koji su bili izloženi oralnom Cd u trajanju od 8 nedelja. Veće deponovanje Cd u epidermu kože u poređenju sa dermom, verovatno je posledica vezivanja Cd za SH grupe cisteina keratina, kojima su bogate epiderme ćelije (EĆ) (Vallee i Ulmer, 1972; Fasanya-Odewumi i drugi, 1998; Patra i drugi, 2007), a koje su u dermu mnogo manje zastupljene (Goldblum i drugi, 1954). Kako je pokazano da se teški metali nakon deponovanja u dermu (unutar folikula dlake) transportuju do gornjih slojeva dlake (Patra i drugi, 2006), to može objasniti izostanak deponovanja Cd u dermu nakon primene niže doze Cd.

Efekat Cd ispitan je i na koncentraciju esencijalnih metala (Fe, Cu, Zn) u koži koji imaju ulogu u održavanju njene homeostaze (Wright i drugi, 2014; Wintergerst i drugi, 2007) i sa kojima je ovaj metal u kompeticiji za receptore (Chmielnicka i Sowa, 1996). Međutim, oralni unos Cd nije značajno uticao na koncentraciju Fe, Cu i Zn u koži (rezultati nisu prikazani), verovatno usled njihove velike koncentracije u koži pre oralnog tretmana životinja Cd (kontrolne životinje imaju veći nivo deponovanja Fe, Cu i Zn u poređenju sa Cd).

## 5.3. Efekat oralnog unosa kadmijuma na markere sistemske inflamacije

Oralni unos Cd doveo je do povećanja nivoa ovog metala u krvi nakon primene obe doze, kod oba soja pacova. Količina Cd u krvi predstavlja dobar biomarker skorije izloženosti ovom teškom metalu (2-3 meseca) (Julin i drugi, 2011; Lauwerys i drugi, 1984), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu, s obzirom da su životinje žrtvovane odmah nakon tretmana Cd u trajanju od 30 dana, dok se izostanak njegovog dozno-zavisnog deponovanja može objasniti devijacijama unutar grupa. Akutno-fazni proteini (engl. Acute-phase proteins, APPs) produkuju se u plazmi kao odgovor na infekciju i inflamaciju, gde učestvuju u mobilizaciji leukocita u cirkulaciju i povećavanju protoka krvi ka mestu povrede ili infekcije tkiva (Janciauskiene i drugi, 2011). Oralni tretman Cd nije doveo do razlike u nivou akutno-faznih proteina, haptoglobina, fibrinogena i albumina u odnosu na kontrolne životinje kod oba soja pacova, što sugeriše odsustvo sistemske

zapaļjenske reakcije. Kako je poznato da je sinteza ova tri APP regulisana inflamatornim citokinima (Moshage i drugi, 1987; Koj, 1985; Kushner i Mackiewicz, 1993), ispitani su nivoi IL-6 i TNF- $\alpha$ , koji imaju najveći doprinos u njihovoj sintezi (Beutler i Cerami, 1986; Heinrich i drugi, 1990; Waage i drugi, 1992). Zapaženi niski nivoi ovih citokina (ispod nivoa detekcije), pokazani i u drugim studijama (Ullum i drugi, 1994), mogu objasniti izostanak efekta Cd na APP. Ipak, postoje studije koje pokazuju da oralni tretman Cd (50 ppm i 100 ppm) u trajanju od 7 nedelja dovodi do povećanja IL-6 i TNF- $\alpha$  u plazmi pacova (Afolabi i drugi, 2012), što ukazuje da efekat Cd na produkciju citokina i APP u perifernoj krvi, zavisi od doze i dužine izloženosti ovom metalu. Nemogućnost detekcije IL-6 i TNF- $\alpha$  može se pripisati i osetljivosti testa korišćenog za detekciju ciljnih citokina, s obzirom da je nivo IL-6 u plazmi jako nizak (0-3.5 pg/ml) u fiziološkim uslovima.

#### **5.4. Efekat oralnog unosa kadmijuma na histološki vidljive promene u koži i infiltraciju/aktivnost imunskih ćelija**

Da Cd dovodi do oštećenja kože pokazala je analiza histoloških preseka ovog tkiva gde je zapaženo prisustvo hiperkeratoze i hipergranuloze, formiranje novih vaskularnih prostora i infiltracija imunskih ćelija kod oba soja pacova, kao i dilatacija sebaceoznih folikula samo kod pacova DA soja. Poznato je da oralni tretman Cd dovodi do histološki vidljivih promena i u drugim tkivima, pre svega jetri i bubrezima, kao glavnim ciljnim organima delovanja ovog teškog metala (Waalkes i Goering, 1990). Pojava hiperkeratoze i hipergranuloze u tkivu kože tretiranih životinja oba soja u skladu je sa rezultatima dobijenim na Harlan Sprague-Dawley pacovima nakon dermalne aplikacije (42 dana) ovog metala (28 mg/kg) u studiji Fasanya-Odewumi i drugi (1998), gde je Cd uzrokovao lezije kože u vidu hiperkeratoze, akantoze i pojave krasti, eritema i alopecije. Studija Kaji i drugi (1992) pokazala je da Cd oštećuje endotelne ćelije i da svojim citotoksičnim efektima razdvaja ćelije doprinoseći tako nastanku vaskularnih prostora, kao i da inhibicijom ćelijske proliferacije sprečava reparaciju novonastalih prostora, čime bi se mogli objasniti nastanak novoformiranih vaskularnih prostora kod oba soja pacova (obe doze Cd kod DA pacova, samo viša doza Cd kod AO pacova) i širenje sebaceoznih folikula zabeleženih samo kod DA soja (obe doze Cd). Nakon primene obe doze Cd kod DA pacova, a samo nakon primene više doze kod AO pacova došlo je do infiltracije neutrofila, sudeći po povećanom nivou MPO u homogenatu kože koji se koristi kao mera infiltracije polimorfonuklearnih ćelija u tkivo (Schierwagen i drugi, 1990). Migracija neutrofila u kožu može biti posledica direktnog delovanja Cd, jer je pokazano u *in vitro* studiji da ovaj metal (25  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>) može da stimuliše migraciju granulocita (Hernandez i Macia, 1996). Sa druge strane, infiltracija neutrofila može biti posledica indirektnog delovanja Cd. Naime, Cd indukuje oksidativna oštećenja tkiva i tako neposredno deluje na redoks-osetljive transkripcione faktore (TF) NF- $\kappa$ B i AP-1, koji imaju ulogu u regulaciji proinflamatornih citokina, TNF- $\alpha$  i IL-1 $\alpha/\beta$ , a koji dalje stimulišu produkciju molekula važnih za regrutovanje, vezivanje i aktivaciju cirkulišućih inflamatornih ćelija, poput neutrofila (Rikans i Yamano, 2000). Broj mast ćelija, za koje je pokazano da odgovaraju na mnoge sredinske stimuluse (Theoharides i drugi, 2012), povećan je kod DA i AO pacova nakon oralnog unosa obe doze Cd. Ovakav efekat Cd na infiltraciju mast ćelija pokazan je i u *in vitro* studiji Walczak-Drzewiecka i drugi (2003), gde su niske doze Cd (10<sup>-4</sup> M Cd<sup>2+</sup>) dovele do aktivacije mast ćelija miša.

## 5.5. Efekat oralnog unosa kadmijuma na markere oštećenja kože

Barijernu funkciju kože, od kojih je najbitnija regulacija njene propustljivosti, vrši epiderm pomoću hidrofobnih lipida (Elias i Menon, 1991) u vanćelijskim domenima keratinocita sloja *stratum corneum* (Elias, 2005), i pomoću tesnih veza između ovih ćelija (Yoshida i drugi, 2013; Furuse i drugi, 2002). Oralni tretman Cd doveo je do narušavanja barijerne funkcije kože, povećanjem njene propustljivosti kod DA pacova već nakon primene niže doze Cd, i kod AO nakon primene više doze metala. Povećanje propustljivosti može biti posledica štetnog efekta Cd na veze između epitelnih ćelija, kao što je pokazano u *in vitro* studijama na epitelnim ćelijama pluća (Cao i drugi, 2015) i bubrega (LLC-PK1), gde je Cd (60 mM) doveo do narušavanja međućelijskih veza i remećenja aktinskih filamenata (Prozialeck i Niewenhuis, 1991). Izostanak efekta Cd na propustljivost kože jedinki AO soja nakon primene niže doze (5 ppm) ovog metala, verovatno je posledica manje osetljivosti ovog soja na uticaj spoljašnjih agenasa koji imaju sposobnost da remete veze između epitelnih ćelija, usled čega je neophodna primena veće doze Cd (50 ppm) kako bi došlo do ispoljavanja njegovog dermatotoksičnog efekta. U prilog ovome idu i epidemiološke studije na 2400 uzoraka kože (pune debljine) poreklom od 112 donora, koje su pokazale da postoji individualna varijabilnost u transepidermnoj propustljivosti kože kod ljudi (Meidan i Roper, 2008).

Skorije studije ukazale su na povezanost propustljivosti epidermalne barijere i antioksidativne odbrane, gde kod oboljenja kože nastalih usled poremećaja njene propustljivosti, uglavnom dolazi do razvoja oksidativnih oštećenja ćelija (Scharschmidt i drugi, 2009; Kostyuk i drugi, 2010; Sapuntsova i drugi, 2011). U vezi sa tim, zapaženo je povećanje lipidne peroksidacije, mereno nivoom MDA, u homogenatima kože kod DA (obe doze Cd) i AO (samo viša doza Cd) pacova, reakcije posredovane slobodnim radikalima nastalim usled oksidativnih oštećenja polinezasićenih lipida ćelijskih membrana (Rosenblum i drugi, 1989), gde dolazi do oslobađanja MDA kao jednog od njenih produkata (Marnett, 1999). Prema jednom od predloženih mehanizama njegovog delovanja, Cd dovodi do oslobađanja jona gvožđa (Belyaeva i drugi, 2008; Pathak i Khandelwal, 2006; Dorta i drugi, 2003; Yeh i drugi, 2009), koji dalje Fentonovom reakcijom povećavaju produkciju ROS unutar ćelija (Harrison i Arosio, 1996). Ukoliko ROS prevaziđu antioksidativnu zaštitu dolazi do lipidne peroksidacije (Bagchi i drugi, 1997; Waisberg i drugi, 2003). Sličan rezultat dobijen je u *in vitro* studiji na humanoj liniji keratinocita (HaCaT), gde je primena visokih doza Cd (50 i 100  $\mu$ M) dovela do oksidacije lipida (Nzengue i drugi, 2008). Da je glavni mehanizam delovanja toksičnosti Cd oksidativni stres, pokazano je na mnogim animalnim modelima nakon svih puteva izlaganja (Manca i drugi, 1994; Kayama i drugi, 1995b; Yamano i drugi, 2000; Amara i drugi, 2008), kao i na ćelijskim kulturama (Liu i drugi, 1990; Hart i drugi, 1999; Liu i Jan, 2000; He i drugi, 2008).

Povećanje lipidne peroksidacije nakon primene već niže doze Cd, ukazuje na veću osetljivost DA soja na toksične efekte Cd u poređenju sa AO sojem. U prilog ovome ide i povećana aktivnost enzima antioksidativne zaštite CAT, SOD i GST nakon primene obe doze Cd kod DA soja, koja se može protumačiti kao zaštitni odgovor ćelija na prisustvo ROS kako bi se ograničilo oštećenje kože. Iako je povećana produkcija ROS uglavnom praćena smanjenjem aktivnosti SOD i CAT (Morales i drugi, 2006; Sidhu i drugi, 1993), postoje i studije koje ukazuju na povećanu aktivnost ovih enzima u odgovoru na toksičnost izazvanu Cd (Haouem i El Hani, 2013; Radosavljevic i drugi, 2012; Ognjanovic i drugi, 2003). Povećanje GST nakon primene Cd pokazano je i u drugim studijama na pacovima (Ognjanovic i drugi, 1995) i zamorcima (Iscan i drugi, 1994). Kod AO pacova povećanje GST nakon primene više (50 ppm) doze ovog metala, i nepromenjeni nivoi CAT i SOD, ukazuju na postojanje niskog nivoa oksidativnog stresa, ali ipak dovoljnog da dovede do zapaženih oštećenja kože.

HMGB1 molekul, kao jedan od markera inflamacije, povećan je kod DA soja pacova na 5 ppm (tendencija povećanja  $P=0.08$ ) i 50 ppm Cd. HMGB1 (engl. High-mobility group box 1 protein) molekul spada u jedan od najbolje proučenih molekulskih obrazaca oštećenja (engl. Danger Associated Molecular Patterns, DAMPs), koji kada se nađe van ćelije utiče na diferencijaciju (Sparatore i drugi, 1996; Passalacqua i drugi, 1997), migraciju (Fages i drugi, 2000), metastazu (Taguchi i drugi, 2000; Huttunen i drugi, 2002), apoptozu (Brezniceanu i drugi, 2003) i inflamatorni odgovor ćelija (Wang i drugi, 1999b; Scaffidi i drugi, 2002). Povećanje nivoa HMGB1 kod DA pacova verovatno je posledica nekroze tkiva kože, jer je pokazano da nekrotične i/ili oštećene ćelije imaju sposobnost da pasivno oslobađaju velike količine ovog molekula u vanćelijski medijum (Andersson i drugi, 2000; Falciola i drugi, 1997), i tako pokrenu proces inflamacije (Scaffidi i drugi, 2002; Degryse i drugi, 2001; Andersson i drugi, 2000; Falciola i drugi, 1997). Uticaj Cd na povećanje HMGB1 proteina pokazan je i u *in vitro* studiji Ou i drugi (2017) na ćelijskoj liniji spermatoocita miša (GC-2spd). Povećanje HMGB1 molekula može se povezati sa povećanom produkcijom IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  kod DA soja pacova zapaženim u supernatantima organo-kulture eksplanata kože nakon primene obe doze Cd, koji mogu da pokrenu i amplifikuju proces inflamacije u koži (Williams i Kupper, 1996; Fischer i Maier, 2015). Naime, pokazano je da ukoliko se HMGB1 molekul blokira, dolazi do smanjenja ekspresije gena za ove citokine (Mittal i drugi, 2010), kao i da izlaganje makrofaga ovom molekulu vodi ka produkciji IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  (Andersson i drugi, 2000) koji pozitivnom povratnom spregom dovode do dodatnog povećanja HMGB1, pojačavajući na taj način inflamatorni odgovor (Wang i drugi, 1999a, b).

Takođe, povećana produkcija proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6) može se povezati sa oksidativnim stresom kod jedinki DA soja. Naime, poznato je da je inflamatorni odgovor modulisan oksidativnim stresom, gde ukoliko postoji poremećen redoks balans dolazi do razvoja inflamatornog odgovora kao zaštitnog mehanizma, dok usled hroničnog gubitka redoks balansa dolazi do razvoja nekontrolisanog inflamatornog odgovora (Griffiths i drugi, 2005; Jayaraj i drugi, 2017). U prilog tome ide i povećana produkcija azot-oksida (NO) kod jedinki DA soja (obe doze Cd), s obzirom da se ovaj molekul sintetiše, a zatim i oslobađa, pod delovanjem proinflamatornih citokina tokom procesa inflamacije (Guzik i drugi, 2003; Sharma i drugi, 2007). Povećanje antiinflamatornog citokina IL-10 kod jedinki DA soja na 50 ppm Cd u skladu je sa *in vitro* (Odewumi i drugi, 2015) studijom nakon primene 50  $\mu$ M i 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> na ćelijama pluća (MRC-9) gde je pokazano da se IL-10 proizvodi zajedno sa proinflamatornim citokinom IL-1. Naime, pokazano je da nakon eksperimentalnog izazivanja opekotina kože, zajedno sa produkcijom proinflamatornih citokina dolazi i do produkcije antiinflamatornog citokina IL-10 (Angst i drugi, 2008), koji se proizvodi verovatno kao mera zaštite od prekomerne inflamacije.

Oksidativni stres niskog nivoa, zajedno sa nepromenjenim nivoom HMGB1 molekula, verovatno nije bio dovoljan za razvoj proinflamatornog odgovora kod jedinki AO soja, pa nije zapažena povećana produkcija IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6, kao ni NO, što sve zajedno ukazuje na bolje kontrolisanu reakciju u koži AO pacova na oralni unos Cd. Dodatno, generalno viši nivo SOD kod AO pacova (i u kontrolama) može se povezati sa nepromenjenom produkcijom TNF- $\alpha$ , jer je pokazano da agensi slični SOD (TEMPOL) mogu smanjiti nivo TNF- $\alpha$  u bubrezima (Elmarakby i Sullivan, 2012). Sa druge strane, kako je poznato da IL-10 može da inhibira produkciju proinflamatornih citokina (D'andrea i drugi, 1993; Fiorentino i drugi, 1991; Akdis i Blaser, 2001; Vital i drugi, 2004; Maurer i drugi, 2003), njegovo povećanje nakon obe doze Cd kod ovog soja (i generalno više u odnosu na DA) može biti odgovorno za nepromenjene nivoe IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ . Sudeći po rezultatima MTT testa korišćenog za procenu vijabilnosti eksplanata kože, nepromenjena produkcija proinflamatornih citokina kod jedinki AO soja nije posledica pada vijabilnosti, (Klein i drugi, 1996), jer nisu uočene razlike u metaboličkoj vijabilnosti između tretiranih i kontrolnih životinja ni kod DA ni kod AO soja.

## 5.6. Stres odgovor epidermnih ćelija

Kako je pokazano da nakon oralnog unosa Cd u epidermu kože dolazi do dozno-zavisnog povećanja ovog metala (većeg nego u dermu), dalje je ispitan odgovor EĆ koje predstavljaju prvu liniju odbrane kože od štetnih agenasa i za koje je pokazano da posreduju u imunskim odgovorima (Nestle i drugi, 2009). Oralni unos Cd povećao je ekspresiju iRNK za metalotioneine (MT)-1 i -2 u EĆ oba soja, kod DA pacova nakon primene više doze i kod AO pacova nakon obe doze ovog metala. Pored toga što se koriste kao biomarkeri izloženosti Cd (Nzengue i drugi, 2011; Coyle i drugi, 2002; Klaassen i drugi, 2009), s obzirom da Cd može da se veže za tiolne grupe MT čime se neutrališe njegov toksični efekat (Kagi i Vallee, 1960), različite studije su pokazale da ovi proteini imaju veliki doprinos u zaštiti tkiva i organa od toksičnih efekata Cd kao antioksidantni faktori (Kluxen i drugi, 2012; Tsunoo i drugi, 1979; Sabolic i drugi, 2010). Povećana ekspresija MT već pri nižoj dozi Cd kod AO soja i generalno veća ekspresija gena za MT (i u kontrolama) u poređenju sa DA pacovima, sugerišu da bi ovi metaloproteini mogli obezbediti zaštitu EĆ od toksičnih efekata Cd kod ovog soja. Naime, zaštitna uloga MT u detoksifikaciji teških metala zapažena je kod transgenih miševa sa povećanom ekspresijom gena za MT u akutnoj toksičnosti Cd (Liu i Klaassen, 1996), i u jetri pacova gde presintetisani MT dovode do povećane otpornosti na toksični efekat Cd (Goering i Klaassen, 1984). Sojne razlike (između DA i AO pacova) u ekspresiji gena za ove proteine pokazane su i u studiji Grubic-Kezele i drugi (2013), gde je povećana ekspresija MT u jetri AO pacova povezana sa njihovom smanjenom osetljivošću na razvoj eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE). Uprkos deponovanju Cd na 5 ppm u epidermu kod DA pacova, ovakav zaštitni efekat MT-1 i MT-2 izostao je kod ovog soja pri istoj dozi ovog metala. Moguće je da niža doza Cd, kod soja više osetljivog na prisustvo ovog metala, ispoljava veće toksične efekte usled veće količine slobodnog (nevezanog) Cd (Liu i drugi, 1998).

Da Cd ispoljava svoje toksične efekte već pri nižoj dozi kod DA pacova pokazuje smanjenje koncentracije GSH nakon primene obe doze kod ovog soja, dok je njegova koncentracija povećana kod AO pacova tretiranih sa Cd. Epiderm usled svoje izloženosti spoljašnjoj sredini sadrži najveću količinu ROS, a samim tim i antioksidante (Vermeij i drugi, 2011) poput GSH, koji ima sposobnost da veže ROS održavajući tako redoks balans unutar ćelije (Du i drugi, 2009). Međutim, Cd ima sposobnost da se veže za tiolne grupe GSH trošeći njegove unutarćelijske rezervoare čime indirektno povećava količinu ROS i stvara oksidativno okruženje (Lopez i drugi, 2006). Smanjen nivo GSH kod DA pacova u saglasnosti je sa rezultatima dobijenim u *in vitro* (Chan i Cherian, 1992; Lopez i drugi, 2006) i *in vivo* (Dudley i Klaassen, 1984; Eybl i drugi, 2006) studijama. Povišen nivo GSH kod AO soja nakon primene obe doze Cd, može biti pokušaj EĆ da se zaštite od toksičnih efekata Cd (Jovanovic i Jovanovic, 2013; Kamiyama i drugi, 1995). Tako je pokazano da primena niskih doza Cd (u trajanju od 12 meseci) dovodi do povećanog nivoa GSH u jetri i bubrezima, sugerišući da on verovatno ima glavnu ulogu u zaštiti ćelija od citotoksičnosti izazvane Cd (Kamiyama i drugi, 1995; Nzengue i drugi, 2008). Nivoi GSH u tkivu zavise od životinjskog modela ili soja korišćenog u ispitivanjima (Matović i drugi, 2011), što može biti objašnjenje za diferencijalne efekte Cd na nivo GSH kod DA i AO soja pacova u našoj studiji.

Kod oba soja pacova nakon primene obe doze (5 ppm i 50 ppm) Cd došlo je do povećanja nivoa Nrf2 (engl. Nuclear factor erythroid 2 related factor 2) proteina u EĆ, transkripcionog faktora (TF) koji može da detektuje nizak stepen oksidativnog oštećenja (Nemmiche, 2017). Naime, pored klasičnih enzima antioksidativne zaštite (CAT, SOD, GST) čijom aktivacijom ćelije odgovaraju na toksične efekte Cd, pokazano je da ovaj metal može da aktivira i Nrf2 povećanjem produkcije ROS i stvaranjem oksidativne sredine (Liu i drugi, 2008; Yamada i drugi, 2009). Isti efekat Cd pokazan je u drugim *in vitro* (proksimalne tubule bubrega i vaskularne endotelne ćelije) i *in vivo* (korteks bubrega) (Chen i Shaikh, 2009; Nair i drugi, 2014; Shinkai i drugi, 2016) studijama. Pod normalnim

uslovima, Nrf2 se degraduje ubikvitinacijom u citoplazmi preko interakcije sa Keap1 inhibitorom (Itoh i drugi, 1999), međutim, povećanje koncentracije ROS pod delovanjem Cd vodi ka disocijaciji Nrf2-Keap1 kompleksa, ulaska Nrf2 u jedro i koordinisane aktivacije gena koji imaju ulogu u zaštiti ćelija (He i drugi, 2008), poput hemoksigenaze-1 (HO-1), čija je ekspresija iRNK u ovoj studiji takođe povećana kod EĆ oba soja nakon primene obe doze Cd. Povećanje Nrf2 kod jedinki AO soja može biti uzrok porasta nivoa GSH, jer je pokazano da se antioksidativna funkcija Nrf2 proteina manifestuje kroz povećanu ekspresiju  $\gamma$ -glutamilcistein sintaze, enzima bitnog za sintezu GSH (Steele i drugi, 2013). Sa druge strane, kod DA pacova povećan nivo Nrf2 proteina praćen je smanjenjem GSH, moguće usled poremećaja u regulaciji sinteze ovog molekula (Lu, 2013). Viši nivoi Nrf2 u svim Cd grupama AO pacova u poređenju sa DA pacovima, mogu biti odgovorni za dodatno povećanje antioksidativnih funkcija ovog molekula (Talalay i drugi, 2003) u ovom soju.

Poznato je da Cd može da indukuje apoptozu ili nekrozu ćelija, u zavisnosti od modela, puta i doze izlaganja ovom metalu (Wang i drugi, 2017). Povećana ekspresija gena za Bax i Bcl-2 (obe doze Cd) zapažena je kod AO pacova, sugerišući da Cd indukuje pro-apoptotske i anti-apoptotske signale, redom, u ovom soju. Ipak, povećanje Bax/Bcl-2 odnosa, kao i aktiviranih formi kaspaze (casp)-3 i njenog supstrata PARP, ključnog proteina za odigravanje apoptoze (Chaitanya i drugi, 2010), pokazuje da Cd dovodi do apoptoze kod AO soja nakon primene više (50 ppm) doze Cd. Povećana apoptoza kod AO pacova u skladu je sa drugim studijama koje povezuju apoptozu sa stres odgovorom ćelija na Cd (Nair i drugi, 2014; Galan i drugi, 2001), kao mehanizam uklanjanja trajno oštećenih ćelija (Martindale i Holbrook, 2002; Qu i drugi, 2007). Naime, Cd dovodi do oslobađanja jona gvožđa (Belyaeva i drugi, 2008; Pathak i Khandelwal, 2006; Dorta i drugi, 2003; Yeh i drugi, 2009), koji dalje Fentonovom reakcijom vode ka produkciji ROS unutar ćelije (Harrison i Arosio, 1996), uzrokujući nepovratna oštećenja ćelijskih organela i smrt same ćelije (Thevenod i Lee, 2013). Takođe, pokazano je u *in vivo* i *in vitro* studijama da Cd može da dovede do apoptoze ćelija u testisima (Cherkasov i drugi, 2006), bubrezima (Komoike i drugi, 2012), jetri (Cannino i drugi, 2009), imunskom sistemu (Tsangaris i Tzortzotou-Stathopoulou, 1998) i mišjim fibroblastima kože (Wang i drugi, 2017), kao i da apoptoza inflamatornih ćelija može predstavljati mehanizam manje osetljivosti pacova AO soja na inflamaciju (Lukic i drugi, 2001). Sa druge strane, nepromenjen odnos iRNK za Bax i Bcl-2 (Bax/Bcl-2) i izostanak promena u PARP (engl. poly(ADP-ribose) polymerase) proteinu, ukazuju na odsustvo procesa apoptoze kod jedinki DA soja. Povećan nivo sećene casp-3, bez aktivacije PARP, sugerišu na inhibiciju aktivacije casp-3 u ovom soju (Silke i drugi, 2001; Shi, 2004). Usled odsustva apoptotskog odgovora kod DA soja, ispitane je nekroza kao još jedan mehanizam delovanja Cd (Blanco i drugi, 2007; Messner i drugi, 2012), merenjem oslobađanja laktat dehidrogenaze (LDH) iz EĆ koji se koristi kao marker nekroze (Burd i Usategui-Gomez, 1973). Međutim, nisu zapažene promene u nivou LDH kod ovog soja pacova, kao ni kod AO soja. Moguće da je kod DA pacova oralni unos Cd izazvao drugi tip ćelijske smrti, kao što je pokazano u *in vitro* studiji na ćelijskoj liniji bubrega pacova gde je tretman Cd doveo do partanatoze (Luo i drugi, 2017), programirane ćelijske smrti različite od apoptoze (David i drugi, 2009). Takođe, niska apoptotska aktivnost, sa nepromenjenom ekspresijom pro-apoptotskih i anti-apoptotskih gena, zapažena je u mišjim splenocitima nakon *in vitro* izlaganja Cd, i povezana je sa visokim nivoom oksidativnog stresa tj visokim nivoom ROS (Chatterjee i drugi, 2009).

Oralni tretman kadmijumom doveo je do povećane ekspresije gena za nuklearni receptor AHR (engl. Aryl hydrocarbon receptor) u EĆ DA (5 ppm i 50 ppm Cd) i AO (50 ppm Cd) pacova, koji učestvuje u održavanju homeostaze kože (Furue i drugi, 2014) kao i detoksifikaciji ksenobiotika, poput Cd (Anwar-Mohamed i drugi, 2009; Rowlands i Gustafsson, 1997). Dodatno, Cd je ispoljio diferencijalni efekat (povećanja ekspresija gena za CYP1B1 i smanjena za CYP1A1 kod DA na 5 ppm i 50 ppm, a kod AO na 50 ppm Cd) na ekspresiju gena koji se nalaze pod kontrolom AHR. Povećana ekspresija gena za AHR i CYP1B1 u skladu je sa studijama u kojima je pokazana aktivacija AHR puta nakon tretmana Cd, *in vitro* na ćelijskoj liniji jetre (Hepa 1c1c7)

(Elbekai i El-Kadi, 2007) i *in vivo* na uterusu i tankom crevu (Kluxen i drugi, 2012, 2013). Iako je povećana ekspresija AHR i CYP1B1 zapažena kod oba soja, veća ekspresija kod AO pacova (u poređenju sa DA pacovima) može biti posledica izraženije zaštitne uloge AHR kod ovog soja, s obzirom da ovaj receptor učestvuje u regulaciji, tj. smanjenju inflamatornih stanja kože (Di Meglio i drugi, 2014). Smanjena ekspresija gena za CYP1A1 u skladu je sa studijama koje su pokazale da Cd smanjuje ekspresiju ovog gena u uterusu (Kluxen i drugi, 2012), tankom crevu (Kluxen i drugi, 2013) i bubrežima (Elbekai i El-Kadi, 2007), uprkos nepromenjenoj (Kluxen i drugi, 2013) ili povećanoj (Kluxen i drugi, 2012) ekspresiji AHR. Ovakvi rezultati sugerišu da efekat Cd na AHR i gene povezane sa ovim receptorom, zavisi od doze i dužine izloženosti Cd, tipa ciljnih ćelija (Kluxen i drugi 2012, 2013), kao i soja (Kiyohara i drugi, 1996, 1998).

## 5.7. Efekat oralnog unosa Cd na imunsku aktivnost epidermih ćelija

Oralna primena Cd dovela je do povećane ekspresije iRNK za proinflamatorne citokine IL-6, TNF- $\alpha$  (viša doza Cd) i IL-1 $\beta$  (obe doze Cd) u EĆ DA pacova, što je bilo praćeno povećanom spontanom produkcijom njihovih proteinskih produkata, za razliku od AO pacova kod kojih nisu zapažene ovakve promene. Ovi rezultati pokazali su da je proinflamatorni potencijal Cd na EĆ zavistan od soja (dovodi do proinflamatornog odgovora samo kod DA soja), kao što je zapaženo i u drugim studijama na različitim tkivima (Knoflach i drugi, 2011; Kundu i drugi, 2009; Hsu i drugi, 2009; Stosic i drugi, 2010; Ninkov i drugi, 2016), gde je ovaj metal direktno stimulisao produkciju citokina (Hyun i drugi, 2007; Lag i drugi, 2010; Kayama i drugi, 1995a). Povećana proinflamatorna aktivnost epiderma verovatno potiče od keratinocita, za koje je pokazano da imaju sposobnost produkcije ovih citokina usled brojnih stimulusa (Grone, 2002) uključujući i metale (Ermolli i drugi, 2001; Schmalz i drugi, 1998). Pored direktnog efekta Cd, inflamatorni odgovor EĆ može biti posledica i indirektnog delovanja ovog teškog metala (Kayama i drugi, 1995a), remećenjem antioksidativne odbrane i aktivacije redoks osetljivih TF, kao što su NF- $\kappa$ B i AP-1 (Chen i Shi, 2002; Morgan i Liu, 2011; Daffada i drugi, 1994) uključenih u aktivaciju gena za proinflamatorne citokine. Tako se inflamatorni odgovor kod DA pacova može povezati sa smanjenjem GSH u EĆ, kao što je pokazano u drugim studijama gde je tretman Cd doveo do smanjenja antioksidativnih molekula i razvoja inflamacije (Kirschvink i drugi, 2006). Izostanak inflamatornog odgovora u EĆ AO pacova nakon tretmana Cd, rezultat je njihove manje osetljivosti na toksične efekte, što je pokazano u različitim modelima inflamatornih bolesti (Miljkovic i drugi, 2006; Kovacevic-Jovanovic i drugi, 2015). Da nepromenjena produkcija proinflamatornih citokina od strane EĆ AO soja nije posledica citotoksičnog efekta Cd na ove ćelije, potvrdila je analiza procentualne zastupljenosti vijabilnih EĆ pomoću tripan plavog, kao i metaboličke vijabilnost MTT testom.

Pored efekta na proinflamatorne citokine, Cd je ispoljio efekat na antiinflamatorni citokin IL-10, jer je primena više doze Cd dovela do povećane produkcije ovog citokina (kao i genske ekspresije) od strane EĆ oba soja pacova, a niže doze samo kod AO soja. Pored keratinocita (Gasim i drugi, 1998) i Langerhansove ćelije (LĆ) (Flacher i drugi, 2006) mogu da produkuju ovaj citokin. Naime, Cd može direktno da dovede do aktivacije antiinflamatornih citokina uporedo sa aktivacijom proinflamatornih citokina, kao što je pokazano u studiji na epitelnim ćelijama pluća čoveka (Odewumi i drugi, 2016). Veća produkcija IL-10 (na nižoj dozi), kao i veća ekspresija gena kod AO soja pacova u poređenju sa DA pacovima, može se dovesti u vezu sa odsustvom proinflamatornog odgovora (nepromenjena produkcija IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ), jer IL-10 može da deluje kao snažan inhibitor proinflamatornih citokina (de Waal Malefyt i drugi, 1991; Akdis i Blaser, 2001; Iyer i Cheng, 2012). Svakodnevno subkutano injeciranje IL-10 (8  $\mu$ g/kg) tokom 24 dana, suprimira inflamaciju kod pacijenata sa psorijazom (Asadullah i drugi, 1998). Dodatno,

pokazano je da je ACI soj (engl. August Copenhagen Irish) pacova sa većom bazalnom ekspresijom IL-10 u oku, otporniji na razvoj inflamacije u ovom organu i autoimunskog eksperimentalnog uveitisa (Sun i drugi, 2000).

Na prisustvo niže doze Cd (5 ppm), EĆ DA soja pacova odgovorile su povećanom ekspresijom inducibilne azot-oksida sintaze (iNOS) i posledičnom produkcijom azot-oksida (NO), što je pokazano i u *in vitro* studiji gde je izlaganje Cd (0.6  $\mu$ M) dovelo do povećane produkcije NO u J774A.1 ćelijskoj liniji MF (Hassoun i Stohs, 1996), kao i u *in vivo* studijama na jetri, srcu i testisima (Chen i drugi, 2003). Sa druge strane kod AO pacova nisu uočene ovakve promene. Poznato je da iNOS predstavlja enzim koji katalizuje nastanak azot-oksida (NO), i već dugo vremena svrstan je u medijatore inflamacije (Knowles i Moncada, 1994). S obzirom da je pokazano da IL-1 $\beta$  stimuliše produkciju NO (Lichten i drugi, 2009), moguće je da je ovaj citokin doprineo povećanju NO kod DA pacova, dok je sa druge strane izostanak ovog citokina u EĆ AO pacova odgovoran za nepromenjenju produkciju NO kod ovog soja. Inhibicija iNOS od strane više doze Cd kod DA soja pacova, u skladu je sa studijom na ćelijskoj liniji (epitelnoj) creva (Cavicchi i drugi, 2000) nakon inkubacije ćelija sa visokim dozama CdCl<sub>2</sub> (10-40  $\mu$ M).

Kako bi ispitali da li Cd može da ispolji diferencijalni efekat na pripremu EĆ dva soja pacova za odgovor na *in vitro* egzogeni (inflamatorni), kultivisali smo EĆ sa 100 ng/ml lipopolisaharida (LPS), endotoksina gram negativnih bakterija za koji je pokazano da poseduje proinflamatorni potencijal (Bliss i drugi, 1998). Međutim, EĆ na ovakav dodatni stimulus generalno nisu odgovorile dodatnim povećanjem produkcije citokina, ukazujući na neresponsivnost ovih ćelija. Zapaženo je povećanje samo IL-6 nakon LPS-stimulacije kod AO pacova (na 50 ppm Cd), sugerišući da je za izazivanje inflamatornog odgovora od strane EĆ ovog soja verovatno potreban dodatni stimulus (pored Cd), bar za IL-6. Izostanak odgovora EĆ, u smislu produkcije citokina, nakon primene 100 ng/ml LPS-a pokazana je i u drugim studijama (Lebre i drugi, 2007; Kollisch i drugi, 2005).

Dalje smo EĆ kultivisali sa *S. epidermidis*, jednom od najzastupljenijih komensalnih bakterija kože (Otto, 2009) koja u uslovima narušene funkcionalnosti epidermne barijere može da izazove infekciju (Nguyen i drugi, 2017) i za koju je pokazano da poseduje proinflamatorni potencijal *in vitro* (Dong i drugi, 2019; Megyeri i drugi, 2002). EĆ izolovane iz životinja tretiranih sa Cd, odgovorile su povećanom produkcijom proinflamatornih citokina IL-1 $\beta$ , IL-6 (50 ppm Cd) i TNF- $\alpha$  (obe doze Cd) nakon stimulacije sa *S. epidermidis* kod AO pacova, praćeno smanjenom produkcijom IL-10. Ovi rezultati pokazuju da oralni tretman Cd može da pripremi EĆ AO soja za odgovor na dodatni stimulus (sam tretman Cd nije bio dovoljan da izazove odgovor) i produkciju proinflamatornih citokina, utičući tako na homeostatske mehanizme kože. Sa druge strane, nepromenjena produkcija ovih citokina kod DA pacova, sugerise da stimulacija EĆ sa *S. epidermidis*, nije dovoljna da dodatno poveća proinflamatorni odgovor prethodno potaknut oralnim unosom Cd kod ovog soja.

Kako bi dodatno ispitali aktivnost EĆ nakon oralnog unosa Cd, analizirali smo potencijal ovih ćelija da stimulišu T ćelije u kokulturi, kao *in vitro* testom koji se koristi za ispitivanje komunikacije ovih ćelija u inflamatornim bolestima kože (Orlik i drugi, 2019). U kokulturi naivnih limfocita (izolovanih iz dLČ netretiranih životinja) sa EĆ kontrolnih i tretiranih životinja ispitana je produkcija inflamatornih citokina. Tako je kod DA pacova došlo do povećane produkcije IL-17 i IFN- $\gamma$  u kokulturi, dok je ovakav odgovor izostao kod pacova AO soja ukazujući na sojne razlike u potencijalu EĆ da stimulišu limfocite nakon delovanja Cd. Kako je poznato da su IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  uključeni u aktivaciju T ćelija koji proizvode IFN- $\gamma$  i IL-17 (Johansen i drugi, 2011; Lai i Dong, 2016; Onderdijk i drugi, 2015) u mnogim bolestima kože poput psorijaze (Lowes i drugi, 2008; Ho i Kupper, 2019) i kontaktnog dermatitisa (Suto i drugi, 2018), zapažene razlike u stimulatornom potencijalu EĆ verovatno su posledica različitog citokinskog odgovora na prisustvo Cd (kao što je gore diskutovano). Viša doza Cd dovela je do povećanja nivoa IL-6 u EĆ DA soja



nakon stimulacije sa ConA, produkovanog verovatno od strane infiltriranih T ćelija (Toshitani i drugi, 1993; Scheller i drugi, 2011), sudeći po studijama gde je pokazano da se ovaj citokin produkuje u koži tokom inflamacije i atopijskog dermatitisa od strane T ćelija periferne krvi, kao i samih keratinocita epiderma u različitim patološkim stanjima kože (Neuner i drugi, 1991; de Vos i drugi, 1994; Goodman i drugi, 2009). Naime, poznato je da IL-6 učestvuje u usmeravanju naivnih T ćelija ka IL-17 produkujućim ćelijama (Bettelli i drugi, 2006; Acosta-Rodriguez i drugi, 2007), što je verovatno uticalo na povećanu produkciju ovog citokina u kokulturi EĆ i limfocita. Na povećanje produkcije IFN- $\gamma$  i IL-17 u kokulturi DA soja verovatno su doprinele i same EĆ, jer je značajno povećanje produkcije IL-17 (50 ppm) i IFN- $\gamma$  (50 i 50 ppm) zabeleženo nakon primene Cd. Produkciji IL-17 od strane EĆ mogu doprineti rezidentne  $\gamma\delta$  T ćelije (MacLeod i drugi, 2013; Cua i Tato, 2010) epiderma, ali i sami keratinociti za koje je pokazano da u psorijazi mogu da produkuju IL-17 (IL-7E formu), čime dalje aktiviraju MF derma da produkuju proinflamatorne citokine poput TNF- $\alpha$ , i privlače druge imunske ćelije, poput mast ćelija i neutrofila u kožu (Lin i drugi, 2011; Senra i drugi, 2016). Sa druge strane, rezidentne T ćelije epiderma ili T ćelije koje su infiltrirale u epiderm mogu biti odgovorne za povećanu spontanu produkciju IFN- $\gamma$  (Ho i Kupper, 2019) od strane EĆ DA pacova. Dodatno povećanje IFN nakon dodavanja ConA govori u prilog ovoj pretpostavci. Dodatno, povećana produkcija IL-10 kod DA pacova može se povezati sa povećanom produkcijom IFN od strane EĆ, jer je pokazano da je produkcija IL-10 uglavnom praćena visokim nivoom IFN- $\gamma$ , kao mera zaštite od neograničenog inflamatornog, imunskog odgovora (Jankovic i drugi, 2007; Saraiva i drugi, 2009). Sa druge strane, veći stimulatorni potencijal EĆ AO soja u kokulturi naivnih limfocita i EĆ pokazan je u produkciji antiinflamatornog citokina IL-10, što je moglo dovesti do supresije produkcije proinflamatornih citokina kod ovog soja, kao što je pokazano u hroničnim infekcijama kože (Jankovic i drugi, 2007; Anderson i drugi, 2007). Regualcija IFN- $\gamma$  i IL17 od strane IL-10 pokazana je i u ranijim studijama (Fiorentino i drugi, 1991; de Waal Malefyt i drugi, 1991). Moguće je da je povećanoj produkciji IL-10 u kokulturi doprinela i produkcija ovog citokina od strane samih EĆ.

Pored EĆ, ispitan je citokinski odgovor dermni ćelija (DĆ) kože nakon oralnog unosa Cd. Kod oba soja pacova DĆ nisu odgovorile na prisustvo Cd produkcijom proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6), izuzev povećanjem TNF- $\alpha$  (obe doze Cd) kod DA soja, koji može biti produkovan od strane makrofaga, mast ćelija, fibroblasta i T ćelija (Smookler i drugi, 2006; Bonneville i drugi, 2010). Povećanje TNF- $\alpha$  kod DA soja uprkos izostanku deponovanja metala (5 ppm) u dermu, može se povezati sa efektom Cd na proinflamatorni odgovor keratinocita, kako je poznato da ove ćelije oslobađanjem proinflamatornih citokina (pe svega IL- $\beta$  i TNF- $\alpha$ ) mogu da pokrenu inflamatornu kaskadu u koži (Freedberg i drugi, 2001; Pasparakis i drugi, 2014). Dodatno, povećanje TNF- $\alpha$  može se povezati i sa smanjenjem IL-10 (50 ppm Cd) kod jedinki DA soja, s obzirom da je pokazano da subkutana primena IL-10 inhibira produkciju TNF- $\alpha$  kod pacijenata obolelih od psorijaze (Asadullah i drugi, 1998). Veći inflamatorni odgovor EĆ DA soja (produkcija citokina), ukazuje na njihovu veću osetljivost na prisustvo Cd u koži u poređenju sa DĆ.

## 5.8. Efekat oralnog unosa Cd na limfne čvorove (saLČ) kože

Oralni unos obe doze Cd doveo je do dozno-zavisnog povećanja nivoa ovog metala u limfnim čvorovima koji dreniraju dorzalnu kožu, kod oba soja pacova. Kako se koža na dorzalnoj strani tela drenira preko saLČ (Lengele i drugi, 2007), u ovim limfnim tkivima detektovan je sličan nivo deponovanja Cd kao i u koži. Međutim, iako se Cd deponovao u saLČ, ni kod jednog soja Cd nije ispoljio svoj efekat na broj ćelija, njihovu metaboličku vijabilnost i produkciju inflamatornih citokina (IFN- $\gamma$  i IL-17), spontanu kao ni ConA-stimulisanu. Ovakvi rezultati sugerišu da saLČ nisu uključeni u odgovor kože na Cd i da su ćelije kože osetljivije na delovanje Cd u poređenju sa

ćelijama drenirajućim limfnim ćvorovima, uzimajući u obzir sličan nivo deponovanja Cd u dva kompartmana.

## 5.9. Efekat oralnog unosa Cd na reaktivnost kože nakon nanošenja DNCB

U ovom radu, dalje je ispitan efekat oralne primene Cd na imunsku reaktivnost kože nakon nanošenja haptena (mali molekuli koji svojstvo imunogenosti stiću tek nakon vezivanja za veće proteinske nosaće (Murphy i Weaver, 2012), 2,4-dinitrohlorobenzena (DNCB), u fazi senzibilizacije (aferentna faza) kontaktne preosetljivosti (KP), i koji se pored oksazolona najčešće koristi za senzibilizaciju eksperimentalnih životinja (Al-Otaibi i Alqahtani, 2015).

U fazi senzibilizacije nakon prodora haptena u epitel kože i vezivanja za proteinske nosaće domaćina (Lepoittevin i Karlberg, 1994; Lepoittevin, 2006), dolazi do prepoznavanja haptent-protein kompleksa od strane LĆ, aktivacije i sazrevanja ovih ćelija u antigen-prezentujuće ćelije (APĆ), pod delovanjem citokina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  produkovanih od strane LĆ i keratinocita, redom (Enk i Katz, 1992, 1995; Anderson i drugi, 2011), i njihove migracije u dLĆ kože (Cumberbatch i Kimber, 1995; Cumberbatch i drugi, 1997; Kabashima i drugi, 2003; Yamamoto i drugi, 2007) gde vrše prezentaciju haptena naivnim T ćelijama (Divkovic i drugi, 2005). Nepromenjena procentualna zastupljenost vijabilnih ćelija, uz povećanje MTT testa (0h) kod životinja DA i AO soja, koje su nakon oralnog unosa Cd senzibilisane DNCB-om (0.4% DNCB+50ppm Cd), sugerise da Cd može da poveća metaboličku aktivnost EĆ kože. U ovoj studiji zapažena je povećana spontana produkcija TNF- $\alpha$  od strane EĆ izolovanih iz jedinki DA i AO soja pacova koji su pili Cd (0.4% DNCB+5ppm i 50ppm Cd), u poređenju sa ćelijama izolovanim iz kontrolnih senzibilisanih jedinki (0.4% DNCB+0ppm Cd), kao i antiinflamatornog citokina IL-10 samo kod AO soja pacova (0.4% DNCB+5ppm Cd), dok je produkcija IL-1 $\beta$  ostala nepromenjena kod oba soja. Iako je pokazano da topikalno nanošenje DNCB-a dovodi do povećanja nivoa TNF- $\alpha$  u koži (Holliday i drugi, 1997), veći nivo produkcije ovog citokina od strane EĆ izolovanih iz životinja tretiranih sa Cd i DNCB (u poređenju sa 0.4% DNCB+0ppm Cd), ukazuje da ovaj metal može da poveća responsivnost EĆ na nanošenje spoljašnjeg stimulusa kao što je DNCB. Izostanak efekta Cd na produkciju IL-1 $\beta$  (meren 24h nakon izazivanja senzibilizacije) nakon primene DNCB-a (0.4% DNCB+5ppm i 50 ppm Cd), verovatno je posledica toga što se ovaj citokin proizvodi ubrzo nakon nanošenja haptena (Enk i Katz, 1992; Enk i drugi, 1993), prema studiji Enk i Katz (1995) već nakon 15 minuta, dovodeći do migracije haptent-specifičnih LĆ iz kože u dLĆ (Macatonia i drugi, 1996). Hope i drugi (1994) su pokazali da se IL-1 $\beta$  tokom senzibilizacije proizvodi od strane LĆ u dLĆ kože već tokom prvih 12h, a da se 24h nakon nanošenja haptena (dicikloheheksilmetan-4,4-diizocijanat, HMDI) nivo produkcije ovog citokina vraća na nivo kontrola. Nepromenjeni nivo produkcije antiinflamatornog citokina IL-10 od strane EĆ senzibilisanih DA jedinki, ukazuje da Cd svoj efekat ne ostvaruje delovanjem na ovaj citokin u fazi senzibilizacije reakcije KP. Sa druge strane, kod jedinki AO soja, zajedno sa povećanjem TNF- $\alpha$  zapažen je i povećan nivo IL-10 (0.4% DNCB+5ppm Cd), verovatno kao mehanizam izbegavanja prekomerne aktivacije ćelija na prisustvo haptena, sugerisući na bolju regulaciju odgovora EĆ ovog soja.

Dalje je ispitan odgovor ćelija u dLĆ kože, mesta gde dolazi do aktivacije haptent-specifičnih T ćelija u fazi senzibilizacije reakcije KP (Robert i Kupper, 1999). Naime, nakon prezentacije haptena, ekspimiranih na površini dendritskih ćelija (u sklopu MHC molekula I i II klase), naivnim haptent-specifičnim T ćelijama u dLĆ, dolazi do njihove aktivacije i proliferacije (Bour i drugi, 1995; Divkovic i drugi, 2005), produkcije proinflamatornih citokina IFN- $\gamma$  i IL-17 (Nguyen i drugi, 2011) i ulaska ovih ćelija u cirkulaciju čime se završava faza senzibilizacije (Picker i drugi, 1990).

Tretman Cd doveo je do povećane spontane produkcije IFN- $\gamma$  (0.4% DNCB+5ppm Cd) i IL-17 (0.4% DNCB+50ppm Cd), samo od strane ćelija saLČ senzibilisanih (24h nakon nanošenja DNCB-a) DA pacova, u poređenju sa kontrolnom grupom (0.4% DNCB+0ppm Cd), dok su nivoi ovih citokina ostali nepromenjeni kod jedinki AO soja. Produkcija IFN- $\gamma$  od strane ćelija dLČ, citokina neophodnog za razvoj efektorskih ćelija u KP, a kasnije i IL-17, pokazana je nakon primene dinitrofluorebenzena (DNFB) (He i drugi, 2006), kao i nakon topikalnog nanošenja DNCB-a koje je dovelo do povećanja T ćelija u perifernoj krvi i stimulacije proinflamatornog T<sub>H</sub>1 odgovora nakon senzibilizacije (Stricker i drugi, 1997; Traub i drugi, 1997; Yoshizawa drugi, 1999, 2000). Ovi rezultati pokazuju da oralni unos Cd povećava produkciju citokina (IFN- $\gamma$  i IL-17) bitnih za aktivaciju efektorskih ćelija u fazi senzibilizacije (Kish i drugi, 2009). Iako je pokazano da DNBS (10  $\mu$ g/ml), analog DNCB-a rastvorljiv u vodi, može da *ex vivo* izazove povećanu produkciju citokina od strane ćelija saLČ životinja senzibilisanih sa 0,4% DNCB (hapten specifična produkcija) (Popov Aleksandrov i drugi, 2015), odsustvo ovog efekta na ćelijama saLČ DA životinja koje su pile Cd (nepromenjeni indeksi stimulacije), a kod kojih je zabeležena veća spontana produkcija citokina, može da bude posledica dostizanja platoa reakcije, koja nije mogla da bude dodatno podstaknuta primenom DNBS-a. Kako je kod AO životinja tretiranih Cd zapaženo odsustvo odgovora saLČ u odnosu na kontrolne senzibilisane životinje 24 časa nakon nanošenja haptena, uprkos povećanoj reaktivnosti ćelija kože, analizirana je aktivnost saLČ ćelija 72h nakon senzibilizacije, kako bi se ispitala potencijalno odložena aktivnost ćelija saLČ AO. Naime, pokazano je da je reakcija na DNCB u dLČ kože u fazi senzibilizacije intenzivnija 3. dana u poređenju sa 1. danom (24h) i kod DA i AO soja pacova (Popov i drugi, 2011). Međutim, kod AO pacova koji su pili Cd ni 72h nakon nanošenja haptena nije došlo do promena u spontanoj i hapten-specifičnoj produkciji IFN- $\gamma$  i IL-17 u saLČ, sugerišući odsustvo aktivacije hapten-specifičnih efektorskih T ćelija u fazi senzibilizacije kod ovog soja.

Kako je poznato da nakon senzibilizacije miševa sa DNFB dolazi do povećanja iRNK za IL-10 u dLČ kože (Fujisawa i drugi, 1996), dalje je ispitana produkcija ovog antiinflamatornog citokina. Povećanje spontane produkcije IL-10 kod AO pacova (0.4% DNCB+5ppm i 50 ppm Cd) tokom faze senzibilizacije (24h i 72h), može se povezati sa nepromenjenom produkcijom IFN- $\gamma$  i IL-17 nakon delovanja Cd, jer je poznato da je IL-10 inhibitor produkcije T<sub>H</sub>1 odgovora (Trinchieri, 2007) i produkcije IL-17 (Gu i drugi, 2008). Takođe, sa nepromenjenom produkcijom IFN- $\gamma$  i IL-17 u saLČ može se povezati i povećanja produkcija IL-10 (spontana) od strane EĆ AO soja pacova koji su pili Cd (u fazi senzibilizacije), jer je pokazano da IL-10 ostvaruje inhibicioni efekat na migraciju dendritskih ćelija u dLČ, u kojima se vrši aktivaciju naivnih hapten-specifičnih T ćelija (Wang i drugi, 1999c). Nepromenjena spontana produkcija IL-10 (24h i 72h) kod DA soja pacova nakon primene Cd (0.4% DNCB+5ppm i 50 ppm Cd), uz povećanje IFN- $\gamma$  (24h i 72h) i IL-17 (24h), ukazuje dodatno na jaču inflamatornu aktivnost ćelija saLČ nakon primene Cd u ovom soju pacova. Sa druge strane, indeksi stimulacije za IL-10 (DNBS/spontana produkcija) pokazali su pad u hapten-specifičnoj produkciji ovog citokina kod oba soja (0.4% DNCB+5ppm i 50ppm Cd) 24h nakon senzibilizacije, uz nepromenjenju hapten-specifičnu produkciju (indeksi stimulacije) IFN- $\gamma$  i IL-17 kod ovih sojeva, a kod jedinki AO soja i nakon 72h, ukazujući na inhibiciju pri odgovoru ovih ćelija na DNBS stimulaciju, nakon oralnog unosa Cd. Nepromenjeni nivoi MTT testa u kulturi kod tretiranih (DNCB+Cd) u poređenju sa kontrolnim (DNCB) životinjama, ukazuju da pokazani efekat Cd na produkciju citokina nije bio posledica njegovog delovanja na metaboličku vijabilnost ćelija. Iz ovih rezultata možemo da zaključimo da, uprkos povećanoj produkciji citokina u koži kod oba soja pacova, tretman Cd dovodi do aktivacije proinflamatornog odgovora ćelija saLČ samo kod DA pacova.

Senzibilizacija kože i aktivacija hapten-specifičnih T ćelija predstavljaju preduslov za ekspresiju reakcije kontaktne preosetljivosti (faza elicitacije), koja se izaziva nakon ponovnog nanošenja DNCB-a kod životinja koje su prethodno senzibilisane istim haptenom, kao životinjskog

modela alergijskog kontaktnog dermatitisa (AKD) (Krasteva i drugi, 1999) ali i modela koji se koristi za testiranje imunotoksičnog potencijala ksenobiotika (EPA, 2003) kod miševa (Zhang i drugi, 2009; Kim i drugi, 2014) i pacova (Popov i drugi, 2011; Popov Aleksandrov i drugi, 2015). Da bi ispitali da li oralna primena Cd menja ekspresiju reakcije KP kod pacova, 5 dana nakon senzibilizacije životinje su elicirane sa 0.13% DNCB-om, i nakon 24h ispitan je odgovor ćelija uva i aLČ. Poznato je da u ranoj fazi elicitanje dolazi do jakog priliva ćelija urođene imunosti u kožu, mast ćelija (Dudeck i drugi, 2011; Otsuka i drugi, 2011) i neutrofila (Biedermann i drugi, 2000), čija aktivacija vodi ka infiltraciji haptenspecifičnih T ćelija u epiderm i derm kože, u toku prvih 24h nakon ponovne primene haptena (Honda i drugi, 2013). Oslobođanje citokina i hemokina od strane keratinocita dodatno doprinosi ulasku haptenspecifičnih T ćelija u tkivo kože gde je topikalno nanet haptenspecifični (Watanabe i drugi, 2007; Honda i drugi, 2013; Nakae i drugi, 2003).

Da oralno primenjen Cd utiče na ekspresiju reakcije KP, pokazano je usled većeg otoka uva, koji se koristi kao mera ekspresije reakcije KP (Gaspari i drugi, 2016) kod DA (obe doze Cd) i AO (viša doza Cd) soja pacova u poređenju sa otokom uva kontrolnih pacova koji nisu pili kadmijum (0.4/0.13% DNCB). Histopatološka analiza tkiva uva ukazala je na edem, praćen nekrozom i infiltracijom mononuklearnih ćelija i neutrofila kod oba soja pacova na višoj dozi (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) Cd, a samo kod DA pacova nakon primene niže doze (0.4/0.13% DNCB+5ppm Cd) ovog metala. Naime, poznato je da u fazi elicitanje KP dolazi do karakterističnog edema (otoka) uva usled infiltracije neutrofila (Dilulio i drugi, 1999; Engeman i drugi, 2004) koji su neophodni za dalje privlačenje leukocita na mesto nanošenja haptena (Kish i drugi, 2011), kao i drugih leukocita (He i drugi, 2009) bitnih za ekspresiju reakcije KP. Sa druge strane, tretman Cd doveo je do značajnog povećanja otoka uva čak i pri dozi DNCB-a (0.4/0.13%) koja u našim prethodnim istraživanjima nije dovela do značajnog povećanja otoka uva (Popov Aleksandrov i drugi, 2015). Povećan otok uva može se povezati sa efektom Cd na povećanu spontanu produkciju TNF- $\alpha$ , citokina bitnog za migraciju leukocita na mesto elicitanje (Petri i drugi, 2008), od strane ćelija uva kod DA pacova, nakon primene obe doze (0.4/0.13% DNCB+5ppm i 50ppm Cd), a kod jedinki AO soja samo nakon primene više doze (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) Cd, u odnosu na senzibilisane kontrole. Sa druge strane, produkcija IL-1 $\beta$  ostala je nepromenjena kod životinja koje su pile Cd u odnosu na kontrolne životinje kojima je samo nanet DNCB. Iako IL-1 $\beta$ , spada u citokine koji, zajedno sa TNF- $\alpha$ , mogu da se proizvode od strane keratinocita i LČ (Biedermann i drugi, 2000), kao i mast ćelija nakon infiltracije u derm, i koji su bitni za stimulaciju migracije haptenspecifičnih ćelija na mesto elicitanje (Watanabe i drugi, 2002; Honda i drugi, 2013; Nakae i drugi, 2003), nepromenjena produkcija IL-1 $\beta$  može se objasniti dinamikom odgovora oslobođanja ovih citokina u fazi elicitanje. Naime, IL-1 $\beta$  se proizvodi u koži u toku prvih nekoliko sati nakon nanošenja haptena u fazi ekspresije reakcije (Nakae i drugi, 2003) i opada nakon 24h (Hartmann i drugi, 2006). Pored IL-17 (He i drugi, 2006), IFN- $\gamma$  je glavni efektorski citokin (Wakabayashi i drugi, 2005; He i drugi, 2009) uključen u dalji priliv imunskih ćelija bitnih za otok uva, što je pokazano i nakon primene DNCB-a (Ulrich i drugi, 2001; He i drugi, 2006). Naime, 24h nakon elicitanje dolazi do produkcije IFN- $\gamma$  (Xu i drugi, 1997) i IL-17 (He i drugi, 2006) od strane CD8<sup>+</sup> T ćelija i IL-17 od strane pomoćničkih (efektorskih) CD4<sup>+</sup> T ćelija (Nakae i drugi, 2002), koji doprinose inflamaciji i oštećenju tkiva (Pennino i drugi, 2010). Tretman Cd povećao je broj CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija u tkivu uva, u grupama 0.4/0.13% DNCB+Cd (obe doze Cd kod DA pacova, viša doza kod AO pacova), kao i efektorsku aktivnost ovih ćelija u poređenju sa kontrolama (samo DNCB), sudeći po povećanju spontane produkcije i indeksa stimulacije (DNBS/spontana produkcija) za IFN- $\gamma$  (0.4/0.13% DNCB/+5ppm i 50ppm Cd) i IL-17 (0.4/0.13% DNCB/+50ppm Cd) kod DA soja pacova. Kod AO pacova uočena je samo haptenspecifična produkcija (DNBS/spontana produkcija) IFN- $\gamma$  i IL-17 nakon više doze (0.4/0.13% DNCB+50ppm Cd) Cd, što ukazuje da ovaj metal povećava reaktivnost ćelija uva tek nakon dodatne stimulacije haptenom. Dodatno, povećanje IFN- $\gamma$  (zajedno sa povećanjem TNF- $\alpha$ ), može se povezati sa povećanim otokom uva, jer kod miševa sa delecijom gena za ove citokine ne dolazi do razvoja faze elicitanje i edema tkiva uva (Wakabayashi

i drugi, 2005). Povećana produkcija IFN- $\gamma$  i IL-17 kod oba soja pacova, ukazuje da Cd u koži svoj efekat ostvaruje aktivacijom T<sub>H</sub>1/tip1 i T<sub>H</sub>17/tip17 imunskog odgovora, u fazi ekspresije reakcije KP. Nepromenjena vijabilnost i celularnost ćelija uva, ukazuju da pokazani efekti Cd na produkciju citokina nisu posledica njegovog delovanja na ove osnovne parametre aktivnosti.

Dalje je ispitan efekat Cd na aktivnost ćelija dLČ uva (aLČ), jer je pokazano da nakon elicitanje uva dolazi do infiltracije CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija u ove regionalne LČ (Larsen i drugi, 2007), produkcije IFN- $\gamma$  (Ishizaki i drugi, 2007) i IL-17 (Popov Aleksandrov i drugi, 2015), kao i migracije ovih ćelija na mesto elicitanje (Robert i Kupper, 1999). Oralni unos Cd nije doveo do promena u spontanoj produkciji citokina (IFN- $\gamma$ , IL-17 i IL-10) kod DA soja pacova, ali je zapaženo povećanje indeksa stimulacije (DNBS/spontana produkcija) za IFN- $\gamma$  (0.4/0.13% DNCB+5 ppm i 50 ppm Cd) i IL-17 (0.4% DNCB+5ppm Cd). Analiza broja ćelija u dLČ u fazi elicitanje ukazala je da tretman Cd kod DA pacova dovodi do povećanja broja CD8<sup>+</sup> ćelija (0.4% DNCB+5ppm Cd), a smanjena broja CD4<sup>+</sup> ćelija (0.4% DNCB+50ppm Cd). Kako je pokazano da se u fazi elicitanje u dLČ nalazi veći broj aktiviranih CD8<sup>+</sup> T ćelija u odnosu na CD4<sup>+</sup> T ćelije (Larsen i drugi, 2007), kao i da su ove ćelije glavne efektorske ćelije koje imaju sposobnost produkcije i IFN- $\gamma$  i IL-17 u dLČ (Xu i drugi, 1997; Cavani i drugi, 1998; He i drugi, 2006; Ishizaki i drugi, 2007), može se pretpostaviti da Cd kod DA soja pacova svoj efekat većim delom ostvaruje preko CD8<sup>+</sup> ćelija. Izostanak efekta više doze Cd na broj CD8<sup>+</sup> ćelija i smanjenje u pogledu broja CD4<sup>+</sup> ćelija kod ovog soja, verovatno su posledica pada celularnosti ćelija u aLČ nakon primene više doze Cd, moguće usled njihove povećane emigracije u tkivo uva ili smanjene migracije u aLČ. Sa druge strane, kod AO soja pacova zapažena je spontana povećana produkcija IFN- $\gamma$  (0.4% DNCB+50ppm Cd), a smanjena produkcija IL-10, uz povećan broj CD4<sup>+</sup> (0.4% DNCB+5ppm Cd) i CD8<sup>+</sup> ćelija (0.4% DNCB+50ppm Cd), dok je nakon stimulacije sa DNBS-om kod ovog soja zapaženo povećanje indeksa stimulacije za IL-17 (0.4% DNCB+5ppm Cd). Povećana produkcija IFN- $\gamma$  i IL-17 ukazuju na aktivaciju T<sub>H</sub>1/tip1 i T<sub>H</sub>17/tip17 odgovora ćelija dLČ u fazi elicitanje kod ovog soja. Povećana produkcija IFN- $\gamma$  može se povezati sa smanjenom produkcijom IL-10 kod AO soja, prirodnog regulatora ekspresije reakcije KP, jer je pokazano da subkutana primena IL-10 pre nanošenja haptena smanjuje efektorsku fazu KP (Ferguson i drugi, 1994). Manji broj CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija kod jedinki AO soja, verovatno je posledica manje celularnosti aLČ, ili manjeg broja CD25<sup>+</sup> ćelija kod ovog soja, kao što je pokazano u drugim studijama (Mostarica-Stojković i drugi, 1988; Popov Aleksandrov i drugi, 2015), u poređenju sa DA sojem. Analiza vijabilnosti ćelija aLČ kod oba soja pacova u ćelijskoj kulturi nije ukazala na promene nakon unosa Cd koje bi doprinele zapaženim citokinskim odgovorima ćelija ovog tkiva u fazi elicitanje.

Iz ovih rezultata možemo zaključiti da je oralni tretman Cd nakon topikalnog nanošenja DNCB-a doveo do aktivacije T<sub>H</sub>1/tip1 i T<sub>H</sub>17/tip17 odgovora već 24h nakon senzibilizacije kod DA soja pacova, dok je kod AO soja došlo do razvoja antiinflamatornog odgovora i produkcije IL-10. Sa druge strane, u fazi elicitanje oralna primena Cd je dovela do povećane ekspresije reakcije kod oba soja pacova, sudeći po povećanom otoku uva i povećanoj produkciji efektorskih citokina IFN- $\gamma$  i IL-17 u ovom tkivu, kao i do aktivacije T<sub>H</sub>1/tip1 i T<sub>H</sub>17/tip17 imunskih odgovora u dLČ uva. Naime, iako je poznato da je AO soj manje osetljiv na delovanje kseobiotika, dobijeni rezultati pokazuju da Cd može da poveća reaktivnost ćelija kože na dodatni zapaljenski stimulus (DNBS) čak i kod ovog soja, i dovede do probijanja zaštitnih mehanizama koji su se održavali kod ovog soja nakon oralnog unosa samog Cd, uzrokujući razvoj zapaljenske reakcije u ovom tkivu.

## **6. ZAKLJUČCI**

U skladu sa dobijenim rezultatima mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Oralni produženi unos Cd u dozama 5 ppm i 50 ppm na sistemskom nivou ne dovodi do promena u akutno-faznom i inflamatornom odgovoru periferne krvi kod oba soja pacova (nepromenjeni nivoa haptoglobina, fibrinogena i albumina, kao i citokina IL-6 i TNF- $\alpha$  u cirkulaciji).
2. Oralna primena Cd dovodi do dozno zavisnog povećanja deponovanja ovog metala u dlaci, ukupnoj koži, epidermu, saLČ, duodenumu, bubrezima i jetri (samo kod AO pacova), dok je povećanje u dermu zapaženo samo nakon primene više doze, kod oba soja pacova.
3. Uprkos sličnom nivou deponovanja u koži kod oba soja pacova, Cd svoj toksični efekat u ovom tkivu ostvaruje izazivanjem različitog obrasca i većeg intenziteta promena kod jedinki DA soja u poređenju sa AO sojem, tako što:

*Mereno u ukupnoj koži:*

- Uzrokuje infiltraciju ćelija i oštećenje tkiva kože DA soja pacova već pri nižoj dozi Cd
- Dovodi do promena u većem broju parametara oksidativnog stresa u homogenatima kože DA soja pacova
- Izaziva razvoj proinflamatornog odgovora u eksplantima organokulture kože kod DA soja, a antiinflamatornog odgovora kod AO soja pacova

*Mereno u izolovanim ćelijama kože:*

- Izaziva jači stres odgovor EĆ kod AO soja pacova
- Aktivira spontani proinflamatorni odgovor EĆ kod DA soja pacova
- Aktivira antiinflamatorni odgovor od strane EĆ AO soja kao potencijalni mehanizam zaštite, pri čemu stimulacija sa *S. epidermidis* dovodi do razvoja proinflamatornog odgovora (uz sniženje antiinflamatorne aktivnosti)
- Povećava proinflamatorni i antiinflamatorni potencijal EĆ kod jedinki DA i AO soja, redom, u kokulturi naivnih T limfocita izolovanih iz dLČ kože (netretiranih životinja) i EĆ izolovanih iz jedinki koje su pile Cd

4. Kadmijum koji u kožu dospeva oralnim putem, povećava imunsku reaktivnost kože nakon dodatnog zapaljenskog stimulusa, kontaktnog alergena haptena (DNCB), dovodeći do povećanja parametara reakcije KP kod DA (već nakon primene niže doze Cd) i AO pacova (samo nakon primene više doze Cd), tako što:

- U fazi senzibilizacije povećava proinflamatorni citokinski odgovor EĆ kod oba soja pacova (uz održavanje antiinflamatornog odgovora kod AO soja)
- U fazi senzibilizacije povećava TH1/tip1 i TH17/tip17 citokinski odgovor drenirajućih saLČ 24h i 72h nakon nanošenja DNCB-a samo kod DA soja pacova, dok odgovor ćelija AO soja nije potaknut ni nakon 72h
- U fazi elicitacije, povećava otok uva uz povećanu produkciju proinflamatornih citokina, kao i broj i produkciju efektorskih citokina ćelija uva i dLČ u ovom tkivu, kod oba soja pacova

Iz svega navedenog, može se zaključiti da uprkos sličnom deponovanju Cd, zabeležena veća oksidativna i inflamatorna aktivnost kod DA soja, već nakon primene niže doze Cd (uz veću prevalencu odgovora na višoj dozi Cd), kao i stimulacija citokina T ćelija (bitnih za razvoj inflamatornih/patoloških stanja kože) od strane EĆ, ukazuje na veću osetljivost ovog soja na dermatotoksične efekte Cd. Sa druge strane, ćelije AO soja mogu bolje da odgovore na toksične

efekte Cd u koži nakon njegovog oralnog unosa, angažovanjem zaštitinih mehanizama bez aktivacije proinlamatornog odgovora. Ipak, nakon topikalne primene dodatnog zapaljenskog stimulusa (DNCB) dolazi do razvoja inflamatornog ( $T_H1$ /tip1 i  $T_H17$ /tip17) odgovora kod oba soja pacova, sugerišući da kod AO pacova dolazi do probijanja zaštitnih mehanizama koji su se održavali nakon primene samog Cd, makar nakon primene više doze metala. Ova studija može biti korisna prilikom ispitivanja veze oralnog unosa Cd (putem vode i hrane) i različite osjetljivosti kože na razvoj zapaljenskih reakcija i patoloških stanja.



## **7. LITERATURA**

1. Abbas, A. K, Lichtman, A. H, Pillai, S. (2014a). Cells and tissues of the immune system. In: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 13-33.
2. Abbas, A. K, Lichtman, A. H, Pillai, S. (2014b). Cells and tissues of the immune system. In: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 13-34.
3. Abbas, A. K, Lichtman, A. H, Pillai, S. (2014c). Cells and tissues of the immune system. In: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 51-86.
4. Abbas, A. K, Lichtman, A. H, Pillai, S. (2014d). Cells and tissues of the immune system. In: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 213-229.
5. Abbas, A. K, Lichtman, A. H, Pillai, S. (2014e). Cells and tissues of the immune system. In: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 239-261.
6. Abel, J. i Haarmann-Stemmann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biological chemistry*, 391(11), 1235-1248.
7. Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature immunology*, 8(9), 942-949.
8. Adachi, T., Kobayashi, T., Sugihara, E., Yamada, T., Ikuta, K., Pittaluga, S., Saya, H., Amagai, M., Nagao, K. (2015). Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. *Nature medicine*, 21(11), 1272-1279.
9. Adams, D. (1975). The mucus barrier and absorption through the oral mucosa. *Journal of dental research*, 54(2), 19-26.
10. Afolabi, O. K., Oyewo, E. B., Adekunle, A. S., Adedosu, O. T., Adedeji, A. L. (2012). Impaired lipid levels and inflammatory response in rats exposed to cadmium. *EXCLI journal*, 11, 677-687.
11. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2008). Draft Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, U.S.A..
12. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2012). Toxicological Profile for Cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, U.S.A..
13. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2017). Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, U.S.A..
14. Aggarwal, S. i Gurney, A. L. (2002). IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *Journal of leukocyte biology*, 71(1), 1-8.
15. Agusa, T., Kunito, T., Iwata, H., Monirith, I., Tana, T. S., Subramanian, A., Tanabe, S. (2005). Mercury contamination in human hair and fish from Cambodia: levels, specific accumulation and risk assessment. *Environmental pollution*, 134(1), 79-86.
16. Ajani, J. A., Welch, S. R., Raber, M. N., Fields, W. S., Krakoff, I. H. (1990). Comprehensive criteria for assessing therapy-induced toxicity. *Cancer investigation*, 8(2), 147-159.
17. Akdis, C. A. i Blaser, K. (2001). Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology*, 103(2), 131-136.
18. Akesson, A., Berglund, M., Schütz, A., Bjellerup, P., Bremme, K., Vahter, M. (2002). Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status. *American journal of public health*, 92(2), 284-287.
19. Akiba, H., Kehren, J., Ducluzeau, M. T., Krasteva, M., Horand, F., Kaiserlian, D., Kaneko, F., Nicolas, J. F. (2002). Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *The Journal of Immunology*, 168(6), 3079-3087.

20. Albahary, C. (1972). Lead and hemopoiesis: the mechanism and consequences of the erythropathy of occupational lead poisoning. *The American journal of medicine*, 52(3), 367-378.
21. Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M. L., Girolomoni, G. (2005). Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Current Drug Targets-Inflammation and Allergy*, 4(3), 329-334.
22. Albanesi, C. (2010). Keratinocytes in allergic skin diseases. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 10(5), 452-456.
23. Ali, N., Zirak, B., Rodriguez, R. S., Pauli, M. L., Truong, H. A., Lai, K., Ahn, R., Corbin, K., Lowe, M. M., Scharschmidt, T. C., Taravati, K., Tan, M. R., Ricardo-Gonzalez, R. R., Nosbaum, A., Bertolini, M., Liao, W., Nestle, F. O., Paus, R., Cotsarelis, G., Abbas, A. K., Rosenblum, M. D. (2017). Regulatory T cells in skin facilitate epithelial stem cell differentiation. *Cell*, 169(6), 1119-1129.
24. Alloway, B. J. (2013). Heavy metals and metalloids as micronutrients for plants and animals. In *Heavy metals in soils*. Springer, Dordrecht, pp. 195-209.
25. Al-Otaibi, S. T. i Alqahtani, H. A. M. (2015). Management of contact dermatitis. *Journal of Dermatology and Dermatologic Surgery*, 19(2), 86-91.
26. Amara, S., Abdelmelek, H., Garrel, C., Guiraud, P., Douki, T., Ravanat, J. L., Favier, A., Sakly, M., Rhouma, K. B. (2008). Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. *Journal of Reproduction and Development*, 54(2), 129-134.
27. Amoruso, M. A., Witz, G., Goldstein, B. D. (1982). Enhancement of rat and human phagocyte superoxide anion radical production by cadmium in vitro. *Toxicology letters*, 10(2-3), 133-138.
28. Andersen, O., Nielsen, J. B., Svendsen, P. (1988). Oral cadmium chloride intoxication in mice: effects of chelation. *Toxicology*, 52(1-2), 65-79.
29. Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J., Sacks, D. (2007). CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine*, 204(2), 285-297.
30. Anderson, S. E., Siegel, P. D., Meade, B. J. (2011). The LLNA: a brief review of recent advances and limitations. *Journal of allergy*, 2011.
31. Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A. C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H., Tracey, K.J. (2000). High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *The Journal of experimental medicine*, 192(4), 565-570.
32. Angst, M. S., Clark, J. D., Carvalho, B., Tingle, M., Schmelz, M., Yeomans, D. C. (2008). Cytokine profile in human skin in response to experimental inflammation, noxious stimulation, and administration of a COX-inhibitor: a microdialysis study. *Pain*, 139(1), 15-27.
33. Ansari, M. M., Khan, H. A. (2015). Effect of cadmium chloride exposure during the induction of collagen induced arthritis. *Chemico-biological interactions*, 238, 55-65.
34. Anwar-Mohamed, A., Elbekai, R. H., El-Kadi, A. O. (2009). Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism. *Expert opinion on drug metabolism and toxicology*, 5(5), 501-521.
35. Arroyo, V. S., Flores, K. M., Ortiz, L. B., Gómez-Quiroz, L. E., Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2012). Liver and cadmium toxicity. *Journal of Drug Metabolism and Toxicology*, S5(001).
36. Asadullah, K., Sterry, W., Stephanek, K., Jasulaitis, D., Leupold, M., Audring, H., Volk, H. D., Docke, W. D. (1998). IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *The Journal of clinical investigation*, 101(4), 783-794.
37. Asagba, S. O., Isamah, G. K., Ossai, E. K., Ekakitie, A. O. (2002). Effect of oral exposure to cadmium on the levels of vitamin A and lipid peroxidation in the eye. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 68(1), 18-21.
38. Asagba, S. O. i Eriyamremu, G. E. (2007). Oral cadmium exposure alters haematological and liver function parameters of rats fed a Nigerian-like diet. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*, 16(3-4), 267-274.

39. Bae, D. S., Gennings, C., Carter Jr, W. H., Yang, R. S., Campaign, J. A. (2001). Toxicological interactions among arsenic, cadmium, chromium, and lead in human keratinocytes. *Toxicological Sciences*, 63(1), 132-142.
40. Bagchi, D., Vuchetich, P. J., Bagchi, M., Hassoun, E. A., Tran, M. X., Tang, L., Stohs, S. J. (1997). Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate [chromium VI] and cadmium chloride [cadmium II] to rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(3), 471-478.
41. Baginski, B. (1985). Effect of lead and cadmium on the viability and phagocytosis of human polymorphonuclear leukocytes. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale B, Hygiene*, 181(6), 461-468.
42. Balato, A., Unutmaz, D. i Gaspari, A. A. (2009). Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(7), 1628-1642.
43. Begović, J., Jovčić, B., Papić-Obradović, M., Veljović, K., Lukić, J., Kojić, M., & Topisirović, L. (2013). Genotypic diversity and virulent factors of *Staphylococcus epidermidis* isolated from human breast milk. *Microbiological Research*, 168(2), 77-83.
44. Belkaid, Y. i Harrison, O. J. (2017). Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity*, 46(4), 562-576.
45. Belyaeva, E. A., Dymkowska, D., Więckowski, M. R., Wojtczak, L. (2008). Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231(1), 34-42.
46. Bernard, A. (2004). Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. *Biometals*, 17(5), 519-523.
47. Bernard, A. (2008). Cadmium its adverse effects on human health. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 557-564.
48. Bernard, A. i Lauwerys, R. (1986). Effects of cadmium exposure in humans. In *Cadmium* (pp. 135-177). Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 135-177.
49. Bernier, J., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Tryphonas, H., Fournier, M. (1995). Immunotoxicity of heavy metals in relation to Great Lakes. *Environmental Health Perspectives*, 103(9), 23-34.
50. Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H., Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH 17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235-238.
51. Beutler, B., Cerami, A. (1986). Cachectin/tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation. *Immunologic research*, 5(4), 281-293.
52. Bhattacharyya, M. H., Whelton, B. D., Peterson, D. P., Carnes, B. A., Moretti, E. S., Toomey, J. M., Williams, L. L. (1988). Skeletal changes in multiparous mice fed a nutrient-sufficient diet containing cadmium. *Toxicology*, 50(2), 193-204.
53. Bi, X., Feng, X., Yang, Y., Qiu, G., Li, G. (2006). Quantitative assessment of cadmium emission from zinc smelting and its influences on the surface soils and mosses in Hezhang County, Southwestern China. *Atmospheric Environment*, 40(22), 4228-4233.
54. Biedermann, T., Kneilling, M., Mailhammer, R., Maier, K., Sander, C. A., Kollias, G., Kunkel, S. L., Hültner, L., Röcken, M. (2000). Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *The Journal of experimental medicine*, 192(10), 1441-1452.
55. Birgisdottir, B. E., Knutsen, H. K., Haugen, M., Gjelstad, I. M., Jenssen, M. T. S., Ellingsen, D. G., Thomassen, Y., Alexander, J., Meltzer, H. M., Brantsæter, A. L. (2013). Essential and toxic element concentrations in blood and urine and their associations with diet: results from a Norwegian population study including high-consumers of seafood and game. *Science of the total environment*, 463, 836-844.
56. Bitschar, K., Wolz, C., Krismer, B., Peschel, A., Schittek, B. (2017). Keratinocytes as

- sensors and central players in the immune defense against *Staphylococcus aureus* in the skin. *Journal of dermatological science*, 87(3), 215-220.
57. Black, A. P., Ardern-Jones, M. R., Kasprowicz, V., Bowness, P., Jones, L., Bailey, A. S., Ogg, G. S. (2007). Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *European journal of immunology*, 37(6), 1485-1493.
  58. Blanco, A., Moyano, R., Vivo, J., Flores-Acuña, R., Molina, A., Blanco, C., Agüera, E., Monterde, J. G. (2007). Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(1), 96-101.
  59. Bliss, C. M., Golenbock, D. T., Keates, S., Linevsky, J. K., Kelly, C. P. (1998). *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes. *Infection and immunity*, 66(11), 5357-5363.
  60. Bonilla, F. A. i Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33-S40.
  61. Bonneville, M., O'brien, R. L., Born, W. K. (2010).  $\gamma\delta$  T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 467-478.
  62. Boscolo, P., Di Giampaolo, L., Qiao, N., Reale, M., Castellani, M. L., Lucci, I., Travaglini, P., Kouri, M., Verna, N., Volpe, A. R., Carmignani, M., Paganelli, R., Di Gioacchino, M. (2005). Inhibitory effects of cadmium on peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine release are reversed by zinc and selenium salts. *Annals of Clinical Laboratory Science*, 35(2), 115-120.
  63. Bour, H., Peyron, E., Gaucherand, M., Garrigue, J. L., Desvignes, C., Kaiserlian, D., revillard, J. P., Nicolas, J. F. (1995). Major histocompatibility complex class I-restricted CD8<sup>+</sup> T cells and class II-restricted CD4<sup>+</sup> T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *European journal of immunology*, 25(11), 3006-3010.
  64. Boyman, O., Conrad, C., Tonel, G., Gilliet, M., Nestle, F. O. (2007). The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends in immunology*, 28(2), 51-57.
  65. Bozeman, P. M., Learn, D. B., Thomas, E. L. (1990). Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Journal of immunological methods*, 126(1), 125-133.
  66. Bradley, P. P., Christensen, R. D., Rothstein, G. (1982). Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*, 60(3), 618-622.
  67. Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W.W., Moll, I. (2002). Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *European journal of cell biology*, 81(5), 253-263.
  68. Brandstadter, J. D. and Yang, Y. (2011). Natural killer cell responses to viral infection. *Journal of innate immunity*, 3(3), 274-279.
  69. Bremner, I. (1987). Interactions between metallothionein and trace elements. *Progress in food nutrition science*, 11(1), 1-37.
  70. Bremner, I. i Beattie, J. H. (1990). Metallothionein and the trace minerals. *Annual review of nutrition*, 10(1), 63-83.
  71. Breton J., Massart S., Vandamme P., De Brandt E., Pot B., Foligné B. (2013) Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 14: 62.
  72. Brezniceanu, M. L., Volp, K., Bossler, S., Solbach, C., Lichter, P., Joos, S., Zornig, M. (2003). HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *The FASEB journal*, 17(10), 1295-1297.
  73. Brzoska M.M. i Moniuszko-Jakoniuk J. (1998). The influence of calcium content in diet on cumulation and toxicity of cadmium in the organism. *Archives of Toxicology*, 72, 63-73.
  74. Brzoska, M. M., Kamiński, M., Supernak-Bobko, D., Zwierz, K., Moniuszko-Jakoniuk, J. (2003). Changes in the structure and function of the kidney of rats chronically exposed to cadmium.

- I. Biochemical and histopathological studies. *Archives of toxicology*, 77(6), 344-352.
75. Bulmer, F. M. R., Rothwell, H. E., Frankish, E. R. (1938). Industrial cadmium poisoning: a report of fifteen cases, including two deaths. *Canadian Public Health Journal*, 29(1), 19-26.
76. Burd, J. F. i Usategui-Gomez, M. (1973). A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. *Clinica Chimica Acta*, 46(3), 223-227.
77. Cabrera, C., Ortega, E., Lorenzo, M. L. (1998). Cadmium contamination of vegetable crops, farmlands, and irrigation waters. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 55-81). Springer, New York, NY.
78. Callan, A., Hinwood, A., Devine, A. (2014). Metals in commonly eaten groceries in Western Australia: a market basket survey and dietary assessment. *Food Additives Contaminants: Part A*, 31(12), 1968-1981.
79. Cannino, G., Ferruggia, E., Luparello, C., Rinaldi, A. M. (2009). Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*, 9(6), 377-384.
80. Cao, X., Lin, H., Muskhelishvili, L., Latendresse, J., Richter, P., Heflich, R. H. (2015). Tight junction disruption by cadmium in an in vitro human airway tissue model. *Respiratory research*, 16(1), 30.
81. Căruntu, C., Boda, D., Musat, S., Căruntu, A., & Mandache, E. (2014). Stress-induced mast cell activation in glabrous and hairy skin. *Mediators of inflammation*, 2014.
82. Cavani, A., Mei, D., Corinti, S., Girolomoni, G., Guerra, E., Giani, M., Pirrotta, L., Puddu, P. (1998). Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell responses. Evidence for the presence of effector CD8+ and regulatory CD4+ T cells. *Journal of investigative dermatology*, 111(4), 621-628.
83. Cavani, A., Albanesi, C., Traidl, C., Sebastiani, S., Girolomoni, G. (2001). Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis. *Trends in immunology*, 22(3), 118-120.
84. Cavicchi, M., Gibbs, L., Whittle, B. J. R. (2000). Inhibition of inducible nitric oxide synthase in the human intestinal epithelial cell line, DLD-1, by the inducers of heme oxygenase 1, bismuth salts, heme, and nitric oxide donors. *Gut*, 47(6), 771-778.
85. Chaitanya, G. V., Alexander, J. S., Babu, P. P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, 8(1), 31.
86. Chakraborty, D. P., Chakraborty, C., Ganguly, M., Chakraborty, A. K. (1983). Trace metals and melanogenesis. *Experientia*, 39(3), 282-283.
87. Chan, H. M. i Cherian, M. G. (1992). Protective roles of metallothionein and glutathione in hepatotoxicity of cadmium. *Toxicology*, 72(3), 281-290.
88. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3), 527-605.
89. Chatterjee, S., Kundu, S., Sengupta, S., Bhattacharyya, A. (2009). Divergence to apoptosis from ROS induced cell cycle arrest: effect of cadmium. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 663(1-2), 22-31.
90. Chen, F. i Shi, X. (2002). Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. *Critical reviews in oncology/hematology*, 42(1), 105-121.
91. Chen, L., Zhou, J., Gao, W., Jiang, Y. Z. (2003). Action of NO and TNF-alpha release of rats with cadmium loading in malfunction of multiple system organ. *Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica]*, 55(5), 535-540.
92. Chen, J. i Shaikh, Z. A. (2009). Activation of Nrf2 by cadmium and its role in protection against cadmium-induced apoptosis in rat kidney cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 241(1), 81-89.
93. Cherkasov, A. S., Ringwood, A. H., Sokolova, I. M. (2006). Effects of cadmium exposure on mitochondrial function are modulated by acclimation temperature in eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 2461-2469.
94. Chiquoine, A. D. i Suntzeff, V. (1965). Sensitivity of mammals to cadmium necrosis of the

testis. *Reproduction*, 10(3), 455-457.

95. Chmielnicka, J. i Sowa, B. (1996). Cadmium interaction with essential metals (Zn, Cu, Fe), metabolism metallothionein, and ceruloplasmin in pregnant rats and fetuses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35(3), 277-281.

96. Cho, G. Y. i Hough, W. (1986). Time course of contact hypersensitivity to DNFB and histologic findings in mice. *Journal of Korean Medical Science*, 1(1), 31.

97. Choi, H. W., Ahn, H. J., Shin, M. K., Son, Y. S., Kim, K. S. (2018). Pretreatment with substance P alleviates irritation due to sodium lauryl sulphate exposure by maintaining E-cadherin expression on human keratinocytes. *Clinical and Experimental Dermatology*, 43(3), 291-295.

98. Christensen, G. J. M. i Brüggemann, H. (2014). Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Beneficial Microbes*, 5(2), 201-215.

99. Ciarrocca, M., Rosati, M. V., Tomei, F., Pacchiarotti, A., Corbosiero, P., Di Pastena, C., Scala, B., Capozzella, A., Tomei, G., Caciari, T., Sacco, C. (2015). Correlation between cadmium and blood counts in workers exposed to urban stressor. *Archives of Environmental Occupational Health*, 70(2), 70-76.

100. Cildir, G., Akıncılar, S. C., Tergaonkar, V. (2013). Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends in Molecular Medicine*, 19(8), 487-500.

101. Clark, R. A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N. K., Yamanaka, K. I., Dowgiert, R. K., Kupper, T. S. (2006). The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *The Journal of Immunology*, 176(7), 4431-4439.

102. Cloquet, C., Carignan, J., Libourel, G., Sterckeman, T., Perdrix, E. (2006). Tracing source pollution in soils using cadmium and lead isotopes. *Environmental Science Technology*, 40(8), 2525-2530.

103. Cogen, A. L., Yamasaki, K., Muto, J., Sanchez, K. M., Alexander, L. C., Tanios, J., Lai, Y., Kim, J. E., Nizet, V., Gallo, R. L. (2010). Staphylococcus epidermidis antimicrobial  $\delta$ -toxin (phenol-soluble modulins) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A Streptococcus. *PloS one*, 5(1).

104. 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.

105. Cua, D. J. i Tato, C. M. (2010). Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 479-489.

106. Cumberbatch, M. i Kimber, I. (1995). Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology*, 84(1), 31.

107. Cumberbatch, M., Dearman

108. , R. J., Kimber, I. (1997). Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  for migration. *Immunology*, 92(3), 388-395.

109. Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A.R., Munters, E., Artois, T.J., Nawrot, T. (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23(5), 927-940.

110. Daffada, A. A., Murray, E. J., Young, S. P. (1994). Control of activator protein-1 and nuclear factor kappa B activity by interleukin-1, interleukin-6 and metals in HEPG2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1222(2), 234-240.

111. Dan, G., Lall, S. B., Rao, D. N. (2000). Humoral and cell mediated immune response to cadmium in mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 23(2), 349-360.

112. D'andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N. M., Ma, X., Kubin, M., Trinchieri, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 178(3), 1041-1048.

113. Das, U. N. (2011). *Molecular basis of health and disease*. Springer Science and Business Media, pp. 15-88.

114. David, K. K., Andrabi, S. A., Dawson, T. M., Dawson, V. L. (2009). Parthanatos, a messenger of death. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*, 14, 1116-1128.
115. Davidson, D. J., Currie, A. J., Reid, G. S., Bowdish, D. M., MacDonald, K. L., Ma, R. C., Hancock, R. E. Speert, D. P. (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *The Journal of Immunology*, 172(2), 1146-1156.
116. De Cid, R., Riveira-Munoz, E., Zeeuwen, P. L., Robarge, J., Liao, W., Dannhauser, E. N., Giardina, E., Stuart, P. E., Nair, R., Helms, C., Escaramís, G., Ballana, E., Martín-Ezquerro, G., den Heijer, M., Kamsteeg, M., Joosten, I., Eichler, E. E., Lázaro, C., Pujol, R.M., Armengol, L., Abecasis, G., Elder, J. T., Novelli, G., Armour, J.A., Kwok, P. Y., Bowcock, A., Schalkwijk, J., Estivill, X. (2009). Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nature Genetics*, 41(2), 211-215.
117. de Vos, A. F., Van Haren, M. A., Verhagen, C., Hoekzema, R., Kijlstra, A. (1994). Kinetics of intraocular tumor necrosis factor and interleukin-6 in endotoxin-induced uveitis in the rat. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 35(3), 1100-1106.
118. de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., De Vries, J. E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 174(5), 1209-1220.
119. Deckers, J., Hammad, H., Hosten, E. (2018). Langerhans cells: sensing the environment in health and disease. *Frontiers in Immunology*, 9, 93.
120. DeGagné, J., Fortier, M., Chevalier, G., Fournier, M. (2006). Cellular response of mouse splenocytes to heavy metals exposure. *Toxicological Environmental Chemistry*, 88(2), 235-258.
121. Degryse, B., Bonaldi, T., Scaffidi, P., Müller, S., Resnati, M., Sanvito, F., Arrigoni, G., Bianchi, M. E. (2001). The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *The Journal of Cell Biology*, 152(6), 1197-1206.
122. Demenesku, J., Mirkov, I., Ninkov, M., Aleksandrov, A. P., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Kataranovski, M. (2014). Acute cadmium administration to rats exerts both immunosuppressive and proinflammatory effects in spleen. *Toxicology*, 326, 96-108.
123. Demenesku, J., Aleksandrov, A. P., Mirkov, I., Ninkov, M., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Brceski, I., Kataranovski, M. (2016). Strain differences of cadmium-induced toxicity in rats: Insight from spleen and lung immune responses. *Toxicology letters*, 256, 33-43.
124. Descotes, J. (1992). Immunotoxicology of cadmium. IARC scientific publications, (118), 385-390.
125. Descotes, J. (2010). Use of contact hypersensitivity in immunotoxicity testing. In *Immunotoxicity Testing*. Humana Press, pp. 233-239.
126. Di Meglio, P., Duarte, J. H., Ahlfors, H., Owens, N. D., Li, Y., Villanova, F., Tosi, I., Hirota, K., Nestle, F. O., Mrowietz, U., Gilchrist, M. J., Stockinger, B. (2014). Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity*, 40(6), 989-1001.
127. Di Toppi, L. S. i Gabrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41(2), 105-130.
128. Dieu-Nosjean, M. C., Massacrier, C., Homey, B., Vanbervliet, B., Pin, J. J., Vicari, A., Lebecque, S., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Zlotnik, A., Caux, C. (2000). Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(5), 705-718.
129. Dilulio, N. A., Engeman, T., Armstrong, D., Tannenbaum, C., Hamilton, T. A., Fairchild, R. L. (1999). Gro $\alpha$ -mediated recruitment of neutrophils is required for elicitation of contact hypersensitivity. *European Journal of Immunology*, 29(11), 3485-3495.
130. Ding, Z. C., Ni, F. Y., Huang, Z. X. (2010). Neuronal growth-inhibitory factor



- (metallothionein-3): structure–function relationships. *The FEBS Journal*, 277(14), 2912-2920.
131. Divkovic, M., Pease, C. K., Gerberick, G. F., Basketter, D. A. (2005). Hapten–protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis*, 53(4), 189-200.
  132. Djokic, J., Ninkov, M., Mirkov, I., Aleksandrov, A. P., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Kataranovski, M. (2014). Differential effects of cadmium administration on peripheral blood granulocytes in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1), 210-219.
  133. Djokic, J., Popov Aleksandrov, A., Ninkov, M., Mirkov, I., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Kataranovski, M. (2015). Cadmium administration affects circulatory mononuclear cells in rats. *Journal of Immunotoxicology*, 12(2), 115-123.
  134. Dong, W., Simeonova, P. P., Gallucci, R., Matheson, J., Flood, L., Wang, S., Hubbs, A., Luster, M. I. (1998). Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 151(2), 359-366.
  135. Dong, Y., Glaser, K., Schlegel, N., Claus, H., Speer, C. P. (2019). An underestimated pathogen: *Staphylococcus epidermidis* induces pro-inflammatory responses in human alveolar epithelial cells. *Cytokine*, 123, 154761.
  136. Dorta, D. J., Leite, S., DeMarco, K. C., Prado, I. M., Rodrigues, T., Mingatto, F. E., Uyemura, S.A., Santos, A.C., Curti, C. (2003). A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97(3), 251-257.
  137. Marshall, H. D., Chandele, A., Jung, Y. W., Meng, H., Poholek, A. C., Parish, I. A., Rutishauser, R., Cui, W., Kleinstein, S.H., Craft, J., Kaech, S. M. (2011). Differential expression of Ly6C and T-bet distinguish effector and memory Th1 CD4+ cell properties during viral infection. *Immunity*, 35(4), 633-646.
  138. Driskell, R. R., Jahoda, C. A., Chuong, C. M., Watt, F. M., Horsley, V. (2014). Defining dermal adipose tissue. *Experimental Dermatology*, 23(9), 629-631.
  139. Du, Z. X., Zhang, H. Y., Meng, X., Guan, Y., Wang, H. Q. (2009). Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cells. *BMC cancer*, 9(1), 56.
  140. Dudeck, A., Dudeck, J., Scholten, J., Petzold, A., Surianarayanan, S., Köhler, A., Vöhringer, D., Waskow, C., Krieg, T., Müller, W. (2011). Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity*, 34(6), 973-984.
  141. Dudley, R. E., Svoboda, D. J., Klaassen, C. D. (1982). Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 65(2), 302-313.
  142. Dudley, R. E. i Klaassen, C. D. (1984). Changes in hepatic glutathione concentration modify cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 72(3), 530-538.
  143. Duprat, P. (1989). Cutaneous Sensitization, Experimental, Mouse, Hamster, Rat. In *Integument and Mammary Glands*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 139-145.
  144. ECHA. European Chemicals Agency (2013). Guidance on information requirements and chemical safety assessment.
  145. Eklund, K. K., Niemi, K., Kovanen, P. T. (2012). Immune functions of serum amyloid A. *Critical Reviews™ in Immunology*, 32(4).
  146. Elbekai, R. H., El-Kadi, A. O. (2007). Transcriptional activation and posttranscriptional modification of Cyp1a1 by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology Letters*, 172(3), 106-119.
  147. Elias, P. M. i Menon, G. K. (1991). Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. In *Advances in Lipid Research*, 24, 1-26.
  148. Elias, P.M. (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *Journal of Investigative Dermatology*, 125, 183–200.
  149. Elinder, C. G., Kjellström, T., Lind, B., Linnman, L., Piscator, M., Sundstedt, K. (1983). Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased. *Environmental Research*, 32(1), 220-227.
  150. Elmarakby, A. A. i Sullivan, J. C. (2012). Relationship between oxidative stress and

- inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovascular Therapeutics*, 30(1), 49-59.
151. Engeman, T., Gorbachev, A. V., Kish, D. D., Fairchild, R. L. (2004). The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(5), 941-949.
  152. Enk, A. H. i Katz, S. I. (1992). Early events in the induction phase of contact sensitivity. *Journal of Investigative Dermatology*, 99(5), 39-41.
  153. Enk, A. H. i Katz, S. I. (1995). Contact sensitivity as a model for T-cell activation in skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 105(1), S80-S83.
  154. EPA, U. S.. Environmental Protection Agency (2003). National primary drinking water standards. Office of Water, US. Washington, DC, United States.
  155. EPA, U.S. Environmental Protection Agency (2017). Secondary drinking water standards: Guidance for nuisance chemicals. Drinking Water Contaminants-Standards and Regulations. Office of Water, US. Washington, DC, United States.
  156. Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 529-539.
  157. Eriyamremu, G. E., Asagba, S. O., Onyeneke, E. C., Adaikpoh, M. A. (2005). Changes in carboxypeptidase A, dipeptidase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activities in the intestine of rats orally exposed to different doses of cadmium. *Biometals*, 18(1), 1-6.
  158. Ermolli, M., Menné, C., Pozzi, G., Serra, M. Á., Clerici, L. A. (2001). Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human hacat keratinocytes. *Toxicology*, 159(1-2), 23-31.
  159. Ernst, P. i Thériault, G. (1984). Known occupational carcinogens and their significance. *Canadian Medical Association journal*, 130(7), 863.
  160. Esser, C., Bargen, I., Weighardt, H., Haarmann-Stemmann, T., Krutmann, J. (2013, November). Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. In *Seminars in immunopathology*. Springer Berlin Heidelberg, 35(6), pp. 677-691.
  161. Eybl, V., Kotyzova, D., Koutensky, J. (2006). Comparative study of natural antioxidants–curcumin, resveratrol and melatonin–in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology*, 225(2-3), 150-156.
  162. Fages, C., Nolo, R., Huttunen, H. J., Eskelinen, E., Rauvala, H. (2000). Regulation of cell migration by amphoterin. *Journal of Cell Science*, 113(4), 611-620.
  163. Fajt, M. L., Gelhaus, S. L., Freeman, B., Uvalle, C. E., Trudeau, J. B., Holguin, F., Wenzel, S. E. (2013). Prostaglandin D2 pathway upregulation: relation to asthma severity, control, and TH2 inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(6), 1504-1512.
  164. Falciola, L., Spada, F., Calogero, S., Längst, G., Voit, R., Grummt, I., Bianchi, M. E. (1997). High mobility group 1 protein is not stably associated with the chromosomes of somatic cells. *The Journal of Cell Biology*, 137(1), 19-26.
  165. Fasanya-Odewumi, C., Latinwo C. O., Ikediobi, C. O., Gilliard, L., Sponholtz, G., Nwoga, J., Stino, F., Hamilton, N., Erdos, G. W. (1998). The genotoxicity and cytotoxicity of dermally-administered cadmium: effects of dermal cadmium administration. *International Journal of Molecular Medicine*, 1(6), 1001-1007.
  166. Feldmeyer, L., Keller, M., Niklaus, G., Hohl, D., Werner, S., Beer, H. D. (2007). The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1 $\beta$  by keratinocytes. *Current Biology*, 17(13), 1140-1145.
  167. Feng, F., Xue, B., Zhang, X. (2001). The relationship between cadmium-induced inhibition of splenic lymphocyte function and cell apoptosis. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese Journal of Preventive Medicine]*, 35(1), 44-47.
  168. Ferguson, T. A., Dube, P., Griffith, T. S. (1994). Regulation of contact hypersensitivity by interleukin 10. *The Journal of Experimental Medicine*, 179(5), 1597-1604.
  169. Fergusson, J. E. (1990). The heavy elements: chemistry, environmental impact and health

- effects. Pergamon Press, 1990 - Health & Fitness – pp. 614.
170. Ferin, J. i Oberdörster, G. (1992). Translocation of particles from pulmonary alveoli into the interstitium. *Journal of Aerosol Medicine*, 5(3), 179-187.
171. Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., O'garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *The Journal of Immunology*, 146(10), 3444-3451.
172. Fischer, R. i Maier, O. (2015). Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
173. Flacher, V., Bouschbacher, M., Verronèse, E., Massacrier, C., Sisirak, V., Berthier-Vergnes, O., de Saint-Vis, B., Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Lebecque, S., Valladeau, J. (2006). Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *The Journal of Immunology*, 177(11), 7959-7967.
174. Flores-Langarica, A., Cook, C., Müller Luda, K., Persson, E. K., Marshall, J. L., Beristain-Covarrubias, N., Yam-Puc, J. C., Dahlgren, M., Persson, J. J., Uematsu, S., Akira, S., Henderson, I. R., Lindbom, B. J., Agace, W., Cunningham, A. F. (2018). Intestinal CD103+ CD11b+ cDC2 conventional dendritic cells are required for primary CD4+ T and B cell responses to soluble flagellin. *Frontiers in Immunology*, 9, 2409.
175. Foster, C. A., Yokozeki, H. I. R. O. O., Rappersberger, K. L. E. M. E. N. S., Koning, F., Volc-Platzer, B., Rieger, A. R. M. I. N., Coligan, J. E., Wolff, K., Stingl, G. (1990). Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 171(4), 997-1013.
176. Foulkes, E. C., Johnson, D. H., Sugawara, N., Bonewitz, R. F., Voner, C. (1981). *Mechanisms of Cadmium Absorption in Rats*. NTIS, Springfield, VA, 1981.
177. Foulkes, E. C. (1989). On the mechanism of cellular cadmium uptake. *Biological trace element research*, 21(1), 195-200.
178. Fransson, M. N., Barregard, L., Sallsten, G., Akerstrom, M., Johanson, G. (2014). Physiologically-based toxicokinetic model for cadmium using Markov-chain Monte Carlo analysis of concentrations in blood, urine, and kidney cortex from living kidney donors. *Toxicological Sciences*, 141(2), 365-376.
179. Freedberg, I. M., Tomic-Canic, M., Komine, M., Blumenberg, M. (2001). Keratins and the keratinocyte activation cycle. *Journal of Investigative Dermatology*, 116(5), 633-640.
180. Frericks, M., Meissner, M., Esser, C. (2007). Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 220(3), 320-332.
181. Friberg, L. (1950). Health Hazards in the Manufacture of Alkaline Accumulators with special reference to Chronic Cadmium Poisoning. A Clinical and Experimental Study. *Acta medica scandinavica*, 138(240).
182. Friberg, L. T. (1985). The rationale of biological monitoring of chemicals—with special reference metals. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 46(11), 633-642.
183. Friberg, L., Elinder, C., Kjellstrom, T., Nordberg, G. F. (1985). Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal Volume II: Effects and response. 18(3).
184. Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 97-112.
185. Fujimoto, M., Nakano, M., Terabe, F., Kawahata, H., Ohkawara, T., Han, Y., Ripley, B., Serada, S., Nishikawa, T., Kimura, A., Nomura, S., Kishimoto, T., Naka, T. (2011). The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3+ regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 186(1), 32-40.
186. Fujimoto, Y., Fujita, T., Kuramoto, N., Kuwamura, M., Izawa, T., Nishiyama, K., Yoshida, N., Nakajima, H., Takeuchi, T., Azuma, Y. T. (2018). The role of interleukin-19 in contact hypersensitivity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41(2), 182-189.
187. Fujisawa, H., Kondo, S., Wang, B., Shivji, G. M., Sauder, D. N. (1996). The role of CD4

- molecules in the induction phase of contact hypersensitivity cytokine profiles in the skin and lymph nodes. *Immunology*, 89(2), 250-255.
188. Furue, M., Takahara, M., Nakahara, T., Uchi, H. (2014). Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Archives of Dermatological Research*, 306(9), 769-779.
189. Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Tetsuo, N., Kubo, A., Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 156(6), 1099-1111.
190. Galal-Gorchev, H. (1991). Dietary intake of pesticide residues: cadmium, mercury, and lead. *Food Additives Contaminants*, 8(6), 793-806.
191. Galan, A., Troyano, A., Vilaboa, N. E., Fernández, C., de Blas, E., Aller, P. (2001). Modulation of the stress response during apoptosis and necrosis induction in cadmium-treated U-937 human promonocytic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1538(1), 38-46.
192. Gallo, R. L. i Nakatsuji, T. (2011). Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(10), 1974-1980.
193. Gao, Y., Nish, S. A., Jiang, R., Hou, L., Licona-Limón, P., Weinstein, J. S., Zhao, H., Medzhitov, R. (2013). Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity*, 39(4), 722-732.
194. García-Mendoza, D., Han, B., van den Berg, H. J., van den Brink, N. W. (2019). Cell-specific immune-modulation of cadmium on murine macrophages and mast cell lines in vitro. *Journal of Applied Toxicology*, 39(7), 992-1001.
195. Gasim, S., Elhassan, A. M., Khalil, E. A. G., Ismail, A., Kadaru, A. M. Y., Kharazmi, A., Theander, T. G. (1998). High levels of plasma IL-10 and expression of IL-10 by keratinocytes during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, 111(1), 64.
196. Gaspari, A. A., Katz, S. I., Martin, S. F. (2016). Contact hypersensitivity. *Current Protocols in Immunology*, 113(1), 4-2.
197. Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 57(9-10), 453-455.
198. Gebhardt, T., Whitney, P. G., Zaid, A., Mackay, L. K., Brooks, A. G., Heath, W. R., Carbone, F. R., Mueller, S. N. (2011). Different patterns of peripheral migration by memory CD4+ and CD8+ T cells. *Nature*, 477(7363), 216-219.
199. Girotti, M. J., Khan, N., McLellan, B. A. (1991). Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *The Journal of Trauma*, 31(1), 32-35.
200. Gocinski, B. i Tigelaar, R. (1990). Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *Journal of Immunology*, 144, 4121-4128.
201. Godfrey, D. I., Hammond, K. J., Poulton, L. D., Smyth, M. J., Baxter, A. G. (2000). NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunology today*, 21(11), 573-583.
202. Goering, P. L. i Klaassen, C. D. (1984). Tolerance to cadmium-induced toxicity depends on presynthesized metallothionein in liver. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 14(5-6), 803-812.
203. Goldblum, R. W., Piper, W. N., Campbell, A. W. (1954). A comparison of three histochemical stains for the demonstration of protein-bound sulfhydryl groups in normal human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 23(5), 375-383.
204. Goodman, W. A., Levine, A. D., Massari, J. V., Sugiyama, H., McCormick, T. S., Cooper, K. D. (2009). IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 183(5), 3170-3176.
205. Grabbe, S. i Schwarz, T. (1998). Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunology Today*, 19(1), 37-44.

206. Gray, E. E., Suzuki, K., Cyster, J. G. (2011). Cutting edge: identification of a motile IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cell population in the dermis. *The Journal of Immunology*, 186(11), 6091-6095.
207. Griffiths, C. E. M., Dearman, R. J., Cumberbatch, M., Kimber, I. (2005). Cytokines and Langerhans cell mobilisation in mouse and man. *Cytokine*, 32(2), 67-70.
208. Grone, A. (2002). Keratinocytes and cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88(1-2), 1-12.
209. Grubić-Kezele, T., Blagojević Zagorac, G., Jakovac, H., Domitrović, R., Milin, Č., Radošević-Stašić, B. (2013). Hepatic expression of metallothionein I/II, glycoprotein 96, IL-6, and TGF- $\beta$  in rat strains with different susceptibilities to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013.
210. Gu, Y., Yang, J., Ouyang, X., Liu, W., Li, H., Yang, J., Bromberg, J., Chen, S. H., Mayer, L., Unkeless, J. C., Xiong, H. (2008). Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *European Journal of Immunology*, 38(7), 1807-1813.
211. Guan, S., Palermo, T., Meliker, J. (2015). Seafood intake and blood cadmium in a cohort of adult avid seafood consumers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218(1), 147-152.
212. Williams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., Segura, E., Tussiwand, R., Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*, 14(8), 571-578.
213. Gunn, S. A., Gould, T. C., Anderson, W. A. D. (1965). Strain differences in susceptibility of mice and rats to cadmium-induced testicular damage. *Reproduction*, 10(2), 273-275.
214. Guttman-Yassky, E., Zhou, L., Krueger, J. G. (2019). The skin as an immune organ: Tolerance versus effector responses and applications to food allergy and hypersensitivity reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 144(2), 362-374.
215. Guzik, T., Korbust, R., Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation. *Journal of physiology and Pharmacology* 54(4), 469-487.
216. Haas, K., Weighardt, H., Deenen, R., Köhrer, K., Clausen, B., Zahner, S., Boukamp, P., Bloch, W., Krutmann, J., Esser, C. (2016). Aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes is essential for murine skin barrier integrity. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(11), 2260-2269.
217. Haddad, J. J., Harb, H. L. (2005). L- $\gamma$ -Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro-and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox (y) immunologic sensor (s)? *Molecular Immunology*, 42(9), 987-1014.
218. Hain, T., Melchior, F., Kamenjarin, N., Muth, S., Weslati, H., Clausen, B. E., Mahnke, K., Silva-Vilches, C., Schütze, K., Sohl, J., Radsak, M. P., Bundgen, G., Bopp, T., Danckwardt, S., Schild, H., Probst, H. C. (2019). Dermal CD207-Negative Migratory Dendritic Cells Are Fully Competent to Prime Protective, Skin Homing Cytotoxic T-Lymphocyte Responses. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(2), 422-429.
219. Halder, B., Bhattacharya, U., Mukhopadhyay, S., Giri, A. K. (2008). Molecular mechanism of black tea polyphenols induced apoptosis in human skin cancer cells: involvement of Bax translocation and mitochondria mediated death cascade. *Carcinogenesis*, 29(1), 129-138.
220. Hale, J. S., Youngblood, B., Latner, D. R., Mohammed, A. U. R., Ye, L., Akondy, R. S., Wu, T., Iyer, S.S., Ahmed, R. (2013). Distinct memory CD4+ T cells with commitment to T follicular helper-and T helper 1-cell lineages are generated after acute viral infection. *Immunity*, 38(4), 805-817.
221. Hamid, Q., Boguniewicz, M., Leung, D. Y. (1994). Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(2), 870-876.
222. Hamilton, D. L. i Valberg, L. S. (1974). Relationship between cadmium and iron absorption. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 227(5), 1033-1037.
223. Hannigan, G. D., Zheng, Q., Meisel, J. S., Minot, S. S., Bushman, F. D., Grice, E. A. (2017).

- Evolutionary and functional implications of hypervariable loci within the skin virome. *PeerJ*, 5, e2959.
224. Haouem, S. i El Hani, A. (2013). Effect of cadmium on lipid peroxidation and on some antioxidants in the liver, kidneys and testes of rats given diet containing cadmium-polluted radish bulbs. *Journal of Toxicologic Pathology*, 26(4), 359-364.
225. Harkins, D. K. i Susten, A. S. (2003). Hair analysis: exploring the state of the science. *Environmental Health Perspectives*, 111(4), 576-578.
226. Harrison, P. M. i Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1275(3), 161-203.
227. Harstad, E. B. i Klaassen, C. D. (2002). Analysis of strain difference in sensitivity to cadmium-induced hepatotoxicity in Fischer 344 and Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 67(2), 329-340.
228. Hart, B. A., Lee, C. H., Shukla, G. S., Shukla, A., Osier, M., Eneman, J. D., Chiu, J. F. (1999). Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology*, 133(1), 43-58.
229. Hartmann, B., Staedtler, F., Hartmann, N., Meingassner, J., Firat, H. (2006). Gene expression profiling of skin and draining lymph nodes of rats affected with cutaneous contact hypersensitivity. *Inflammation Research*, 55(8), 322-334.
230. Hassoun, E. A. i Stohs, S. J. (1996). Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A. 1 cell cultures. *Toxicology*, 112(3), 219-226.
231. Hata, A., Tsunoo, H., Nakajima, H., Shintaku, K., Kimura, M. (1980). Acute cadmium intoxication in inbred mice: A study on strain differences. *Chemico-biological Interactions*, 32(1-2), 29-39.
232. Haynes, W. M. (2014). *CRC handbook of chemistry and physics*. CRC press.
233. He, D., Wu, L., Kim, H. K., Li, H., Elmets, C. A., Xu, H. (2006). CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *The Journal of Immunology*, 177(10), 6852-6858.
234. He, D., Wu, L., Kim, H. K., Li, H., Elmets, C. A., Xu, H. (2009). IL-17 and IFN- $\gamma$  mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses. *The Journal of Immunology*, 183(2), 1463-1470.
235. He, R., Oyoshi, M. K., Wang, J. Y., Hodge, M. R., Jin, H., Geha, R. S. (2010). The prostaglandin D2 receptor CRTH2 is important for allergic skin inflammation after epicutaneous antigen challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(4), 784-790.
236. He, X., Chen, M. G., Ma, Q. (2008). Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 21(7), 1375-1383.
237. Heinrich, P. C., Castell, J. V., Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal*, 265(3), 621.
238. Hernandez, M. i Macia, M. (1996). Free peripheral sulfhydryl groups, CD11/CD18 integrins, and calcium are required in the cadmium and nickel enhancement of human-polymorphonuclear leukocyte adherence. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 30(4), 437-443.
239. Herron, N. (2000). Cadmium compounds. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
240. Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z., Rachlin, E. M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 157(1), 87-94.
241. Hirano, T., Koyanagi, A., Kotoshiba, K., Shinkai, Y., Kasai, M., Ando, T., Kaitani, A., Okumura, K., Kitaura, J. (2018). The Fab fragment of anti-IgE C $\epsilon$ 2 domain prevents allergic reactions through interacting with IgE-Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  complex on rat mast cells. *Scientific reports*, 8(1), 1-8.

242. Hiratsuka, H., Satoh, S. I., Satoh, M., Nishijima, M., Katsuki, Y., Suzuki, J., Nakagawa, J., Sumiyoshi, M., Shibutani, K., Mitsumori, K., Tanaka-Kagawa, T., Ando, M. (1999). Tissue distribution of cadmium in rats given minimum amounts of cadmium-polluted rice or cadmium chloride for 8 months. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 160(2), 183-191.
243. Ho, A. W. i Kupper, T. S. (2019). T cells and the skin: from protective immunity to inflammatory skin disorders. *Nature Reviews Immunology*, 19(8), 490-502.
244. Hoffmann, E. O., Cook, J. A., Coover, J. A. (1975). The effects of acute cadmium administration in the liver and kidney of the rat. Light and electron microscopic studies. Laboratory investigation. *Journal of Technical Methods and Pathology*, 32(5), 655-664.
245. Holliday, M. R., Corsini, E., Smith, S., Basketter, D. A., Dearman, R. J., Kimber, I. (1997). Differential induction of cutaneous TNF- $\alpha$  and IL-6 by topically applied chemicals. *American Journal of Contact Dermatitis*, 8(3), 158-164.
246. Honda, T., Egawa, G., Grabbe, S., Kabashima, K. (2013). Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(2), 303-315.
247. Hope, J. C., Dearman, R. J., Kimber, I., Hopkins, S. J. (1994). The kinetics of cytokine production by draining lymph node cells following primary exposure of mice to chemical allergens. *Immunology*, 83(2), 250.
248. Horiguchi, H., Mukaida, N., Okamoto, S. I., Teranishi, H., Kasuya, M., Matsushima, K. (1993). Cadmium induces interleukin-8 production in human peripheral blood mononuclear cells with the concomitant generation of superoxide radicals. *Lymphokine and Cytokine Research*, 12(6), 421-428.
249. Horiguchi, H., Harada, A., Oguma, E., Sato, M., Homma, Y., Kayama, F., Fukushima, M., Matsushima, K. (2000). Cadmium-induced acute hepatic injury is exacerbated in human interleukin-8 transgenic mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 163(3), 231-239.
250. Hostynek, J. J., Hinz, R. S., Lorence, C. R., Price, M., Guy, R. H. (1993). Metals and the skin. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(2), 171-235.
251. Hsu, C. W., Lin, J. L., Lin-Tan, D. T., Yen, T. H., Huang, W. H., Ho, T. C., Huang, Y. L., Yeh, L. M., Huang, L. M. (2009). Association of environmental cadmium exposure with inflammation and malnutrition in maintenance haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(4), 1282-1288.
252. Hsu, Y. C., Li, L., Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature Medicine*, 20(8), 847.
253. Hughes, M. F. (2006). Biomarkers of exposure: a case study with inorganic arsenic. *Environmental Health Perspectives*, 114(11), 1790-1796.
254. Hultner, L. i Moeller, J. (1990). Mast cell growth-enhancing activity (MEA) stimulates interleukin 6 production in a mouse bone marrow-derived mast cell line and a malignant subline. *Experimental Hematology*, 18(8), 873-877.
255. Hunger, R. E., Sieling, P. A., Ochoa, M. T., Sugaya, M., Burdick, A. E., Rea, T. H., Brennan, P. J., Belisle, J. T., Blauvelt, A., Porcelli, S. A., Modlin, R. L. (2004). Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *Journal of Clinical Investigation*, 113(5), 701-708.
256. Huttunen, H. J., Fages, C., Kuja-Panula, J., Ridley, A. J., Rauvala, H. (2002). Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Research*, 62(16), 4805-4811.
257. Hyun, J. S., Satsu, H., Shimizu, M. (2007). Cadmium induces Interleukin-8 production via NF- $\kappa$ B activation in the human intestinal epithelial cell, Caco-2. *Cytokine*, 37(1), 26-34.
258. IARC. International Agency for Research on Cancer (1993). Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. In: International agency for research on cancer monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC Scientific Publications. 58; pp. 119–237.

259. IAC. International Agency for Research on Cancer. (2012). A review of human carcinogens: personal habits and indoor combustions (Vol. 100). World Health Organization.
260. Iscan, M., Coban, T., Eke, B. C. (1994). Differential combined effect of cadmium and nickel on hepatic and renal glutathione S-transferases of the guinea pig. *Environmental health perspectives*, 102(9), 69-72.
261. Ishizaki K., Yamada A., Yoh K., Nakano T., Shimohata H., Maeda A., Fujioka Y., Morito N., Kawachi Y., Shibuya K., Otsuka F., Shibuya A., Takahashi S. (2007). Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *The Journal of Immunology*, 178: 605-612.
262. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes development*, 13(1), 76-86.
263. Iyer, S. S. i Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews™ in Immunology*, 32(1).
264. Jackson, M. J. (1989). Physiology of zinc: general aspects. In *Zinc in human biology* Springer, London, pp. 1-14.
265. Jacobi, U., Tassopoulos, T., Surber, C., Lademann, J. (2006). Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Archives of Dermatological Research*, 297(7), 303-310.
266. Jameson, J. M., Cauvi, G., Witherden, D. A., Havran, W. L. (2004). A keratinocyte-responsive  $\gamma\delta$  TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis. *The Journal of Immunology*, 172(6), 3573-3579.
267. Janciauskiene, S., Welte, T., Mahadeva, R. (2011). Acute phase proteins: structure and function relationship. In *Acute Phase Proteins-Regulation and Functions of Acute Phase Proteins*. IntechOpen.
268. Janeway, Jr, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. (2001a). The complement system and innate immunity. In *Immunobiology*, 5<sup>th</sup> edition. The Immune System in Health and Disease, Garland Science, pp. 342-509.
269. Janeway, Jr, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. (2001b). The complement system and innate immunity. In *Immunobiology*, 5<sup>th</sup> edition. The Immune System in Health and Disease, Garland Science, pp. 82-87.
270. Janeway, Jr, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. (2001c). The complement system and innate immunity. In *Immunobiology*, 5<sup>th</sup> edition. The Immune System in Health and Disease, Garland Science, pp. 51-114.
271. Jankovic, D., Kullberg, M. C., Feng, C. G., Goldszmid, R. S., Collazo, C. M., Wilson, M., Wynn, T. A., kamanaka, M., Flavell, R. A., Sher, A. (2007). Conventional T-bet+ Foxp3- Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *Journal of Experimental Medicine*, 204(2), 273-283.
272. Jarup, 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.
273. Jayaraj, R. L., Rodriguez, E. A., Wang, Y., Block, M. L. (2017). Outdoor ambient air pollution and neurodegenerative diseases: the neuroinflammation hypothesis. *Current Environmental Health Reports*, 4(2), 166-179.
274. Jiang, L. F., Yao, T. M., Zhu, Z. L., Wang, C., Ji, L. N. (2007). Impacts of Cd (II) on the conformation and self-aggregation of Alzheimer's tau fragment corresponding to the third repeat of microtubule-binding domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1774(11), 1414-1421.
275. Jiang, L., Xue, W., Wang, Y. (2018). Inhibition of miR-31a-5p decreases inflammation by down-regulating IL-25 expression in human dermal fibroblast cells (CC-2511 cells) under hyperthermic stress via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 107, 24-33.



276. Jin, T., Nordberg, M., Frech, W., Dumont, X., Bernard, A., Ye, T. T., Kong, Q., Wang, Z., Li, P., Lundström, N.G., Li, Y. (2002). Cadmium biomonitoring and renal dysfunction among a population environmentally exposed to cadmium from smelting in China (ChinaCad). *Biometals*, 15(4), 397-410.
277. Jin, Y., Liu, L., Zhang, S., He, R., Wu, Y., Chen, G., Fu, Z. (2016). Cadmium exposure to murine macrophages decreases their inflammatory responses and increases their oxidative stress. *Chemosphere*, 144, 168-175.
278. Johansen, C., Riis, J. L., Gedebjerg, A., Kragballe, K., Iversen, L. (2011). Tumor necrosis factor  $\alpha$ -mediated induction of interleukin 17C in human keratinocytes is controlled by nuclear factor  $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 25487-25494.
279. Jovanovic, Z. i Jovanovic, S. (2013). Toxicity induced by cumene hydroperoxide in leech Retzius nerve cells: the protective role of glutathione. *Folia Biologica*, 61(1-2), 93-100.
280. Kabashima, K., Sakata, D., Nagamachi, M., Miyachi, Y., Inaba, K., Narumiya, S. (2003). Prostaglandin E 2–EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nature Medicine*, 9(6), 744-749.
281. Kacew, S., Ruben, Z., McConnell, R. F. (1995). Strain as a determinant factor in the differential responsiveness of rats to chemicals. *Toxicologic Pathology*, 23(6), 701-714.
282. Kagi, J. H. i Vallee, B. L. (1960). Metallothionein: a cadmium-and zinc-containing protein from equine renal cortex. *Journal of Biological Chemistry*, 235(12), 3460-3465.
283. Kagi, J. H. i Hunziker, P. (1989). Mammalian metallothionein. *Biological trace element research*, 21(1), 111-118.
284. Kaji, T., Mishima, A., Yamamoto, C., Sakamoto, M., Koizumi, F. (1992). Effect of cadmium on the monolayer maintenance of vascular endothelial cells in culture. *Toxicology*, 71(3), 267-276.
285. Kalluri, R. i Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(5), 392-401.
286. Kamiyama, T., Miyakawa, H., Li, J. P., Akiba, T., Liu, J. H., Liu, J., Marumo, F., Sato, C. (1995). Effects of one-year cadmium exposure on livers and kidneys and their relation to glutathione levels. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 88(2), 177-186.
287. Julin, B., Vahter, M., Amzal, B., Wolk, A., Berglund, M., Åkesson, A. (2011). Relation between dietary cadmium intake and biomarkers of cadmium exposure in premenopausal women accounting for body iron stores. *Environmental Health*, 10(1), 105.
288. Kashem, S. W., Haniffa, M., Kaplan, D. H. (2017). Antigen-presenting cells in the skin. *Annual Review of Immunology*, 35, 469-499.
289. Kataranovski, M., Kataranovski, D., Savic, D., Jovcic, G., Bogdanovic, Z., Jovanovic, T. (1998). Granulocyte and plasma cytokine activity in acute cadmium intoxication in rats. *Physiological Research*, 47, 453-462.
290. Kataranovski, M., Mirkov, I., Belij, S., Nikolic, M., Zolotarevski, L., Ciric, D., Kataranovski, D. (2009). Lungs: remote inflammatory target of systemic cadmium administration in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(2), 225-231.
291. Kataranovski, M., Miljković, Đ., Stojanović, I. (2012). *Experimental immunology*. Faculty of Biology, University of Belgrade, pp. 1-50.
292. Kato, Y. (2016). Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 58(2), 99-104.
293. Kayama, F., Yoshida, T., Elwell, M. R., Luster, M. I. (1995a). Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 131(2), 224-234.
294. Kayama, F., Yoshida, T., Elwell, M. R., & Luster, M. I. (1995b). Cadmium-induced renal damage and proinflammatory cytokines: possible role of IL-6 in tubular epithelial cell regeneration.

- Toxicology and applied pharmacology, 134(1), 26-34.
295. Kehren, J., Desvignes, C., Krasteva, M., Ducluzeau, M. T., Assossou, O., Horand, F., Hahne, M., Kagi, D., Kaiserlian, D., Nicolas, J. F. (1999). Cytotoxicity is mandatory for CD8+ T Cell-mediated contact hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(5), 779-786.
296. Keller, M., Rüegg, A., Werner, S., Beer, H. D. (2008). Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*, 132(5), 818-831.
297. Kepinska, M., Kizek, R., Milnerowicz, H. (2018). Metallothionein and Superoxide Dismutase—Antioxidative Protein Status in Fullerene-Doxorubicin Delivery to MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3253.
298. Khan, S., Rehman, S., Khan, A. Z., Khan, M. A., Shah, M. T. (2010). Soil and vegetables enrichment with heavy metals from geological sources in Gilgit, northern Pakistan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1820-1827.
299. Kim, H., Kim, J. R., Kang, H., Choi, J., Yang, H., Lee, P., Kim, J., Lee, K. W. (2014). 7, 8, 4'-Trihydroxyisoflavone attenuates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. *PLoS One*, 9(8), e104938.
300. Kim, J. H., Wang, S. Y., Kim, I. C., Ki, J. S., Raisuddin, S., Lee, J. S., Han, K. N. (2008). Cloning of a river pufferfish (*Takifugu obscurus*) metallothionein cDNA and study of its induction profile in cadmium-exposed fish. *Chemosphere*, 71(7), 1251-1259.
301. Kimber, I., Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. (2002). Allergic contact dermatitis. *International Immunopharmacology*, 2(2-3), 201-211.
302. Kirschvink, N., Martin, N., Fievez, L., Smith, N., Marlin, D., Gustin, P. (2006). Airway inflammation in cadmium-exposed rats is associated with pulmonary oxidative stress and emphysema. *Free Radical Research*, 40(3), 241-250.
303. Kish, D. D., Li, X., Fairchild, R. L. (2009). CD8 T cells producing IL-17 and IFN- $\gamma$  initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge. *The Journal of Immunology*, 182(10), 5949-5959.
304. Kish, D. D., Volokh, N., Baldwin, W. M., Fairchild, R. L. (2011). Hapten application to the skin induces an inflammatory program directing hapten-primed effector CD8 T cell interaction with hapten-presenting endothelial cells. *The Journal of Immunology*, 186(4), 2117-2126.
305. Kiyohara, C., Hirohata, T., Inutsuka, S. (1996). The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene. *Japanese journal of cancer research*, 87(1), 18-24.
306. Kiyohara, C., Nakanishi, Y., Inutsuka, S., Takayama, K., Hara, N., Motohiro, A., Tanaka, K., Kono, S., Hirohata, T. (1998). The relationship between CYP1A1 aryl hydrocarbon hydroxylase activity and lung cancer in a Japanese population. *Pharmacogenetics*, 8(4), 315-323.
307. Klaassen, C. D., Liu, J., Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 267-294.
308. Klaassen, C. D., Liu, J., Diwan, B. A. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 215-220.
309. Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(5), 598-625.
310. Klein, M. B., Shaw, D., Barese, S., Chapo, G. A., Cuono, C. B. (1996). A reliable and cost-effective in vitro assay of skin viability for skin banks and burn centers. *The Journal of Burn Care Rehabilitation*, 17(6), 565-570.
311. Kluxen, F. M., Höfer, N., Kretzschmar, G., Degen, G. H., Diel, P. (2012). Cadmium modulates expression of aryl hydrocarbon receptor-associated genes in rat uterus by interaction with the estrogen receptor. *Archives of Toxicology*, 86(4), 591-601.
312. Kluxen, F. M., Diel, P., Höfer, N., Becker, E., Degen, G. H. (2013). The metalloprotein cadmium modulates AhR-associated gene expression in the small intestine of rats similar to ethinyl-estradiol. *Archives of Toxicology*, 87(4), 633-643.

313. Knoflach, M., Messner, B., Shen, Y. H., Frotschnig, S., Liu, G., Pfaller, K., Wang, X., Matosevic, B., Willeit, J., Kiechl, S., Laufer, G., Bernhard, D. (2011). Non-toxic cadmium concentrations induce vascular inflammation and promote atherosclerosis. *Circulation Journal*, 75(10), 2491-2495.
314. Knowles, R. G. i Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, 298(2), 249-258.
315. Koj, A. (1985). Cytokines regulating acute inflammation and synthesis of acute phase proteins. *Blut*, 51(4), 267-274.
316. Kollisch, G., Kalali, B. N., Voelcker, V., Wallich, R., Behrendt, H., Ring, J., Bauer, S., Jakob, T., Mempel, M., Ollert, M. (2005). Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*, 114(4), 531-541.
317. Komoike, Y., Inamura, H., Matsuoka, M. (2012). Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Archives of Toxicology*, 86(1), 37-44.
318. Kostyuk, V. A., Potapovich, A. I., Cesareo, E., Brescia, S., Guerra, L., Valacchi, G., Pecorelli, A., deeva, I.B., Raskovic, D., De Luca, C., Pastore, S., Korkina, L.G. (2010). Dysfunction of glutathione S-transferase leads to excess 4-hydroxy-2-nonenal and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and impaired cytokine pattern in cultured keratinocytes and blood of vitiligo patients. *Antioxidants Redox Signaling*, 13(5), 607-620.
319. Kovacevic-Jovanovic, V., Miletic, T., Stanojevic, S., Mitic, K., Dimitrijevic, M. (2015). Immune response to gut *Escherichia coli* and susceptibility to adjuvant arthritis in the rats. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62(1), 1-19.
320. Krasteva, M., Kehren, J., Ducluzeau, M. T., Sayag, M., Cacciapuoti, M., Akiba H., Descotes, J., Nicolas, J. F. (1999). Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity. *European Journal of Dermatology*, 9(1), 65-77.
321. Krone, C. A., Eric, J., Wyse, E. J., Ely, J. T. (2001). Cadmium in zinc-containing mineral supplements. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52(4), 379-382.
322. Krueger, W. S. i Wade, T. J. (2016). Elevated blood lead and cadmium levels associated with chronic infections among non-smokers in a cross-sectional analysis of NHANES data. *Environmental Health*, 15(1), 16.
323. Kubo, A., Ishizaki, I., Kubo, A., Kawasaki, H., Nagao, K., Ohashi, Y., Amagai, M. (2013). The stratum corneum comprises three layers with distinct metal-ion barrier properties. *Scientific reports*, 3(1), 1-11.
324. Kuester, R. K., Waalkes, M. P., Goering, P. L., Fisher, B. L., McCuskey, R. S., Sipes, I. G. (2002). Differential hepatotoxicity induced by cadmium in Fischer 344 and Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 65(1), 151-159.
325. Kukongviriyapan, U., Apaijit, K., Kukongviriyapan, V. (2016). Oxidative stress and cardiovascular dysfunction associated with cadmium exposure: beneficial effects of curcumin and tetrahydrocurcumin. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 239(1), 25-38.
326. Kulas, J., Ninkov, M., Tucovic, D., Popov Aleksandrov, A., Ukropina, M., Cakic Milosevic, M., Mutic, J., Kataranovski, M., Mikrov, I. (2019). Subchronic oral cadmium exposure exerts both stimulatory and suppressive effects on pulmonary inflammation/immune reactivity in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 32(7), 508-519.
327. Kumamoto, Y., Linehan, M., Weinstein, J. S., Laidlaw, B. J., Craft, J. E., Iwasaki, A. (2013). CD301b+ dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. *Immunity*, 39(4), 733-743.
328. Kundu, S., Sengupta, S., Chatterjee, S., Mitra, S., Bhattacharyya, A. (2009). Cadmium induces lung inflammation independent of lung cell proliferation: a molecular approach. *Journal of Inflammation*, 6(1), 19.
329. Kuppler, R. J., Timmons, D. J., Fang, Q. R., Li, J. R., Makal, T. A., Young, M. D., Yuan, D., Zhao, D., Zhuang, W., Zhou, H. C. (2009). Potential applications of metal-organic frameworks.

Coordination Chemistry Reviews, 253(23-24), 3042-3066.

330. Kushner, I. i Mackiewicz, A. (1993). The acute phase response: an overview. *Acute-Phase Proteins Molecular Biology, Biochemistry and Clinical Applications*, 3-19.
331. Lafaille, J. J. (1998). The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 9(2), 139-151.
332. Lafuente, A., González-Carracedo, A., Esquifino, A. I. (2004). Differential effects of cadmium on blood lymphocyte subsets. *Biometals*, 17(4), 451-456.
333. Lag, M., Rodionov, D., Ovrevik, J., Bakke, O., Schwarze, P. E., Refsnes, M. (2010). Cadmium-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: Expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages. *Toxicology Letters*, 193(3), 252-260.
334. Lai, Y., Cogen, A. L., Radek, K. A., Park, H. J., MacLeod, D. T., Leichtle, A., Ryan, A. F., Nardo, A. D., Gallo, R. L. (2010). Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(9), 2211-2221.
335. Lai, Y. i Dong, C. (2016). Therapeutic antibodies that target inflammatory cytokines in autoimmune diseases. *International Immunology*, 28(4), 181-188.
336. Lammermann, T., Afonso, P. V., Angermann, B. R., Wang, J. M., Kastenmüller, W., Parent, C. A., Germain, R. N. (2013). Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature*, 498(7454), 371-375.
337. Lansdown, A. B. (1995). Physiological and toxicological changes in the skin resulting from the action and interaction of metal ions. *Critical reviews in toxicology*, 25(5), 397-462.
338. Lansdown, A. B. i Sampson, B. (1996). Dermal toxicity and percutaneous absorption of cadmium in rats and mice. *Laboratory Animal Science*, 46(5), 549-554.
339. Lansdown, A. B., Sampson, B., Rowe, A. (2001). Experimental observations in the rat on the influence of cadmium on skin wound repair. *International Journal of Experimental Pathology*, 82(1), 35-41.
340. Lansdown, A. B. (2002). Metallothioneins: potential therapeutic aids for wound healing in the skin. *Wound Repair and Regeneration*, 10(3), 130-132.
341. Lappin, M.B., Dearman, R.J., Norval, M., Kimber, I. (1998). Lack of association between interleukin-6 production by contact allergen-activated draining lymph node cells and lymphoproliferative activity. *American Journal of Contact Dermatitis*, 9, 34-39.
342. Larsen, J. M., Geisler, C., Nielsen, M. W., Boding, L., Von Essen, M., Hansen, A. K., Skov, L., Bonefeld, C. M. (2007). Cellular dynamics in the draining lymph nodes during sensitization and elicitation phases of contact hypersensitivity. *Contact dermatitis*, 57(5), 300-308.
343. Lauwerys, R. R., Bernard, A., Roels, H. A., Buchet, J. P., Viau, C. (1984). Characterization of cadmium proteinuria in man and rat. *Environmental Health Perspectives*, 54, 147-152.
344. Lauwerys, R. R., Bernard, A. M., Roels, H. A., Buchet, J. P. (1994). Cadmium: exposure markers as predictors of nephrotoxic effects. *Clinical Chemistry*, 40(7), 1391-1394.
345. Lebre, M. C., van der Aar, A. M., van Baarsen, L., van Capel, T. M., Schuitemaker, J. H., Kapsenberg, M. L., de Jong, E. C. (2007). Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(2), 331-341.
346. Lee, J. i Lim, K. T. (2011). Inhibitory effect of plant-originated glycoprotein (27 kDa) on expression of matrix metalloproteinase-9 in cadmium chloride-induced BNL CL. 2 cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25(4), 239-246.
347. Lemus, R. i Karol, M. H. (2008). Conjugation of haptens. In *Allergy Methods and Protocols*, Humana Press, pp. 167-182.
348. Lengele, B., Nyssen-Behets, C., Scalliet, P. (2007). Anatomical bases for the radiological delineation of lymph node areas. Upper limbs, chest and abdomen. *Radiotherapy and Oncology*, 84(3), 335-347.
349. Lepoittevin, J. P. i Karlberg, A. T. (1994). Interactions of allergenic hydroperoxides with

- proteins: a radical mechanism? *Chemical Research in Toxicology*, 7(2), 130-133.
350. Lepoittevin, J. P. (2006). Metabolism versus chemical transformation or pro-versus prehapten?. *Contact Dermatitis*, 54(2), 73-74.
351. Lewis, G., Coughlin, L., Jusko, W., Hartz, S. (1972). Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man. *The Lancet*, 299(7745), 291-292.
352. Li, B., Jones, L. L., Geiger, T. L. (2018). IL-6 promotes T cell proliferation and expansion under inflammatory conditions in association with low-level ROR $\gamma$ t expression. *The Journal of Immunology*, 201(10), 2934-2946.
353. Liaw, F. Y., Chen, W. L., Kao, T. W., Chang, Y. W., Huang, C. F. (2017). Exploring the link between cadmium and psoriasis in a nationally representative sample. *Scientific reports*, 7(1), 1723.
354. Lichten, L. A., Liuzzi, J. P., Cousins, R. J. (2009). Interleukin-1 $\beta$  contributes via nitric oxide to the upregulation and functional activity of the zinc transporter Zip14 (Slc39a14) in murine hepatocytes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(4), G860-G867.
355. Lin, A. M., Rubin, C. J., Khandpur, R., Wang, J. Y., Riblett, M., Yalavarthi, S., Villanueva, E. C., Shah, P., Kaplan, M. J., Bruce, A. T. (2011). Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *The Journal of Immunology*, 187(1), 490-500.
356. Lin, P., Hu, S. W., Chang, T. H. (2003). Correlation between gene expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR), hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt), cytochromes P4501A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1), and inducibility of CYP1A1 and CYP1B1 in human lymphocytes. *Toxicological Sciences*, 71(1), 20-26.
357. Liu, C., Liu, Z., Li, Z., Wu, Y. (2010). Molecular regulation of mast cell development and maturation. *Molecular Biology Reports*, 37(4), 1993-2001.
358. Liu, F. i Jan, K. Y. (2000). DNA damage in arsenite-and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(1), 55-63.
359. Liu, J., Kershaw, W. C., Klaassen, C. D. (1990). Rat primary hepatocyte cultures are a good model for examining metallothionein-induced tolerance to cadmium toxicity. *In vitro Cellular Developmental Biology*, 26(1), 75-79.
360. Liu, J. i Klaassen, C. D. (1996). Absorption and distribution of cadmium in metallothionein-I transgenic mice. *Toxicological Sciences*, 29(2), 294-300.
361. Liu, J., Liu, Y., Habeebu, S. S., Klaassen, C. D. (1998). Susceptibility of MT-null mice to chronic CdCl<sub>2</sub>-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicological Sciences*, 46(1), 197-203.
362. Liu, J., Corton, C., Dix, D. J., Liu, Y., Waalkes, M. P., Klaassen, C. D. (2001). Genetic background but not metallothionein phenotype dictates sensitivity to cadmium-induced testicular injury in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 176(1), 1-9.
363. Liu, J., Wu, Q., Lu, Y. F., Pi, J. (2008). New insights into generalized hepatoprotective effects of oleanolic acid: key roles of metallothionein and Nrf2 induction. *Biochemical pharmacology*, 76(7), 922-928.
364. Liu, Y., Xiao, T., Ning, Z., Li, H., Tang, J., Zhou, G. (2013). High cadmium concentration in soil in the Three Gorges region: Geogenic source and potential bioavailability. *Applied Geochemistry*, 37, 149-156.
365. Lonati, A., Mommaas, M. A., Pasolini, G., Lavazza, A., Rowden, G., De Panfilis, G. (1996). Macrophages, but not Langerhans cell-like cells of dendritic lineage, express the CD36 molecule in normal human dermis: relevance to downregulatory cutaneous immune responses?. *Journal of Investigative Dermatology*, 106(1), 96-101.
366. Lončarević-Vasiljković, N., Milanović, D., Pešić, V., Tešić, V., Brkić, M., Lazić, D., Avramovic, V., Kanazir, S. (2016). Dietary restriction suppresses apoptotic cell death, promotes Bcl-2 and Bcl-xl mRNA expression and increases the Bcl-2/Bax protein ratio in the rat cortex after cortical injury. *Neurochemistry International*, 96, 69-76.

367. Lopez, E., Arce, C., Oset-Gasque, M. J., Canadas, S., Gonzalez, M. P. (2006). Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(6), 940-951.
368. Lorentz, A., Schwengberg, S., Sellge, G., Manns, M. P., Bischoff, S. C. (2000). Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *The Journal of Immunology*, 164(1), 43-48.
369. Loscher, W., Ferland, R. J., Ferraro, T. N. (2017). The relevance of inter-and intrastrain differences in mice and rats and their implications for models of seizures and epilepsy. *Epilepsy Behavior*, 73, 214-235.
370. Lowes, M. A., Kikuchi, T., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Zaba, L. C., Haider, A. S., Bowman, E. P., Krueger, J. G. (2008). Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(5), 1207-1211.
371. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
372. Lu, B., Ebensperger, C., Dembic, Z., Wang, Y., Kvatyuk, M., Lu, T., Coffman, R. L., Pestka, S., Rothman, P. B. (1998). Targeted disruption of the interferon- $\gamma$  receptor 2 gene results in severe immune defects in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 8233-8238.
373. Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3143-3153.
374. Lukačinová, A., Rácz, O., Lovásová, E., Ništiar, F. (2011). Effect of lifetime low dose exposure to heavy metals on selected serum proteins of Wistar rats during three subsequent generations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6), 1747-1755.
375. Lukic, M. L., Mensah-Brown, E., Galadari, S., Shahin, A. (2001). Lack of apoptosis of infiltrating cells as the mechanism of high susceptibility to EAE in DA rats. *Clinical and Developmental Immunology*, 8(3-4), 193-200.
376. Luna-Gomes, T., Magalhães, K. G., Mesquita-Santos, F. P., Bakker-Abreu, I., Samico, R. F., Molinaro, R., Calheiros, A. S., Diaz, B. L., Bozza, P. T., Weller, P. F., Bandeira-Melo, C. (2011). Eosinophils as a novel cell source of prostaglandin D2: autocrine role in allergic inflammation. *The Journal of Immunology*, 187(12), 6518-6526.
377. Luo, T., Yuan, Y., Yu, Q., Liu, G., Long, M., Zhang, K., Bian, J., Gu, J., Zou, H., Wang, Y., Zhu, J., Liu, X., Zhu, J. (2017). PARP-1 overexpression contributes to Cadmium-induced death in rat proximal tubular cells via parthanatos and the MAPK signalling pathway. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
378. Mabuchi, T., Singh, T. P., Takekoshi, T., Jia, G. F., Wu, X., Kao, M. C., Weiss, I., Farber, J.M., Hwang, S. T. (2013). CCR6 is required for epidermal trafficking of  $\gamma\delta$ -T cells in an IL-23-induced model of psoriasiform dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(1), 164-171.
379. MacLeod, A. S., Hemmers, S., Garijo, O., Chabod, M., Mowen, K., Witherden, D. A., Havran, W. L. (2013). Dendritic epidermal T cells regulate skin antimicrobial barrier function. *The Journal of clinical investigation*, 123(10), 4364-4374.
380. Madison, K. C. (2003). Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(2), 231-241.
381. Malavé, I. I de Ruffino, D. T. (1984). Altered immune response during cadmium administration in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 74(1), 46-56.
382. Malissen, B., Tamoutounour, S., Henri, S. (2014). The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 417-428.
383. Manca, D., Ricard, A. C., Van Tra, H., Chevalier, G. (1994). Relation between lipid peroxidation and inflammation in the pulmonary toxicity of cadmium. *Archives of Toxicology*, 68(6), 364-369.
384. Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor- $\beta$

- induces development of the TH 17 lineage. *Nature*, 441(7090), 231-234.
385. Maria, B., Koizumi, S., Jonai, H. (2000). Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells after exposure to heavy metals. *Journal of Health Science*, 46(5), 358-362.
386. Marinoni, B., Ceribelli, A., Massarotti, M. S., Selmi, C. (2014). The Th17 axis in psoriatic disease: pathogenetic and therapeutic implications. *Autoimmunity Highlights*, 5(1), 9-19.
387. Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2), 83-95.
388. Marshall, N. J., Goodwin, C. J., Holt, S. J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation*, 5(2), 69-84.
389. Marth, E., Jelovcan, S., Kleinhappl, B., Gutschi, A., Barth, S. (2001). The effect of heavy metals on the immune system at low concentrations. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 14(4), 375-386.
390. Martin, P., Fareh, M., Poggi, M. C., Boulukos, K. E., Pognonec, P. (2006). Manganese is highly effective in protecting cells from cadmium intoxication. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(1), 294-299.
391. Martindale, J. L. i Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1), 1-15.
392. Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annual Review of Immunology*, 27, 229-265.
393. Matović, V., Buha, A., Bulat, Z., Đukić-Ćosić, D. (2011). Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 62(1), 65-76.
394. Matsue, H., Bergstresser, P. R., Takashima, A. (1993). Keratinocyte-derived IL-7 serves as a growth factor for dendritic epidermal T cells in mice. *The Journal of Immunology*, 151(11), 6012-6019.
395. Matsusaka, N., Tanaka, M., Nishimura, Y., Yuyama, A., Kobayashi, H. (1972). Whole-body retention and intestinal absorption of/sup 115m/Cd in young and adult mice. Iwate University, Morioka, Japan.
396. Maurer, M., Seidel-Guyenot, W., Metz, M., Knop, J., Steinbrink, K. (2003). Critical role of IL-10 in the induction of low zone tolerance to contact allergens. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(3), 432-439.
397. Mauro, M., Crosera, M., Bianco, C., Bellomo, F., Bovenzi, M., Adami, G., Filon, F. L. (2015). In vitro permeability of silver nanoparticles through porcine oromucosal membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 132, 10-16.
398. Mayumi, N., Watanabe, E., Norose, Y., Watari, E., Kawana, S., Geijtenbeek, T. B., Takahashi, H. (2013). E-cadherin interactions are required for L angerhans cell differentiation. *European Journal of immunology*, 43(1), 270-280.
399. McGrath, J. A., Eady, R. A. J., Pope, F. M. (2004). Anatomy and organization of human skin. *Rook's textbook of dermatology*, 10, 9781444317633.
400. McKenna, I. M., Waalkes, M. P., Chen, L. C., Gordon, T. (1997). Comparison of inflammatory lung responses in Wistar rats and C57 and DBA mice following acute exposure to cadmium oxide fumes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 146(2), 196-206.
401. Megyeri, K., Mándi, Y., Degré, M., Rosztóczy, I. (2002). Induction of cytokine production by different Staphylococcal strains. *Cytokine*, 19(4), 206-212.
402. Mei, H., Yao, P., Wang, S., Li, N., Zhu, T., Chen, X., Mengmei, Y., Zhuo, S., hiting, C., Ming Wang, J., Wang, H., Xie, D., Wu, Y., Le, Y. (2017). Chronic low-dose cadmium exposure impairs cutaneous wound healing with defective early inflammatory responses after skin injury. *Toxicological Sciences*, 159(2), 327-338.
403. Meidan, V. M. i Roper, C. S. (2008). Inter-and intra-individual variability in human skin barrier function: a large scale retrospective study. *Toxicology In Vitro*, 22(4), 1062-1069.

404. Meisel, J. S., Sfyroera, G., Bartow-McKenney, C., Gimblet, C., Bugayev, J., Horwinski, J., Kim, B., Brestoff, J. R., Tyldsley, A. S., Zheng, Q., Hodkinson, B. P., Artis, D., Grice, E. A. (2018). Commensal microbiota modulate gene expression in the skin. *Microbiome*, 6(1), 20.
405. Mellor, J. W. A. (1923). *Comprehensive Treatise On Inorganic And Theoretical Chemistry*. Longmans, Green and Company, 4.
406. Merk, H. F. (2009). Drug skin metabolites and allergic drug reactions. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9(4), 311-315.
407. Messner, B., Ploner, C., Laufer, G., Bernhard, D. (2012). Cadmium activates a programmed, lysosomal membrane permeabilization-dependent necrosis pathway. *Toxicology Letters*, 212(3), 268-275.
408. Michaelsson, G., Ljunghall, K., Danielson, B. G. (1980). Zinc in epidermis and dermis in healthy subjects. *Acta Dermato-venereologica*, 60(4), 295-299.
409. Miles, A. T., Hawksworth, G. M., Beattie, J. H., Rodilla, V. (2000). Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 35-70.
410. Miller, L. S. i Modlin, R. L. (2007). Toll-like receptors in the skin. In *Seminars in immunopathology*. Springer-Verlag, 29(1), pp. 15-26.
411. Mills, C. D. (2015). Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6, 212.
412. Mills, C. D. i Ley, K. (2014). M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *Journal of Innate Immunity*, 6(6), 716-726.
413. Miljkovic, D., Stosic-Grujicic, S., Markovic, M., Momcilovic, M., Ramic, Z., Maksimovic-Ivanic, D., Mijatovic, S., Popadic, D., Cvetkovic, I., Mostarica-Stojkovic, M. (2006). Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis between Albino Oxford and Dark Agouti rats correlates with disparity in production of IL-17, but not nitric oxide. *Journal of neuroscience research*, 84(2), 379-388.
414. Mirkov, I., Demenesku, J., Aleksandrov, A. P., Ninkov, M., Glamoclija, J., Kataranovski, D., Kataranovski, M. (2015). Strain differences in the immune mechanisms of resistance of immunocompetent rats to pulmonary aspergillosis. *Immunobiology*, 220(9), 1075-1084.
415. Misra, H. P. i Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170-3175.
416. Mittal, D., Saccheri, F., Vénéreau, E., Pusterla, T., Bianchi, M. E., Rescigno, M. (2010). TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells. *The EMBO Journal*, 29(13), 2242-2252.
417. Mittermann, I., Wikberg, G., Johansson, C., Lupinek, C., Lundeberg, L., Cramer, R., Valenta, R., Scheynius, A. (2016). IgE sensitization profiles differ between adult patients with severe and moderate atopic dermatitis. *PLoS One*, 11(5), e0156077.
418. Miyara, M. i Sakaguchi, S. (2007). Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in Molecular Medicine*, 13(3), 108-116.
419. Moore, P. S. i Chang, Y. (2017). Common commensal cancer viruses. *PLoS Pathogens*, 13(1), e1006078.
420. Morales, A. I., Vicente-Sanchez, C., Sandoval, J. S., Egido, J., Mayoral, P., Arévalo, M. A., Taggaro, M.F., López-Novoa, J.M., Pérez-Barriocanal, F. (2006). Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food and Chemical Toxicology*, 44(12), 2092-2100.
421. Morgan, M. J. i Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Research*, 21(1), 103-115.
422. Morizane, S., Kajita, A., Mizuno, K., Takiguchi, T., Iwatsuki, K. (2019). Toll-like receptor signalling induces the expression of serum amyloid A in epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. *Clinical and Experimental Dermatology*, 44(1), 40-46.



423. Morselt, A. F. W., Leene, W., De Groot, C., Kipp, J. B. A., Evers, M., Roelofsen, A. M., Bosch, K. S. (1988). Differences in immunological susceptibility to cadmium toxicity between two rat strains as demonstrated with cell biological methods. Effect of cadmium on DNA synthesis of thymus lymphocytes. *Toxicology*, 48(2), 127-139.
424. Morton, J., Carolan, V. A., Gardiner, P. H. (2002). Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 455(1), 23-34.
425. Moshage, H. J., Janssen, J. A., Franssen, J. H., Hafkenscheid, J. C., Yap, S. H. (1987). Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 79(6), 1635-1641.
426. Mostarica-Stojković M., Vukmanović S., Lukić M.L. (1988). Correlation of IL 2 production and lymphoid tissue make-up in two inbred strains of rats. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 237, 407-411.
427. Müller, S., Gillert, K. E., Krause, C., Jautzke, G., Gross, U., Diamantstein, T. (1979). Effects of cadmium on the immune system of mice. *Experientia*, 35(7), 909-910.
428. Murakami, R., Denda-Nagai, K., Hashimoto, S. I., Nagai, S., Hattori, M., Irimura, T. (2013). A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PloS one*, 8(9), e73270.
429. Murata, T., Aritake, K., Tsubosaka, Y., Maruyama, T., Nakagawa, T., Hori, M., Hirai, H., Nakamura, M., Narumiya, S., Urade, Y., Ozaki, H. (2013). Anti-inflammatory role of PGD2 in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), 5205-5210.
430. Murphy, K. i Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology*. Garland Science.
431. Nagao, K., Kobayashi, T., Moro, K., Ohyama, M., Adachi, T., Kitashima, D. Y., Ueha, S., Horiuchi, K., Tanizaki, H., Kabashima, K., Kubo, A., Cho, Y., Clausen, B. E., Matsushima, K., Suematsu, M., Furtado, G. C., Lira, S. A., Farber, J. M., Udey, M. C., Amagai, M., Kubo, A. (2012). Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nature Immunology*, 13(8), 744.
432. Naik, S., Bouladoux, N., Linehan, J. L., Han, S. J., Harrison, O. J., Wilhelm, C., Conlan, S., Himmelfarb, S., Byrd, A. L., Deming, C., Quinones, M., Brenchley, J. M., Kong, H. H., Tussiwand, R., Murphy, K. M., Merad, M., Segre, J. A., Belkaid, Y. (2015). Commensal–dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature*, 520(7545), 104-108.
433. Nair, A. R., DeGheselle, O., Smeets, K., Van Kerkhove, E., Cuypers, A. (2013). Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)? *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6116-6143.
434. Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., Iwakura, Y. (2002). Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, 17(3), 375-387.
435. Nakae, S., Komiyama, Y., Narumi, S., Sudo, K., Horai, R., Tagawa, Y. I., Sekikawa, K., Matsushima, K., Asano, M., Iwakura, Y. (2003). IL-1-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 in the elicitation phase of the contact hypersensitivity response. *International Immunology*, 15(2), 251-260.
436. Nakatsuji, T., Chen, T. H., Butcher, A. M., Trzoss, L. L., Nam, S. J., Shirakawa, K. T., Zhou, W., Oh, J., Otto, M., Fenical, W., Gallo, R. L. (2018). A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. *Science Advances*, 4(2), eaao4502.
437. Nemmiche, S. (2017). Oxidative signaling response to cadmium exposure. *Toxicological Sciences*, 156(1), 4-10.
438. Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z., Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(10), 679-691.
439. Neuner, P., Urbanski, A., Trautinger, F., Möller, A., Kirnbauer, R., Kapp, Schöpf, A. E., Schwarz, T., Luger, T. A. (1991). Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in

- patients with psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 97(1), 27-33.
440. Nguyen, A. V. i Soulika, A. M. (2019). The dynamics of the skin's immune system. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8).
441. Nguyen, T. H. T. i Casale, T. B. (2011). Immune modulation for treatment of allergic disease. *Immunological Reviews*, 242(1), 258-271.
442. Nguyen, T. H., Park, M. D., Otto, M. (2017). Host response to *Staphylococcus epidermidis* colonization and infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 90.
443. Nicaud, P. (1942). Les troubles de l'intoxication chronique par le cadmium. *Archives des Maladies Professionnelles et de*, 4, 192-202.
444. Nickoloff, B. J. (2019). *Dermal immune system*. CRC Press. pp. 1, 1-6.
445. Nickoloff, B. J. i Turka, L. A. (1994). Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. 15(10), 464-469.
446. Ninkov, M., Aleksandrov, A. P., Demenesku, J., Mirkov, I., Mileusnic, D., Petrovic, A., Grigorov, I., Zolotarevski, L., Tolinacki, M., Kataranovski, D., Brceski, I., Kataranovski, M. (2015). Toxicity of oral cadmium intake: Impact on gut immunity. *Toxicology Letters*, 237(2), 89-99.
447. Ninkov, M., Aleksandrov, A. P., Mirkov, I., Demenesku, J., Mileusnic, D., Stojanov, S. J., Golic, N., Tolinacki, M., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Brceski, I., Kataranovski, M. (2016). Strain differences in toxicity of oral cadmium intake in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 11-23.
448. Nishijo, M., Nakagawa, H., Morikawa, Y., Kuriwaki, J. I., Miura, K., Kido, T., Nogawa, K. (2004). Mortality in a cadmium polluted area in Japan. *Biometals*, 17(5), 535-538.
449. Niyonsaba, F., Nagaoka, I., Ogawa, H. (2006). Human defensins and cathelicidins in the skin: beyond direct antimicrobial properties. *Critical Reviews™ in Immunology*, 26(6), 545-576.
450. Niyonsaba, F., Kiatsurayanon, C., Chieosilapatham, P., Ogawa, H. (2017). Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. *Experimental Dermatology*, 26(11), 989-998.
451. Nograles, K. E., Zaba, L. C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., Ramon, M., Bergman, R., Krueger, J. G., Guttman-Yassky, E. (2009). IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(6), 1244-1252.
452. Nogué, S., Sanz-Gallén, P., Torras, A., Boluda, F. (2004). Chronic overexposure to cadmium fumes associated with IgA mesangial glomerulonephritis. *Occupational Medicine*, 54(4), 265-267.
453. Nordberg, G. i Piscator, M. (1972) Influence of long-term cadmium exposure on urinary excretion of protein and cadmium in mice. *Environmental Physiology and Biochemistry*, 2, 37-49.
454. Nordberg, G., Jin, T., Bernard, A., Fierens, S., Buchet, J. P., Ye, T., Ze, T., Kong, Q., Wang, H. (2002). Low bone density and renal dysfunction following environmental cadmium exposure in China. *AMBIO: a journal of the human environment*, 31(6), 478-481.
455. Nordberg, G. F. (2009). Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 192-200.
456. Nordberg, G. F. i Nordberg, GF, N. (1972). Influence of long-term cadmium exposure on urinary excretion of protein and cadmium in mice. *Environmental Physiology and Biochemistry*, 2(1), 37-49.
457. Nordberg, G. F., Nogawa, K., Nordberg, M., Friberg, L. (2007). Cadmium. Chapter 23. *Handbook on the Toxicology of Metals*. 3rd edition. Academic Press/Elsevier, 446-486.
458. Nosbaum, A., Prevel, N., Truong, H. A., Mehta, P., Ettinger, M., Scharschmidt, T. C., Ali, N. H., Pauli, M. L., Abbas, A.K., Rosenblum, M. D. (2016). Cutting edge: regulatory T cells facilitate cutaneous wound healing. *The Journal of Immunology*, 196(5), 2010-2014.
459. Noske, K. (2018). Secreted immunoregulatory proteins in the skin. *Journal of*

- Dermatological Science, 89(1), 3-10.
460. Nriagu, J. O. i Pacyna, J. M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333(6169), 134-139.
461. Nzengue, Y., Lefebvre, E., Cadet, J., Favier, A., Rachidi, W., Steiman, R., Guiraud, P. (2009). Metallothionein expression in HaCaT and C6 cell lines exposed to cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23(4), 314-323.
462. Nzengue, Y., Candéias, S. M., Sauvaigo, S., Douki, T., Favier, A., Rachidi, W., Guiraud, P. (2011). The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: its redox biomarkers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25(3), 171-180.
463. Nzengue, Y., Steiman, R., Garrel, C., Lefebvre, E., Guiraud, P. (2008). Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: role of glutathione in the resistance to cadmium. *Toxicology*, 243(1-2), 193-206.
464. O'Brien, R. L. i Born, W. K. (2015). Dermal  $\gamma\delta$  T cells—What have we learned?. *Cellular Immunology*, 296(1), 62-69.
465. Oberdorster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Wolfgang, K., Cox, C. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65(20), 1531-1543.
466. Odewumi, C., Latinwo, L. M., Sinclair, A., Badisa, V. L., Abdullah, A., Badisa, R. B. (2015). Effect of cadmium on the expression levels of interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-10 cytokines in human lung cells. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 6422-6426.
467. Odewumi, C. O., Latinwo, L. M., Ruden, M. L., Badisa, V. L., Fils-Aime, S., Badisa, R. B. (2016). Modulation of cytokines and chemokines expression by NAC in cadmium chloride treated human lung cells. *Environmental Toxicology*, 31(11), 1612-1619.
468. OECD Guideline for testing of chemicals (2005). The Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris, France, pp. 1-13.
- 469.
470. Oez, S., Platzer, E., Welte, K. (1990). A quantitative colorimetric method to evaluate the functional state of human polymorphonuclear leukocytes. *Blut: Zeitschrift für die Gesamte Blutforschung*, 60(2), 97-102.
471. Ogawa, Y., Kinoshita, M., Shimada, S., Kawamura, T. (2018). Zinc in Keratinocytes and Langerhans Cells: Relevance to the Epidermal Homeostasis. *Journal of Immunology Research*, 2018.
472. Ognjanovic, B., Zikic, R. V., Stajn, A., Saicic, Z. S., Kostic, M. M., Petrovic, V. M. (1995). The effects of selenium on the antioxidant defense system in the liver of rats exposed to cadmium. *Physiological Research*, 44, 293-300.
473. Ognjanovic, B., Pavlovic, S. Z., Maletic, S. D., Zikic, R. V., Stajn, A. S., Radojicic, R. M., Saicic, R.M., Petrovic, V. M. (2003). Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiological Research*, 52(5), 563-570.
474. Oh, J., Byrd, A. L., Park, M., Kong, H. H., Segre, J. A., NISC Comparative Sequencing Program. (2016). Temporal stability of the human skin microbiome. *Cell*, 165(4), 854-866.
475. Ohji, M., Sundarraj, N., Thoft, R. A. (1993). Transforming growth factor- $\beta$  stimulates collagen and fibronectin synthesis by human corneal stromal fibroblasts in vitro. *Current Eye Research*, 12(8), 703-709.
476. Ohsawa, M., Masuko-Sato, K., Takahashi, K., Otsuka, F. (1986). Strain differences in cadmium-mediated suppression of lymphocyte proliferation in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 84(2), 379-388.
477. Okuda, B., Iwamoto, Y., Tachibana, H., Sugita, M. (1997). Parkinsonism after acute cadmium poisoning. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 99(4), 263-265.
478. Olsson, I. M., Bensryd, I., Lundh, T., Ottosson, H., Skerfving, S., Oskarsson, A. (2002).

- Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects. *Environmental Health Perspectives*, 110(12), 1185-1190.
479. Olszowski, T., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Chlubek, D. (2012). Pro-inflammatory properties of cadmium. *Acta Biochimica Polonica*, 59(4), 475-482.
480. Onderdijk, A. J., Baerveldt, E. M., Kurek, D., Kant, M., Florencia, E. F., Debets, R., Prens, E. P. (2015). IL-4 downregulates IL-1 $\beta$  and IL-6 and induces GATA3 in psoriatic epidermal cells: route of action of a Th2 cytokine. *The Journal of Immunology*, 195(4), 1744-1752.
481. Orlik, C., Deibel, D., Küblbeck, J., Balta, E., Ganskih, S., Habicht, J., Niesler, B., Schröder-Braunstein, J., Schäkel, K., Wabnitz, G., Samstag, Y. (2019). Keratinocytes costimulate naive human T cells via CD2: a potential target to prevent the development of proinflammatory Th1 cells in the skin. *Cellular and Molecular Immunology*.
482. Orłowski, C. i Piotrowski, J. K. (2003). Biological levels of cadmium and zinc in the small intestine of non-occupationally exposed human subjects. *Human Experimental Toxicology*, 22(2), 57-63.
483. Otsuka, A., Kubo, M., Honda, T., Egawa, G., Nakajima, S., Tanizaki, H., Kim, B., Matsuoka, S., Watanabe, T., Nakae, S., Miyachi, Y. (2011). Requirement of interaction between mast cells and skin dendritic cells to establish contact hypersensitivity. *PloS one*, 6(9), e25538.
484. Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 555-567.
485. Ou, Z., Chen, Y., Niu, X., He, W., Song, B., Fan, D., Sun, X. (2017). High-mobility group box 1 regulates cytoprotective autophagy in a mouse spermatocyte cell line (GC-2spd) exposed to cadmium. *Irish Journal of Medical Science (1971-)*, 186(4), 1041-1050.
486. Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J. D., O'Regan, G. M., Watson, R. M., Cecil, J. E., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C. S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L. B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., McLean, W. H. I. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature Genetics*, 38(4), 441-446.
487. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., Lenardo, M. J. (2007). CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature Immunology*, 8(12), 1353-1362.
488. Pappas, R. S., Stanfill, S. B., Watson, C. H., Ashley, D. L. (2008). Analysis of toxic metals in commercial moist snuff and Alaskan iqmik. *Journal of Analytical Toxicology*, 32(4), 281-291.
489. Pappas, R. S. (2011). Toxic elements in tobacco and in cigarette smoke: inflammation and sensitization. *Metallomics*, 3(11), 1181-1198.
490. Pappas, R. S., Fresquez, M. R., Martone, N., Watson, C. H. (2014). Toxic metal concentrations in mainstream smoke from cigarettes available in the USA. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(4), 204-211.
491. Parsonage, G., Filer, A. D., Haworth, O., Nash, G. B., Rainger, G. E., Salmon, M., Buckley, C. D. (2005). A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends in Immunology*, 26(3), 150-156.
492. Pasparakis, M., Haase, I., Nestle, F. O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 289-301.
493. Passalacqua, M., Patrone, M., Picotti, G. B., Del Rio, M., Sparatore, B., Melloni, E., Pontremoli, S. (1997). Stimulated astrocytes release high-mobility group 1 protein, an inducer of LAN-5 neuroblastoma cell differentiation. *Neuroscience*, 82(4), 1021-1028.
494. Pathak, N. i Khandelwal, S. (2006). Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium. *Toxicology*, 220(1), 26-36.
495. Pathak, N. i Khandelwal, S. (2007). Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Toxicology Letters*, 169(2), 95-108.

496. Pathak, N. i Khandelwal, S. (2008). Impact of cadmium in T lymphocyte subsets and cytokine expression: differential regulation by oxidative stress and apoptosis. *Biometals*, 21(2), 179-187.
497. Patra, R. C., Swarup, D., Sharma, M. C., Naresh, R. (2006). Trace mineral profile in blood and hair from cattle environmentally exposed to lead and cadmium around different industrial units. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 53(10), 511-517.
498. Patra, R. C., Swarup, D., Naresh, R., Kumar, P., Nandi, D., Shekhar, P., Roy, S., Ali, S. L. (2007). Tail hair as an indicator of environmental exposure of cows to lead and cadmium in different industrial areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(1), 127-131.
499. Pennino, D., Eyerich, K., Scarponi, C., Carbone, T., Eyerich, S., Nasorri, F., Garcovich, S., Traidl-Hoffmann, C., Albanesi, C. Cavani, A. (2010). IL-17 amplifies human contact hypersensitivity by licensing hapten nonspecific Th1 cells to kill autologous keratinocytes. *The Journal of Immunology*, 184(9), 4880-4888.
500. Pepper, M. i Jenkins, M. K. (2011). Origins of CD4+ effector and central memory T cells. *Nature Immunology*, 12(6), 467.
501. Pepper, M., Pagán, A. J., Igyártó, B. Z., Taylor, J. J., Jenkins, M. K. (2011). Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity*, 35(4), 583-595.
502. Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Forestier, C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal*, 32(4), 539-548.
503. Petri, B., Phillipson, M., Kubes, P. (2008). The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *The Journal of Immunology*, 180(10), 6439-6446.
504. Picker, L. J., Michie, S. A., Rott, L. S., Butcher, E. C. (1990). A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *The American Journal of Pathology*, 136(5), 1053.
505. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, e8416763.
506. Popov, A., Mirkov, I., Miljković, D., Belij, S., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Kataranovski, M. (2011). Contact allergic response to dinitrochlorobenzene (DNCB) in rats: insight from sensitization phase. *Immunobiology*, 216(7), 763-770.
507. Popov Aleksandrov, A., Mirkov, I., Demenesku, J., Ninkov, M., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Kataranovski, M. (2015). Strain differences in contact hypersensitivity reaction to dinitrochlorobenzene (DNCB) in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 75, 94-103.
508. Proksch, E., Brandner, J. M., Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063-1072.
509. Prozialeck, W. C. i Niewenhuis, R. J. (1991). Cadmium (Cd<sup>2+</sup>) disrupts intercellular junctions and actin filaments in LLC-PK1 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 107(1), 81-97.
510. Prozialeck, W. C., Vaidya, V. S., Liu, J., Waalkes, M. P., Edwards, J. R., Lamar, P. C., Bernard, A. M., Dumont, X., Bonventre, J. V. (2007). Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney International*, 72(8), 985-993.
511. Qu, W., Ke, H., Pi, J., Broderick, D., French, J. E., Webber, M. M., Waalkes, M. P. (2007). Acquisition of apoptotic resistance in cadmium-transformed human prostate epithelial cells: Bcl-2 overexpression blocks the activation of JNK signal transduction pathway. *Environmental Health Perspectives*, 115(7), 1094-1100.
512. Quaife, C., Durnam, D., Mottet, N. K. (1984). Cadmium hypersusceptibility in the C3H mouse liver: Cell specificity and possible role of metallothionein. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 76(1), 9-17.
513. Radosavljević, T., Mladenović, D., Ninković, M., Vučević, D., Boričić, I., Ješić-Vukićević,

- R., Lopicic, S., Todorović, V. (2012). Oxidative stress in rat liver during acute cadmium and ethanol intoxication. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(2), 159-176.
514. Rahman, I., Biswas, S. K., Jimenez, L. A., Torres, M., Forman, H. J. (2005). Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxidants redox signaling*, 7(1-2), 42-59.
515. Rahman, I., Kode, A., Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), 3159.
516. Rajendran, P., Rengarajan, T., Nishigaki, Y., Palaniswami, R., Nishigaki, I. (2016). In vitro studies on mangiferin protection against cadmium-induced human renal endothelial damage and cell death via the MAP kinase and NF- $\kappa$  B pathways. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 36(1), 57-66.
517. Rajesh, N. i Rajesh, V. (2016). Evaluation of the genetic basis of heavy metal resistance in an isolate from electronic industry effluent. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 177-180.
518. Ramirez, G. A., Yacoub, M. R., Ripa, M., Mannina, D., Cariddi, A., Saporiti, N., Ciceri, F., Castagna, A., Colombo, G., Dagna, L. (2018). Eosinophils from physiology to disease: a comprehensive review. *BioMed Research International*, 2018, e9095275.
519. 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.
520. Rashed, M. N. i Hossam, F. (2007). Heavy metals in fingernails and scalp hair of children, adults and workers from environmentally exposed areas at Aswan, Egypt. *Environmental Bioindicators*, 2(3), 131-145.
521. Read, S., Malmström, V., Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+ CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(2), 295-302.
522. Reeve, V. E., Bosnic, M., Nishimura, N. (1999). Interferon- $\gamma$  is involved in photoimmunoprotection by UVA (320–400 nm) radiation in mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 112(6), 945-950.
523. Reeves, P. G., Chaney, R. L., Simmons, R. W., Cherian, M. G. (2005). Metallothionein induction is not involved in cadmium accumulation in the duodenum of mice and rats fed diets containing high-cadmium rice or sunflower kernels and a marginal supply of zinc, iron, and calcium. *The Journal of Nutrition*, 135(1), 99-108.
524. Rikans, L. E. I Yamano, T. (2000). Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 14(2), 110-117.
525. Ritz, B., Heinrich, J., Wjst, M., Wichmann, E., Krause, C. (1998). Effect of cadmium body burden on immune response of school children. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 53(4), 272-280.
526. Robert, C. i Kupper, T. S. (1999). Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *New England Journal of Medicine*, 341(24), 1817-1828.
527. Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., Gurtner, G. C. (2019). Wound healing: a cellular perspective. *Physiological Reviews*, 99(1), 665-706.
528. Roh, J. S. i Sohn, D. H. (2018). Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Network*, 18(4).
529. Romani, N., Clausen, B. E., Stoitzner, P. (2010). Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological Reviews*, 234(1), 120-141.
530. Ros, J. P. M. i Slooff, W. (1987). Integrated criteria document. Cadmium. Bilthoven, National Institute of Public Health and Environmental Protection (Report No. 758476004).
531. Rosenblum, E. R., Gavalier, J. S., Van Thiel, D. H. (1989). Lipid peroxidation: a mechanism for alcohol-induced testicular injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(5), 569-577.
532. Rowlands, J. C. i Gustafsson, J. Å. (1997). Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal

- transduction. *Critical Reviews in Toxicology*, 27(2), 109-134.
533. Ryu, D. Y., Lee, S. J., Park, D. W., Choi, B. S., Klaassen, C. D., Park, J. D. (2004). Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. *Toxicology Letters*, 152(1), 19-25.
534. 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(5), 897-926.
535. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), 775-787.
536. Sapuntsova, S. G., Lebed'ko, O. A., Shchetkina, M. V., Fleyshman, M. Y., Kozulin, E. A., Timoshin, S. S. (2011). Status of free-radical oxidation and proliferation processes in patients with atopic dermatitis and lichen planus. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 150(6), 690.
537. Saraiva, M., Christensen, J. R., Veldhoen, M., Murphy, T. L., Murphy, K. M., O'Garra, A. (2009). Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity*, 31(2), 209-219.
538. Satarug, S., Haswell-Elkins, M. R., Moore, M. R. (2000). Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 84(6), 791-802.
539. Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., Sens, D. A. (2010). Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental Health Perspectives*, 118(2), 182-190.
540. Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894), 191-195.
541. Scharschmidt, T. C., Man, M. Q., Hatano, Y., Crumrine, D., Gunathilake, R., Sundberg, J. P., Silva, K.A., Mauro T.M., Hupe, M., Cho, s., Wu, Y., Celli, A., Schmuth, M., Feingol, K.R., Elisa, P.M. (2009). Filaggrin deficiency confers a paracellular barrier abnormality that reduces inflammatory thresholds to irritants and haptens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(3), 496-506.
542. Scharschmidt, T. C., Vasquez, K. S., Truong, H. A., Gearty, S. V., Pauli, M. L., Nosbaum, A., Gratz, I. K., Otto, M., Moon, J. J., Liese, J., Abbas, A. K., Fischbach, M. A., Rosenblum, M. D. (2015). A wave of regulatory T cells into neonatal skin mediates tolerance to commensal microbes. *Immunity*, 43(5), 1011-1021.
543. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. (2011). The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(5), 878-888.
544. Schierwagen, C., Bylund-Fellenius, A. C., Lundberg, C. (1990). Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *Journal of Pharmacological Methods*, 23(3), 179-186.
545. Schmalz, G., Schuster, U., Schweikl, H. (1998). Influence of metals on IL-6 release in vitro. *Biomaterials*, 19(18), 1689-1694.
546. Schmidt, J. V. i Bradfield, C. A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12(1), 55-89.
547. Schnell, R. C., Yuhas, E. M., Pence, D. H., Means, J. R., Roberts, S. A., Yau, E. T., Miya, T. S., Mennear, J. H. (1978). Effect of acute and chronic cadmium treatment on hepatic drug metabolism in male rats. *Archives of Toxicology*, 40(4), 269-277.
548. Schroeder, H. A., Balassa, J. J., Tipton, I. H. (1964). Abnormal trace metals in man: Tin. *Journal of Chronic Diseases*, 17(6), 483-502.
549. Schultz, J. i Kaminker, K. (1962). Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 96(3), 465-467.
550. Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M. H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*, 209(4), 653-660.
551. Senra, L., Stalder, R., Martinez, D. A., Chizzolini, C., Boehncke, W. H., Brembilla, N. C.

- (2016). Keratinocyte-derived IL-17E contributes to inflammation in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(10), 1970-1980.
552. Sera, K., Futatsugawa, S., Murao, S. (2002). Quantitative analysis of untreated hair samples for monitoring human exposure to heavy metals. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 189(1-4), 174-179.
553. Sethi, P. K., Khandelwal, D., Sethi, N. (2006). Cadmium exposure: health hazards of silver cottage industry in developing countries. *Journal of Medical Toxicology*, 2(1), 14-15.
554. Shah, M. T., Begum, S., Khan, S. (2010). Petro and biogeochemical studies of mafic and ultramafic rocks in the Mingora and Kabal areas, Swat, Pakistan. *Environmental Earth Sciences*, 60(5), 1091-1102.
555. Shaikh, Z. A., Vu, T. T., Zaman, K. (1999). Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154(3), 256-263.
556. Sharma, J. N., Al-Omran, A., Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15(6), 252-259.
557. Sharp, L. L., Jameson, J. M., Cauvi, G., Havran, W. L. (2005). Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nature Immunology*, 6(1), 73-79.
558. Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360(1), 1-16.
559. Sheng, J., Ruedl, C., Karjalainen, K. (2015). Most tissue-resident macrophages except microglia are derived from fetal hematopoietic stem cells. *Immunity*, 43(2), 382-393.
560. Shevach, E. M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*, 25(2), 195-201.
561. Shi, G., Chen, Z., Xu, S., Zhang, J., Wang, L., Bi, C., Teng, J. (2008). Potentially toxic metal contamination of urban soils and roadside dust in Shanghai, China. *Environmental Pollution*, 156(2), 251-260.
562. Shi, L. B., Xu, H. P., Wu, Y. J., Li, X., Gao, J. Y., Chen, H. B. (2018). The effects of imidacloprid combined with endosulfan on IgE-mediated mouse bone marrow-derived mast cell degranulation and anaphylaxis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 148, 159-165.
563. Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Science*, 13(8), 1979-1987.
564. Shimada, H., Yasutake, A., Hirashima, T., Takamura, Y., Kitano, T., Waalkes, M. P., Imamura, Y. (2008). Strain difference of cadmium accumulation by liver slices of inbred Wistar-Imamichi and Fischer 344 rats. *Toxicology In Vitro*, 22(2), 338-343.
565. Shinkai, Y., Kimura, T., Itagaki, A., Yamamoto, C., Taguchi, K., Yamamoto, M., Taguchi, K., Masayuki, Y., Kumagai, Y., Kaji, T. (2016). Partial contribution of the Keap1-Nrf2 system to cadmium-mediated metallothionein expression in vascular endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 295, 37-46.
566. Shumilla, J. A., Wetterhahn, K. E., Barchowsky, A. (1998). Inhibition of NF- $\kappa$ B Binding to DNA by Chromium, Cadmium, Mercury, Zinc, and Arsenite in Vitro: Evidence of a Thiol Mechanism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 349(2), 356-362.
567. Sidhu, M., Sharma, M., Bhatia, M., Awasthi, Y. C., Nath, R. (1993). Effect of chronic cadmium exposure on glutathione S-transferase and glutathione peroxidase activities in Rhesus monkey: the role of selenium. *Toxicology*, 83(1-3), 203-213.
568. Silke, J., Ekert, P. G., Day, C. L., Hawkins, C. J., Baca, M., Chew, J., Pakusch, M., Verhagen, A.M., Vaux, D. L. (2001). Direct inhibition of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP. *The EMBO Journal*, 20(12), 3114-3123.
569. Singhal, R. K., Anderson, M. E., Meister, A. L. T. O. N. (1987). Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *The FASEB Journal*, 1(3), 220-223.



570. Skipper, A., Sims, J., Yedjou, C., Tchounwou, P. (2016). Cadmium chloride induces DNA damage and apoptosis of human liver carcinoma cells via oxidative stress. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(1), 88.
571. Smookler, D. S., Mohammed, F. F., Kassiri, Z., Duncan, G. S., Mak, T. W., Khokha, R. (2006). Cutting edge: tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation. *The Journal of Immunology*, 176(2), 721-725.
572. Son, Y. O., Wang, X., Hitron, J. A., Zhang, Z., Cheng, S., Budhraj, A., Ding, S., Lee, J. C., Shi, X. (2011). Cadmium induces autophagy through ROS-dependent activation of the LKB1–AMPK signaling in skin epidermal cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 255(3), 287-296.
573. Sparatore, B., Passalacqua, M., Patrone, M., Melloni, E., Pontremoli, S. (1996). Extracellular high-mobility group 1 protein is essential for murine erythroleukaemia cell differentiation. *Biochemical Journal*, 320(1), 253-256.
574. Spiliopoulou, A. I., Krevvata, M. I., Kolonitsiou, F., Harris, L. G., Wilkinson, T. S., Davies, A. P., Dimitracopoulos, G. O., Karamanos, N. K., Mack, D., Anastassiou, E. D. (2012). An extracellular *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide: relation to polysaccharide intercellular adhesin and its implication in phagocytosis. *BMC Microbiology*, 12(1), 76.
575. Squier, C. A. (1991). The permeability of oral mucosa. *Critical Reviews in Oral Biology Medicine*, 2(1), 13-32.
576. Steele, M. L., Fuller, S., Patel, M., Kersaitis, C., Ooi, L., Münch, G. (2013). Effect of Nrf2 activators on release of glutathione, cysteinylglycine and homocysteine by human U373 astroglial cells. *Redox Biology*, 1(1), 441-445.
577. Stelzer, K. J. i Pazdernik, T. L. (1983). Cadmium-induced immunotoxicity. *International Journal of Immunopharmacology*, 5(6), 541-548.
578. Stone, K. D., Prussin, C., Metcalfe, D. D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S73-S80.
579. Stosic, J., Mirkov, I., Belij, S., Nikolic, M., Popov, A., Kataranovski, D., Kataranovski, M. (2010). Gender differences in pulmonary inflammation following systemic cadmium administration in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 23(4), 293-299.
580. Stricker, R. B., Goldberg, B., Mills, L. B., Epstein, W. L. (1997). Decrease in viral load associated with topical dinitrochlorobenzene therapy in HIV disease. *Research in Virology*, 148(5), 343-348.
581. Stromeyer, M. (1819). New Details respecting Cadmium. *Annals of Philosophy*, 14, 269.
582. Sun, B., Sun, S. H., Chan, C. C., Caspi, R. R. (2000). Evaluation of in vivo cytokine expression in EAU-susceptible and resistant rats: a role for IL-10 in resistance?. *Experimental Eye Research*, 70(4), 493-502.
583. Sutherland, D. E., Willans, M. J., Stillman, M. J. (2010). Supermetalation of the  $\beta$  domain of human metallothionein 1a. *Biochemistry*, 49(17), 3593-3601.
584. Suto, H., Nambu, A., Morita, H., Yamaguchi, S., Numata, T., Yoshizaki, T., Shimura, E., Arae, K., Asada, Y., Motomura, K., Kaneko, M., Abe, T., Matsuda, A., Iwakura, Y., Okumura, K., Saito, H., Matsumoto, K., Sudo, K., Nakae, S. (2018). IL-25 enhances TH17 cell-mediated contact dermatitis by promoting IL-1 $\beta$  production by dermal dendritic cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(5), 1500-1509.
585. Suwazono, Y., Kido, T., Nakagawa, H., Nishijo, M., Honda, R., Kobayashi, E., Dochi, M., Nogawa, K. (2009). Biological half-life of cadmium in the urine of inhabitants after cessation of cadmium exposure. *Biomarkers*, 14(2), 77-81.
586. Taguchi, A., Blood, D. C., del Toro, G., Canet, A., Lee, D. C., Qu, W., Tanji, N., Lu, Y., Lalla, E., Fu, C., Hofmann, M.A., Kislinger, T., Ingram, M., Lu, A., Tanaka, H., Hori, O., Ogawa, S., Stern, D.M., Schmidt, A.M. (2000). Blockade of RAGE–amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*, 405(6784), 354-360.
587. Talalay, P., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D. (2003). Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis.

Advances in Enzyme Regulation, 43, 121-134.

588. Tamoutounour, S., Guilliams, M., Sanchis, F. M., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., Dalod, M., Malissen, B., Henri, S. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*, 39(5), 925-938.

589. Tang, Q. i Bluestone, J. A. (2008). The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology*, 9(3), 239-244.

590. Teresa, M., Vasconcelos, S. D., Tavares, H. M. (1997). Trace element concentrations in blood and hair of young apprentices of a technical-professional school. *Science of the Total Environment*, 205(2-3), 189-199.

591. Theocharis, S., Margeli, A., Fasitsas, C., Loizidou, M., Deliconstantinos, G. (1991). Acute exposure to cadmium causes time-dependent liver injury in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 99(1-2), 127-130.

592. Theocharis, S. E., Souliotis, V. L., Panayiotidis, P. G. (1994). Suppression of interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  biosynthesis by cadmium in in vitro activated human peripheral blood mononuclear cells. *Archives of Toxicology*, 69(2), 132-136.

593. Theoharides, T. C., Alysandratos, K. D., Angelidou, A., Delivanis, D. A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A., Kalogeromitros, D. (2012). Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(1), 21-33.

594. Thevenod, F. i Lee, W. K. (2013). Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways. *Archives of Toxicology*, 87(10), 1743-1786.

595. Thompson-Snipes, L., Dhar, V., Bond, M. W., Mosmann, T. R., Moore, K. W., Rennick, D. M. (1991). Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *The Journal of Experimental Medicine*, 173(2), 507-510.

596. Tolcin, A. C. (2008). Cadmium. In U.S. Geological Survey (Ed.), *Metals and Minerals, Minerals Yearbook*, Washington, DC, United States Government Printing Office, pp. 151-158.

597. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), 349-363.

598. Tomura, M., Hata, A., Matsuoka, S., Shand, F. H., Nakanishi, Y., Ikebuchi, R., Ueha, S., Tsutsui, H., Inaba, K., Matsushima, K., Miyawaki, A., Kabashima, K., Watanabe, T., Kanagawa, O. (2014). Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Scientific reports*, 4, 6030.

599. Toshihara, A., Ansel, J. C., Chan, S. C., Li, S. H., Hanifin, J. M. (1993). Increased interleukin 6 production by T cells derived from patients with atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 100(3), 299-304.

600. Traub, A., Margulis, S. B., Strieker, R. B. (1997). Topical immune modulation with dinitrochlorobenzene in HIV disease: a controlled trial from Brazil. *Dermatology*, 195(4), 369-373.

601. Trinchieri, G. (2007). Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(2), 239-243.

602. Tsangaris, G. T. i Tzortzatou-Stathopoulou, F. (1998). Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. *Toxicology*, 128(2), 143-150.

603. Tsunoo, H., Nakajima, H., Hata, A., Kimura, M. (1979). Genetic influence on induction of metallothionein and mortality from cadmium intoxication. *Toxicology Letters*, 4(4), 253-256.

604. Turley, A. E., Zagorski, J. W., Kennedy, R. C., Freeborn, R. A., Bursley, J. K., Edwards, J. R., Rockwell, C. E. (2019). Chronic low-level cadmium exposure in rats affects cytokine production by activated T cells. *Toxicology Research*, 8(2), 227-237.

605. Turvey, S. E. i Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S24-S32.

606. Ullum, H. E. N. R. I. K., Haahr, P. M., Diamant, M. A. R. C. U. S., Palmo, J., Halkjaer-

- Kristensen, J., Pedersen, B. K. (1994). Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. *Journal of Applied Physiology*, 77(1), 93-97.
607. Ulrich, P., Grenet, O., Bluemel, J., Vohr, H., Wiemann, C., Grundler, O., Suter, W. (2001). Cytokine expression profiles during murine contact allergy: T helper 2 cytokines are expressed irrespective of the type of contact allergen. *Archives of Toxicology*, 75(8), 470-479.
608. USGS. U.S. Geological Survey (2008). *Metals and Minerals, Minerals Yearbook*, Washington, DC, United States Government Printing Office, pp. 151-158.
609. USGS. U.S. Geological Survey. *Mineral Commodity Summaries* (2008). Washington, DC, United States Government Printing Office, pp. 42-43.
610. USGS. U.S. Geological Survey *Mineral Commodity Summaries* (2017). Washington, DC, United States Government Printing Office, pp. 42-44.
611. Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161-1208.
612. Vallee, B. L. i Ulmer, D. D. (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annual Review of Biochemistry*, 41(1), 91-128.
613. van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., Cornelissen, F., Mus, A. M., Floencia, E., Prens, E. P., Lubberts, E. (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *The Journal of Immunology*, 182(9), 5836-5845.
614. van Smeden, J. i Bouwstra, J. A. (2016). Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients. In *Skin Barrier Function*, Karger Publishers, pp 8-26.
615. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., Stockinger, B. (2006). TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), 179-189.
616. Vermeij, W. P., Alia, A., Backendorf, C. (2011). ROS quenching potential of the epidermal cornified cell envelope. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(7), 1435-1441.
617. Vital, A. L., Goncalo, M., Cruz, M. T., Figueiredo, A., Duarte, C. B., Lopes, M. C. (2004). The sensitizers nickel sulfate and 2, 4-dinitrofluorobenzene increase CD40 and IL-12 receptor expression in a fetal skin dendritic cell line. *Bioscience reports*, 24(3), 191-202.
618. von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunology*, 6(4), 338-344.
619. Waage, A., Shalaby, R., Terje, E. (1992). Tumour necrosis factor, interleukin-1, interleukin-6, interleukin-8, and interferone-1 in septic shock. *Cytokines in Health and Diseases*, 151-164.
620. Waalkes, M. P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1-2), 107-120.
621. Waalkes, M. P. i Goering, P. L. (1990). Metallothionein and other cadmium-binding proteins: recent developments. *Chemical Research in Toxicology*, 3(4), 281-288.
622. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192(2-3), 95-117.
623. Wakabayashi, T., Hu, D. L., Tagawa, Y. I., Sekikawa, K., Iwakura, Y., Hanada, K., Nakane, A. (2005). IFN-γ and TNF-α are involved in urushiol-induced contact hypersensitivity in mice. *Immunology and Cell Biology*, 83(1), 18-24.
624. Walczak-Drzewiecka, A., Wyczółkowska, J., Dastyk, J. (2003). Environmentally relevant metal and transition metal ions enhance Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *Environmental Health Perspectives*, 111(5), 708-713.
625. Wang, B., Fujisawa, H., Zhuang, L., Freed, I., Howell, B.G., Shahid, S., Shivji, G.M., Mak, T.W., Sauder, D.N. (2000). CD4+ Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *Journal of Immunology*, 165, 6783-6790.
626. Wang, B., Zhuang, L., Fujisawa, H., Shinder, G. A., Feliciani, C., Shivji, G. M., Suzuki, H.,

- Amerio, P., Toto, P., Sauder, D. N. (1999). Enhanced epidermal Langerhans cell migration in IL-10 knockout mice. *The Journal of Immunology*, 162(1), 277-283.
627. Wang H., Bloom O., Zhang M., Vishnubhakat J. M., Ombrellino M., Che J., Frazier A., Yang H., Ivanova S., Borovikova L., Manogue K.R., Faist E., Abraham E., Andersson J., Andersson U., Molina P.E., Abumrad N.N., Sama A., Tracey K.J. (1999a) HMGB-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 285: 248– 251.
628. Wang H., Vishnubhakat J.M., Bloom O., Zhang M., Ombrellino M., Sama A., Tracey K.J. (1999b). Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituitary cells. *Surgery*, 126: 389-392.
629. Wang, H., Zhu, G., Shi, Y., Weng, S., Jin, T., Kong, Q., Nordberg, G. F. (2003). Influence of environmental cadmium exposure on forearm bone density. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(3), 553-560.
630. Wang, Z., MacLeod, D. T., Di Nardo, A. (2012). Commensal bacteria lipoteichoic acid increases skin mast cell antimicrobial activity against vaccinia viruses. *The Journal of Immunology*, 189(4), 1551-1558.
631. Wang, H., Yu, Y., Li, J., Wu, H., Sun, J., Zhang, Z., Geng, L., Yu, X., Liu, Z. (2017). Cadmium stimulates mouse skin fibroblast apoptosis by affecting intracellular homeostasis. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(1), 74-84.
632. Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L., Antonetti, F. R. (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clinical Immunology*, 7(1), S1.
633. Watanabe, H., Unger, M., Tuvel, B., Wang, B., Sauder, D. N. (2002). Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. *Journal of Interferon Cytokine Research*, 22(4), 407-412.
634. Watanabe, H., Gaide, O., Pétrilli, V., Martinon, F., Contassot, E., Roques, S., Kummer, J. A., Tschopp, J., French, L. E. (2007). Activation of the IL-1 $\beta$ -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(8), 1956-1963.
635. Watkin, R. D., Nawrot, T., Potts, R. J., Hart, B. A. (2003). Mechanisms regulating the cadmium-mediated suppression of Sp1 transcription factor activity in alveolar epithelial cells. *Toxicology*, 184(2-3), 157-178.
636. Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Harrington, L. E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual Review of Immunology*, 25, 821-852.
637. Webb, M. (1972). Binding of cadmium ions by rat liver and kidney. *Biochemical Pharmacology*, 21(20), 2751-2765.
638. Weber, F. C., Nemeth, T., Csepregi, J. Z., Dudeck, A., Roers, A., Ozsvári, B., Oswald, E., Puskas L. G., Jakob, T., Mocsai, A., Martin, S. F. (2015). Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *Journal of Experimental Medicine*, 212(1), 15-22.
639. WHO. World Health Organization (1992). *Environmental Health Criteria 134: Cadmium*, first ed., Geneva, Switzerland.
640. WHO. World Health Organization (2011). *Guidelines for Drinking-Water Quality: Cadmium in Drinking-water*, fourth ed., Geneva, Switzerland.
641. Wibowo, A. A. E., Herber, R. F. M., Das, H. A., Roeleveld, N., Zielhuis, R. L. (1986). Levels of metals in hair of young children as an indicator of environmental pollution. *Environmental Research*, 40(2), 346-356.
642. Williams, I. R. & Kupper, T. S. (1996). Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sciences*, 58(18), 1485-1507.
643. Wilsson, Å., Lind, S., Öhman, L., Nilsson-Augustinsson, Å., Lundqvist-Setterud, H. (2008). Apoptotic neutrophils containing *Staphylococcus epidermidis* stimulate macrophages to release the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 53(1), 126-135.

644. Wintergerst, E. S., Maggini, S., Hornig, D. H. (2007). Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51(4), 301-323.
645. Wolf, B. J., Tatituri, R. V., Almeida, C. F., Le Nours, J., Bhowruth, V., Johnson, D., Uldrich, A. P., Hsu, F. F., Brigl, M., Besram, G. S., Rossjohn, J., Godfrey, D.I., Brenner, M. B. (2015). Identification of a potent microbial lipid antigen for diverse NKT cells. *The Journal of Immunology*, 195(6), 2540-2551.
646. Wolff, M. J., Leung, J. M., Davenport, M., Poles, M. A., Cho, I., Loke, P. N. (2012). TH17, TH22 and Treg cells are enriched in the healthy human cecum. *PLoS One*, 7(7).
647. Wright, J. A., Richards, T., Srail, S. K. (2014). The role of iron in the skin and cutaneous wound healing. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 156.
648. Xu, B., Chen, S., Luo, Y., Chen, Z., Liu, L., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., Chen, L., Huang, S. (2011). Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen species and activation of MAPK/mTOR network. *PloS One*, 6(4), e19052.
649. Xu, H., Dilulio, N.A., Fairchild, R.L. (1996). T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon  $\gamma$ -producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin(IL) 4/10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 183, 1001–1012.
650. Xu, H., Banerjee, A., Dilulio, N. A., Fairchild, R. L. (1997). Development of effector CD8+ T cells in contact hypersensitivity occurs independently of CD4+ T cells. *The Journal of Immunology*, 158(10), 4721-4728.
651. Yamada, H., Uenishi, R., Suzuki, K., Koizumi, S. (2009). Cadmium-induced alterations of gene expression in human cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(1), 61-69.
652. Yamamoto, A., Watanabe, H., Sueki, H., Nakanishi, T., Yasuhara, H., Iijima, M. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK 222584 inhibits both the induction and elicitation phases of contact hypersensitivity. *The Journal of Dermatology*, 34(7), 419-429.
653. Yamano, T., DeCicco, L. A., Rikans, L. E. (2000). Attenuation of cadmium-induced liver injury in senescent male fischer 344 rats: role of Kupffer cells and inflammatory cytokines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 162(1), 68-75.
654. Yeh, J. H., Huang, C. C., Yeh, M. Y., Wang, J. S., Lee, J. K., Jan, C. R. (2009). Cadmium-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation and subsequent apoptosis in renal tubular cells. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology*, 104(5), 345-351.
655. Yoshida, K., Yokouchi, M., Nagao, K., Ishii, K., Amagai, M., Kubo, A. (2013). Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *Journal of Dermatological Science*, 71(2), 89-99.
656. Yoshizawa, Y., Kitamura, K., Maibach, H. I., (1999). Successful immunotherapy of chronic prurigo with topical dinitrochlorobenzene (DNCB). *British Journal of Dermatology*, 141, 387-389.
657. Yoshizawa, Y., Matsui, H., Izaki, S., Kitamura, K., Maibach, H. I. (2000). Topical dinitrochlorobenzene therapy in the treatment of refractory atopic dermatitis: systemic immunotherapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(2), 258-262.
658. Yu, Y. R., O'Koren, E. G., Hotten, D. F., Kan, M. J., Kopin, D., Nelson, E. R., Que, L., Gunn, M. D. (2016). A Protocol for the Comprehensive Flow Cytometric Analysis of Immune Cells in Normal and Inflamed Murine Non-Lymphoid Tissues. *PloS One*, 11(3), e0150606-e0150606.
659. Yuan, Y., Jiang, C. Y., Xu, H., Sun, Y., Hu, F. F., Bian, J. C., Liu, X. Z., Gu, J. H., Liu, Z. P. (2013). Cadmium-induced apoptosis in primary rat cerebral cortical neurons culture is mediated by a calcium signaling pathway. *PloS one*, 8(5).
660. Yucesoy, B., Turhan, A., Ure, M., Imir, T., Karakaya, A. (1997). Effects of occupational lead and cadmium exposure on some immunoregulatory cytokine levels in man. *Toxicology*, 123(1-2), 143-147.
661. Zalups, R. K. i Ahmad, S. (2003). Molecular handling of cadmium in transporting epithelia.

Toxicology and Applied Pharmacology, 186(3), 163-188.

662. Zarros, A., Skandali, N., Al-Humadi, H., Liapi, C. (2008). Cadmium (Cd) as a carcinogenetic factor and its participation in the induction of lung cancer. *Pneumonia*, 21(2), 172-177.

663. Zemelka-Wiącek, M., Majewska-Szczepanik, M., Pyrczak, W., Szczepanik, M. (2013). Complementary methods for contact hypersensitivity (CHS) evaluation in mice. *Journal of Immunological Methods*, 387(1-2), 270-275.

664. Zeng, X., Jin, T., Jiang, X., Kong, Q., Ye, T., Nordberg, G. F. (2004). Effects on the prostate of environmental cadmium exposure—A cross-sectional population study in China. *Biometals*, 17(5), 559-566.

665. Zhang, E. Y., Chen, A. Y., Zhu, B. T. (2009). Mechanism of dinitrochlorobenzene-induced dermatitis in mice: role of specific antibodies in pathogenesis. *PLoS One*, 4(11).

666. Zhang, L., Wang, Y., Wu, G., Xiong, W., Gu, W., Wang, C. Y. (2018). Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis?. *Respiratory Research*, 19(1), 170.

667. Zhang, W. L., Du, Y., Zhai, M. M., Shang, Q. (2014). Cadmium exposure and its health effects: a 19-year follow-up study of a polluted area in China. *Science of the Total Environment*, 470, 224-228.

668. Zhong, Z., Troll, W., Koenig, K. L., Frenkel, K. (1990). Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Research*, 50(23), 7564-7570.

669. Zyadah, M. A. i Abdel-Baky, T. E. (2000). Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc, and cadmium in some aquatic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(5), 740-747.

## **BIOGRAFIJA**

Dina M. Tucović rođena je 1989. godine u Beogradu. Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2008/2009. godine, na smeru Molekularna biologija i fiziologija. Fakultet je završila u oktobru 2014. godine, sa prosečnom ocenom 8.02 i diplomskim radom pod nazivom „Uticaj agoniste glukokortikoidnog receptora (jedinjenja A) u modulaciji eksperimentalno indukovano dijabetesa tipa 1 kod C57BL/6 miševa” sa ocenom 10. Doktorske studije upisala je školske 2014/2015. godine na modulu Imunobiologija, na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, i položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,64. Od 01.09.2016. godine, Dina je kao istraživač pripravnik zaposlena na Odeljenju za ekologiju, u grupi za imunotoksikologiju, Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković”-Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, gde je volontirala od momenta diplomiranja do zasnivanja radnog odnosa. Zvanje istraživač-saradnik stiče u septembru 2017. godine. Dina je do sada bila autor/koautor na 13 radova u časopisima međunarodnog značaja, ima deset saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i četiri saopštenja na skupovima nacionalnog značaja. Iz doktorske disertacije proistekla su dva rada, u časopisima M21 i M22 kategorije. Od 2018. godine, Dina je aktivni član Društva imunologa Srbije.