

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marina M. Ninkov

**Intestinalni i sistemski imunski efekti  
oralnog unosa kadmijuma kod pacova**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marina M. Ninkov

**Intestinal and systemic immune effects  
of oral cadmium intake in rats**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

**MENTORI:**

**Dr Aleksandra Popov Aleksandrov**

naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",

**Dr Milena Kataranovski**

redovni profesor Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet  
naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Dr Aleksandra Popov Aleksandrov**

naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

**Dr Milena Kataranovski**

redovni profesor Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet  
naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

**Dr Vesna Matović**

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Ova doktorska disertacija urađena je na odeljenju za Ekologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u okviru projekta #173039 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, a pod rukovodstvom dr Milene Kataranovski i dr Aleksandre Popov Aleksandrov.

Zahvaljujem se dr Mileni Kataranovski na upoznavanju sa čarobnim svetom imunologije, na ogromnom znanju koje mi je prenela, usmeravanju tokom planiranja eksperimenata, podršci, razumevanju i strpljenju pri izradi ove disertacije. Hvala dr Aleksandri Popov Aleksandrov na beskrajnoj podršci od prvih maglovitih zamisli o ovoj disertaciji, preko tumačenja rezultata, pisanja radova do konačne verzije doktorske disertacije spremne za štampu. Zahvaljujem se i ostalim saradnicima sa projekta #173039: dr Draganu Kataranovski, dr Ivani Mirkov, Jeleni Demenesku i Dini Mileusnić koji su postali moja druga porodica. Takođe, hvala dr Lidiji Zolotarevski, dr Vesni Suboti i dr Iliji Brčeski čija je nesebična pomoć velikim delom doprinela izradi rezultata ove disertacije.

Hvala kolegi Nikoli Tataloviću na pomoći oko svih nerešivih problema u laboratoriji i veliko hvala kolegamicama i kolegama grupe za Imunologiju Instituta za Biološka Istraživanja „Siniša Stanković“.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Jasmini i Milenku Ninkov, koji nikada nisu prestali da veruju u mene i čija bezgranična ljubav mi je dala snagu kad je bilo najteže.

Hvala Bojanu Vasiljeviću na strpljenju, svakodnevnoj podršci i ljubavi.

## INTESTINALNI I SISTEMSKI IMUNSKI EFEKTI ORALNOG UNOSA KADMIJUMA KOD PACOVA

### Rezime

Kadmijum (Cd) je teški metal koji se nalazi u svim delovima životne sredine, nema poznatu biološku funkciju i ima štetno dejstvo na žive sisteme. Najčešći put izloženosti Cd je oralni, preko kontaminirane vode i hrane, kada je primarna meta toksičnosti ovog metala gastrointestinalni trakt. Poznato je da Cd oštećuje tkivo creva i remeti funkciju epitelne barijere koja je neophodna za održavanje imunske homeostaze, međutim mehanizmi imunotoksičnosti u ovoj regiji nisu dovoljno ispitani. Dodatno, poznato je da toksični efekti Cd mogu da zavise i od genetske osnove / soja eksperimentalnih životinja, ali sojne razlike u intestinalnoj toksičnosti oralnog unosa Cd do sada nisu ispitane.

Ova disertacija je imala za cilj karakterizaciju efekta subhronične oralne primene Cd na imunski sistem creva pacova. Pacovi su bili 30 dana oralno (u vodi za piće) izloženi Cd u obliku kadmijum hlorida ( $\text{CdCl}_2$ ) u koncentraciji 5 ppm (5 mg Cd/l) i 50 ppm (50 mg Cd/l) Cd, što odgovara dozama prisutnim u životnoj sredini. U okviru lokalnog imunomodulatornog efekta Cd ispitivani su osnovni parametri imunskog odgovora u duodenumu (kao mestu najveće apsorpcije Cd) i mezenteričnim limfnim čvorovima (MLČ) koji dreniraju intestinum. U duodenumu su ispitani pokazatelji tkivnog oštećenja, oksidativnog stresa i zapaljenskih promena, a u MLČ su ispitane osnovne fenotipske karakteristike i parametri aktivnosti ćelija ovog limfnog tkiva (celularnost, proliferacija, citokinski odgovor, urođeno-imunska aktivnost ćelija). Pored lokalnog, ispitan je i sistemski odgovor na oralni unos Cd uključujući humoralne i ćelijske parametre zapaljenske reakcije u krvi (promene hematoloških parametara, prisustvo medijatora inflamacije i oksidativnog stresa), kao i oksidativni stres i osnovne karakteristike urođenog i adaptivnog imunskog odgovora u slezini, limfnom organu u kome se uspostavlja imunski odgovor na antigene iz krvi. U cilju ispitivanja uticaja genetske osnove na intestinalnu i sistemsku imunotoksičnost oralne izloženosti Cd, lokalni i sistemski efekti su analizirani kod dva soja pacova, Dark Agouti (DA) i Albino

Oxford (AO), koji uspostavljaju kvalitativno i / ili kvantitativno različit imunski odgovor na iste stimuluse.

Studija je pokazala da oralni tretman Cd dovodi do dozno zavisne akumulacije metala u crevu, MLČ i slezini, slično kod DA i AO pacova, što pokazuje da genetska osnova ne utiče na nivoe deponovanog metala. I pored sličnih koncentracija Cd u crevu oba soja, izraženiji infiltrat mononuklearnih leukocita u tkivu creva, veći stepen nekroze enterocita [meren povećanjem markera nekroze HMGB1 (engl., High Mobility Group Box 1) molekula] i povećana produkcija proinflamatornih citokina (faktora nekroze tumora/TNF, interferona-gama/IFN- $\gamma$ , interleukina-17/IL-17) pokazani su u tkivu creva DA pacova u odnosu na pacove AO soja. Promena aktivnosti osnovnih enzima antioksidativne odbrane (superoksid dismutaze/SOD i katalaze/CAT), u crevu DA pacova i SOD kod AO pacova, koja predstavlja pokušaj domaćina da ukloni reaktivne kiseonične vrste (engl., Reactive Oxygen Species/ROS) i ograniči oštećenje tkiva, kao i glutation-s-transferaze/GST (enzima odgovornog za vezivanje elektrofilnih supstanci kao što je Cd za redukovani glutation, GSH) bila je takođe izraženija kod pacova DA soja. Ovakav tip promena je verovatno u osnovi povećanja nivoa lipidnih peroksida (mereno promenama malondialdehida/MDA) kod AO pacova. Oralni tretman Cd dovodi do smanjene zastupljenosti laktobacila u crevu DA pacova što može doprineti razvoju proinflamatornog citokinskog odgovora na Cd, dok relativno očuvanje komensalne flore kod AO pacova (uz značajan porast zastupljenosti *L. johnsonii* i *L. murinus*) može biti od značaja za očuvanje integriteta crevne barijere i izostanak lokalnog inflamatornog citokinskog odgovora kod ovog soja pacova.

Oralni tretman Cd je uticao na aktivnost MLČ kod oba soja pacova (porast mase i celularnosti MLČ, produkcija ROS). Ipak, Cd je indukovao ekspresiju gena za metalotioneine/MT kao i proinflamatorni imunski odgovor (proliferativna aktivnost ćelija MLČ, oksidativne aktivnosti, Th1/Tip1 i Th17/tip17 odgovor) i inhibirao anti-inflamatorni odgovor (ekspresija gena i produkcija interleukina-10/IL-10) samo u MLČ DA pacova. Veći stepen oštećenja i nekroze epitela creva koji je zapažen kod tretiranih DA (u odnosu na AO pacove) je najverovatniji faktor koji je doveo do stimulacije proinflamatornog odgovora u MLČ kod DA pacova. Promene u MLČ DA pacova ukazuju da Cd remeti tolerogenu imunsku sredinu u crevu indukcijom kako urođenog tako i stečenog imunskog odgovora.

Iako je ispitivanjem sistemskog efekta oralno unetog Cd ukazano, generalno, na slab uticaj metala na osnovne hematološke i biohemijske parametare u perifernoj krvi, zapažen je efekat na antioksidativne aktivnosti eritrocita kod oba soja pacova. Povećani nivoi HMGB1 molekula u krvi samo DA pacova sugerišu veći stepen oštećenja organa i inflamatorni karakter imunskog odgovora na Cd kod ovog soja pacova.

Iako se ista količina Cd deponuje u MLČ i slezini, odgovor u ova dva imunska organa se razlikuje čime je pokazano da je za praćenje efekata Cd od velike važnosti i mikrosredina ispitivanog tkiva. Za razliku od MLČ, u slezini oralni tretman Cd nije uticao na masu i celularnost ali je doveo do smanjene vijabilnosti i smanjene proliferativne aktivnosti ćelija slezine, dok je slično kao i u MLČ, zabeležena povećana oksidativna aktivnost ćelija slezine (aktivnost mijeloperoksidaze/MPO, produkcija azotoksida/NO) i povećana nestimulisana produkcija proinflamatornih citokina (interleukina-1 beta/IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17) i to samo kod DA pacova. Ovaj proinflamatorni citokinski odgovor ćelija slezine kod DA pacova može se dovesti u vezu sa povećanim nivoom HMGB1 molekula u slezini. Izraženiji proinflamatorni odgovor na oralni tretman Cd u crevu kao i u MLČ i slezini DA u odnosu na AO pacove (kod kojih su nađene slične koncentracije deponovanog Cd) pokazuju da su DA pacovi podložniji oralnom subhroničnom tretmanu ovim metalom.

Rezultati ove studije doprinose razumevanju mehanizama koji leže u osnovi toksičnih efekata Cd na imunski odgovor u crevu, pokazujući po prvi put uticaj ovog metala na homeostazu urođenih i adaptivnih komponenti imunskog odgovora u MLČ. Ona je istovremeno pokazala i značaj tkiva u ispoljavanju imunotoksičnosti Cd. Takođe, ova studija je po prvi put ukazala na uticaj genetske osnove na efekte oralno unešenog Cd, sugerišući na značaj pažljivog odabira soja eksperimentalnih životinja koji će se koristiti za analizu imunotoksičnih efekata ovog metala.

**Ključne reči:** Oralni unos kadmijuma, intestinalni imunski odgovor, mezenterični limfni čvorovi, slezina, DA i AO pacovi, sojne razlike, imunotoksičnost

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Imunobiologija

**UDK broj:** 546.48: [611.41/42+611.018.53+611.34] (043.3)

## INTESTINAL AND SYSTEMIC IMMUNE EFFECTS OF ORAL CADMIUM INTAKE IN RATS

### **Abstract**

Cadmium (Cd) is a heavy metal which is found in every part of the environment, it does not have any known biological function and has an adverse effect upon the living systems. The most common way of Cd exposure is orally, through contaminated water and food, where the prime target of this metal toxicity is the gastrointestinal tract. It is known that Cd causes damage to intestinal tissue and disrupts the epithelial barrier function which is necessary for maintaining immune homeostasis, however, the immunotoxicity mechanisms in this region have not been examined sufficiently. Additionally, it is known that Cd toxic effects may depend also on genetic background / strain of experimental animals, but the strain-dependent differences in intestinal toxicity of oral Cd intake have not been examined to date.

This dissertation was aimed at characterization of the effect of subchronic oral Cd administration on rat's intestinal immune system. Rats were, for 30 days, orally (in drinking water) exposed to Cd in the form of cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) at concentration of 5 ppm (5 mg Cd/l) and 50 ppm and (50 mg Cd/l) of Cd, which corresponds to the doses present in the environment. Within the local immunomodulatory Cd effect, basic parameters of immune response in duodenum (region of greatest Cd absorption) and in mesenteric lymph nodes (MLN) which drain intestine, were investigated. The indicators of tissue damage, oxidative stress and inflammatory changes were tested in duodenum, whereas in the MLN basic phenotype characteristics and parameters of this lymph tissue cells' activities (cellularity, proliferation, cytokine responses, and innate-immune cell activity) were tested. Besides the local, the systemic response to oral Cd intake was tested as well, including humoral and cellular parameters of the inflammatory reaction in blood (changes in hematological



parameters, presence of inflammatory mediators and oxidative stress), as well as oxidative stress and basic characteristics of the innate and adaptive immune response in the spleen, a lymph organ in which immune response to blood borne antigens are generated. Aiming to test the contribution of genetic background to intestinal and systemic immunotoxicity of oral Cd exposure, local and systemic effects were analyzed in two rat strains, Dark Agouti (DA) and Albino Oxford (AO), which establish qualitatively and/or quantitative different immune response to the same stimuli.

The study has shown that oral Cd treatment leads to dose-dependent accumulation of this metal in intestine, MLN and spleen, similarly in DA and AO rats, which demonstrates that genetic background has no effect on the metal deposition levels. Despite similar Cd concentrations in the intestine of both rat strains, more pronounced mononuclear leukocytes infiltrates in intestinal tissue, higher degree of enterocytes necrosis [measured by increased necrosis marker HMGB1 (High mobility group box 1) molecule] and the increased production of proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor/TNF, interferone-gamma/IFN- $\gamma$ , interleukin-17/IL-17) were shown in intestinal tissue of DA rats compared to rats of AO strain. The change in activity of basic enzymes of anti-oxidative defense (superoxide dismutase/SOD and catalase/CAT), in intestine of DA rats and SOD in AO rats, which depicts host tissue attempt to counterattack reactive oxygen species (ROS) and limit tissue damage, as well as glutathione-s-transferase/GST (the enzyme responsible for electrophilic substances binding, such as Cd, to the reduced form of glutathione, GSH), was also more expressed in rats of DA strain. Such type of changes is probably in the background of the increased level of lipid peroxides (measured by the changes of malondialdehyde/MDA) in AO rats. Oral Cd treatment results in reduced prevalence of lactobacilli in DA rats' intestine which may contribute to the development of proinflammatory cytokine response to Cd, whereas relative preservation of commensal flora in AO rats (along with significant increase in prevalence of *L. johnsonii* and *L. Murinus*) might be of significance for preservation of gut barrier integrity and absence of the local inflammatory cytokine response in this strain of rats.

Oral Cd treatment affected the MLN activity in both strains of rats (increase of MLN mass and cellularity, ROS production). Nevertheless, Cd induced metalotioneinas/MT gene expression as well as proinflammatory immune response

(MLN cells' proliferative activity, oxidative activities, Th1/Type1 and Th17/Type17 response) and inhibited anti-inflammatory response (interleukine-10/IL-10 gene expression and production) only in MLN of DA rats. Higher degree of intestinal epithelium damage and necrosis observed in DA treated rats (compared to AO rats) is the most likely factor which stimulated proinflammatory response in MLN of DA rats. The changes in MLN of DA rats indicate that Cd disrupts the tolerogenic immune environment in the gut by induction of both innate and the acquired immune responses.

Although the investigation of the systemic effect of orally administered Cd indicated, in general, slight effect of the metal on the basic hematological and biochemical parameters in the peripheral blood, the effect on anti-oxidative activities of erythrocytes in both strains of rats was noticed. The increased levels of HMGB1 molecule in blood of DA rats only, suggests higher degree of organs damage and inflammatory character of immune response to Cd in this strain of rats.

Although the same quantity of Cd is deposited in MLN and spleen, the response in these two immune organs differs, showing that the micro environment of the examined tissue is also of great importance in observing Cd effects. Unlike MLN, the oral Cd administration did not affect spleen mass and cellularity but it resulted in reduced viability and reduced proliferative activity of spleen cells, whereas, similar as in MLN, the increased oxidative activity of spleen cells (activity of myeloperoxidase/MPO, nitrogen-oxide/NO production) was noted and the increase of non-stimulated production of proinflammatory cytokines (interleukine-1 beta/ IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17) was noted, only in DA rats. This proinflammatory cytokine response of spleen cells in DA rats may be associated with increased level of HMBG1 molecule in the spleen. More pronounced proinflammatory response to oral Cd administration in gut as well as in MLN and spleen of DA rats in comparison to AO rats (in which similar concentrations of deposited Cd were found) show that DA rats are more susceptible to oral subchronic administration of this metal.

The results of this study contribute to the understanding of the mechanisms which underlie the toxic Cd effects on immune response in intestine, for the first time showing the effect of this metal on homeostasis of innate and adaptive components of immune response in MLN. At the same time, this study has also shown the significance of tissue in expressing Cd toxicity. Also, for the first time, this study has indicated the

effect of genetic background on orally administered Cd effects, suggesting the significance of careful selection of experimental animals to be used in the analysis of immunotoxic effects of this metal.

**Key words:** oral cadmium administration, intestinal immune response, mesenteric lymph nodes, spleen, DA and AO rats, strain differences, immunotoxicity.

**Research area:** Biology

**Area of special interest:** Immunobiology

**UDC number:** 546.48: [611.41/42+611.018.53+611.34] (043.3)

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Kadmijum .....	1
1.1.1. Rasprostranjenost kadmijuma u životnoj sredini i njegova primena.....	2
1.1.2. Izloženost kadmijumu .....	3
1.1.3. Apsorpcija i distribucija kadmijuma.....	4
1.1.4. Uklanjanje kadmijuma iz organizma .....	5
1.2. Metalotioneini i toksikologija kadmijuma.....	6
1.3. Mehanizmi toksičnosti kadmijuma.....	6
1.4. Štetni efekti kadmijuma na zdravlje ljudi.....	7
1.5. Ispitivanje toksičnih efekata kadmijuma na eksperimentalnim modelima.....	9
1.6. Efekti kadmijuma na imunski sistem .....	9
1.6.1. Imunski sistem-kratak pregled .....	10
1.6.2. Imunotoksičnost kadmijuma .....	12
1.7. Efekti kadmijuma na gastrointestinalni sistem.....	13
1.7.1. Imunski sistem creva .....	14
1.7.2. Intestinalna toksičnost kadmijuma .....	16
1.7.3. Efekat kadmijuma na mikrobiotu creva.....	17
1.8. Doprinos genetičke osnove (soja) toksičnim efektima kadmijuma.....	18
<b>2. CILJEVI</b> .....	19
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	20
3.1. Hemikalije i reagensi.....	20
3.2. Ekperimentalne životinje.....	21
3.3. Tretman pacova kadmijumom .....	21
3.4. Praćenje osnovnih metaboličkih parametara .....	21
3.5. Određivanje tkivne dispozicije kadmijuma .....	22

3.6. Histologija .....	23
3.7. Ispitivanje promena u duodenumu .....	24
3.7.1. Homogenizacija tkiva .....	24
3.7.2. DGGE (Engl, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, elektroforeza u gradijentu denaturišućeg agensa) analiza .....	24
3.7.2.1. Sekvenciranje DGGE traka .....	25
3.7.3. Određivanje nivoa HMGB1 (High Mobility Group Box1) molekula Western blot metodom .....	26
3.7.3.1. Izolacija tkivnih homogenata .....	26
3.7.3.2. Elektroforetsko razdvajanje proteina na poliakrilamidnom gelu .....	26
3.7.3.3. Prenos proteina na membranu .....	26
3.7.3.4. Imunoblot analiza proteina - Western blot .....	26
3.7.4. Određivanje koncentracije proteina Lowry-jevom metodom.....	27
3.7.5. Procena parametara oksidativnog stresa.....	28
3.7.5.1. Određivanje nivoa malondialdehida (MDA).....	28
3.7.5.2. Određivanje nivoa redukovanog glutationa - GSH .....	28
3.7.5.3. Merenje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite: superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation-S-transferaze(GST) .....	29
3.7.5.4. Merenje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO) u homogenatu tkiva.....	30
3.7.6. Određivanje produkcije citokina (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-10) u homogenatu duodenuma imunoenzimskim testom na čvrstoj fazi (engl, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay/ELISA) .....	30
3.8. Ispitivanje promena u mezenteričnim limfnim čvorovima (MLČ) i slezini.....	30
3.8.1. Priprema ćelija mezenteričnih limfnih čvorova .....	30
3.8.2. Ispitivanje promena u tkivu slezine.....	31
3.8.3. Priprema ćelija slezine.....	31
3.8.4. Merenje proliferativnog odgovora ćelija MLČ i slezine .....	32

3.8.5. Procena apoptoze ćelija MLČ i slezine dvostrukim bojenjem aneksinom V i propidijum jodidom .....	32
3.8.6. Fenotipska karakterizacija ćelija MLČ i slezine protočnom citofluorimetrijom.....	33
3.8.7. Merenje produkcije citokina u kondicioniranom medijumu kulture ćelija imunoenzimskim testom na čvrstoj fazi .....	34
3.8.8. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (Engl, Real Time-Polymerase Chain Reaction /RT-PCR) .....	34
3.8.8.1. Priprema uzoraka za reakciju lančanog umnožavanja.....	34
3.8.8.2. Reakcija reverzne transkripcije .....	35
3.8.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja .....	35
3.8.9. Određivanje aktivnosti unutarćelijske mijeloperoksidaze (MPO).....	36
3.8.10. Određivanje nivoa produkovanog azot monoksida (NO) u kondicioniranom medijumu kulture ćelija Griess-ovom reakcijom .....	37
3.8.11. Određivanje nivoa unutarćelijskog redukovanog glutationa (GSH) .....	37
3.8.12. Određivanje produkcije reaktivnih vrsta kiseonika citoheimijskim NBT testom .....	38
3.8.13. Određivanje produkcije reaktivnih vrsta kiseonika procenom zastupljenosti dihidroksirodamin pozitivnih ćelija.....	38
3.9. Ispitivanje promena u perifernoj krvi .....	38
3.9.1. Merenje nivoa proteina akutne faze.....	39
3.9.2. Određivanje koncentracije alanin-aminottransferaza (ALT) i aspartat aminottransferaza (AST) .....	39
3.9.3. Određivanje nivoa citokina u plazmi ELISA testom.....	39
3.9.4. Priprema uzoraka seruma za određivanje nivoa HMGB1 Western blot metodom .....	40
3.9.5. Određivanje diferencijalnog sastava leukocita iz razmaza periferne krvi.....	40
3.9.6. Određivanje diferencijalnog sastava leukocita periferne krvi automatizovanom metodom .....	40
3.9.7. Određivanje hematoloških parametara .....	40
3.9.8. Procena oksidativnog stresa u eritrocitima.....	41
3.9.8.1. Izolacija eritrocita .....	41

3.9.8.2. Određivanje koncentracije hemoglobina .....	41
3.9.8.3. Merenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD, EC. 1.15.1.1 ) u eritrocitima .....	41
3.9.8.4. Merenje aktivnosti katalaze (CAT, EC. 1.11.1.6) u eritrocitima .....	41
3.10. Ispitivanje promena u bubrezima .....	42
3.10.1. Određivanje nivoa kreatinina i $\beta$ -mikroglobulina .....	42
3.10.2. Određivanje biohemijskih parametara u urinu .....	42
3.11. Statistika .....	43
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>43</b>
4.1. Deponovanje kadmijuma.....	44
4.2. Efekat oralno unetog kadmijuma na jetru i bubrege.....	45
4.2.1. Parametri oštećenja i funkcije jetre .....	45
4.2.1.1. Histopatološka analiza tkiva jetre.....	45
4.2.1.2. Efekat oralnog tretmana kadmijumom na koncentraciju alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat- aminotransferaze (AST) u serumu .....	46
4.2.2. Parametri oštećenja i funkcije bubrega.....	46
4.2.2.1. Histopatološka analiza tkiva bubrega .....	46
4.2.2.2. Uticaj oralnog unosa kadmijuma na koncentraciju $\beta$ 2-mikroglobulina i kreatinina u serumu i urinu.....	46
4.2.2.3. Biohemijski parametri u urinu.....	47
4.3. Efekat oralnog unosa kadmijuma na crevo .....	47
4.3.1. Histopatološke promene .....	47
4.3.2. Parametri oksidativnog stresa određivani u homogenatu duodenuma .....	49
4.3.2.1. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutathion-S-transferaze (GST) .....	49
4.3.2.2. Step en oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana (nivo malondialdehida/MDA).....	51
4.3.2.3. Redukovani glutathion (GSH).....	51

4.3.2.4. Aktivnost mijeloperoksidaze (MPO) u homogenatu creva .....	52
4.3.3. Medijatori imunskog odgovora u homogenatu creva .....	53
4.3.3.1. Koncentracija HMGB1 molekula.....	53
4.3.3.2. Citokinski odgovor u homogenatu creva.....	53
4.3.4. Efekat kadmijuma na mikrobiom creva - analiza efekata na soj <i>Lactobacillus</i> .....	56
4.4. Efekat kadmijuma na mezenterične limfne čvorove (MLČ) .....	58
4.4.1. Pregled opštih parametara MLČ (masa MLČ, celularnost, osnovne subpopulacije T limfocita, vijabilnost i proliferativni odgovor ćelija).....	58
4.4.2. Efekat oralnog unosa kadmijuma na ekspresiju gena za metalotioneine 1 i 2 (MT1 i MT2) od strane ćelija MLČ .....	60
4.4.3. Efekat oralnog unosa kadmijuma na nivo unutarćelijskog redukovanog glutationa (GSH) u ćelijama MLČ .....	60
4.4.4. Efekat kadmijuma na urođeni imunski odgovor u MLČ.....	61
4.4.4.1. Fenotipska karakterizacija ćelija urođene imunosti u MLČ .....	61
4.4.4.2. Efekat kadmijuma na oksidativne aktivnosti ćelija MLČ .....	62
4.4.5. Efekat kadmijuma na citokinski odgovor ćelija MLČ .....	64
4.4.5.1. Ekspresija gena i produkcija IL-1 $\beta$ .....	64
4.4.5.2. Efekat kadmijuma na ekspresiju gena i produkciju citokina IFN- $\gamma$ i IL-17 .....	66
4.4.5.3. Ekspresija gena i produkcija anti-inflamatornog citokina IL-10.....	70
4.5. Sistemski efekat oralno unetog kadmijuma.....	72
4.5.1. Efekat kadmijuma na leukocite periferne krvi .....	72
4.5.1.1. Ukupan broj i diferencijalni sastav leukocita periferne krvi .....	72
4.5.1.2. Hematološki parametri periferne krvi.....	73
4.5.2. Aktivnost enzima antioksidativne odbrane (SOD i CAT) u eritrocitima .....	74
4.5.3. Efekat kadmijuma na humoralne činioce sistemske zapaljenjske reakcije .....	75
4.5.3.1. Proteini akutne faze .....	76
4.5.3.2. Efekat kadmijuma na koncentraciju TNF, IL-1 $\beta$ i IL-6 u plazmi pacova .....	76



4.5.3.3. Koncentracija HMGB1 molekula u serumu .....	76
4.6. Efekat oralnog tretmana kadmijumom na slezinu .....	76
4.6.1. Histopatološke promene u slezini .....	77
4.6.2. Diferencijalni sastav leukocita slezine .....	77
4.6.3. Pregled opštih parametara slezine (masa slezine, celularnost, osnovne subpopulacije T limfocita, vijabilnost i proliferativni odgovor) .....	78
4.6.4. Odgovor ćelija slezine na stres indukovan oralnim unosom kadmijuma .....	79
4.6.4.1. Efekat oralnog unosa kadmijuma na ekspresiju gena za metalotioneine 1 i 2 (MT1 i MT2) od strane ćelija slezine .....	79
4.6.4.2. Efekat oralnog unosa kadmijuma na nivo unutarćelijskog redukovano glutaciona (GSH) u ćelijama slezine .....	80
4.6.5. Efekat kadmijuma na urođeni imunski odgovor u slezini .....	81
4.6.5.1. Fenotipska karakterizacija ćelija urođene imunosti u slezini .....	81
4.6.5.2. Efekat kadmijuma na oksidativne aktivnosti ćelija urođene imunosti u slezini .....	81
4.6.5.3. Koncentracija HMGB1 molekula u slezini .....	83
4.6.6. Efekat kadmijuma na citokinski odgovor ćelija slezine .....	84
4.6.6.1. Produkcija IL-1 $\beta$ .....	84
4.6.6.2. Produkcija IFN- $\gamma$ i IL-17 .....	85
4.6.6.3. Efekat oralnog unosa kadmijuma na produkciju anti-inflamatornog citokina IL-10 u kondicioniranom medijumu ćelija slezine .....	85
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	86
5.1. Osnovni parametri toksičnosti oralne primene Cd kod pacova .....	87
5.2. Deponovanje kadmijuma .....	88
5.3. Efekti oralnog unosa kadmijuma na jetru i bubrege .....	88
5.4. Efekat oralnog unosa kadmijuma na crevo .....	89
5.5. Efekti oralnog unosa kadmijuma na mezenterične limfne čvorove .....	94
5.6. Sistemski efekti oralnog unosa kadmijuma .....	100

5.7. Efekti oralnog unosa kadmijuma na slezinu.....	103
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>105</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>108</b>
<b>8. BIOGRAFIJA .....</b>	<b>139</b>
<b>9. IZJAVE .....</b>	<b>108</b>

## 1. UVOD

U toku mnogih industrijskih procesa stvara se otpadni materijal koji sadrži visoke koncentracije teških metala i koji dospeva u životnu sredinu. Teški metali se akumuliraju u životnoj sredini, nisu bio-razgradivi i zbog toga imaju direktan uticaj na žive organizme. Toksičnost svih metala oslobođenih u životnu sredinu daleko premašuje kombinovanu ukupnu toksičnost radioaktivnog i organskog otpada, posmatrano na godišnjem nivou. Usled ubrzanog procesa urbanizacije i industrijalizacije veliki deo (više od  $10^9$ ) ljudske populacije izložen je povišenim koncentracijama teških metala, koji su prisutni u svim delovima životne sredine. Procenjeno je da nekoliko miliona ljudi pati od subkliničkog trovanja teškim metalima (kao što su olovo, živa, arsenik) među kojima je i kadmijum (Cd) (Chang i drugi, 2012; Chen i drugi, 1997; Lee i drugi, 2006; Marth i drugi, 2001; Nriagu, 1988; Shi i drugi, 2008).

### 1.1. Kadmijum

Kadmijum su otkrili 1817 godine u Nemačkoj Friedrich Strohmeyer i Karl Samuel Leberecht Hermann kao nečistoću u cink karbonatu. Naziv *kadmijum* potiče od latinske reči *cadmia* (u značenju "kalamini", mešavina minerala koja sadrži Cd), a koja je nazvana po liku iz grčke mitologije Kadmosu, osnivaču grada Tebe (Carageorgiou i Katramadou, 2012; Mahiya i drugi, 2014). Kadmijum je hemijski element i nalazi se u IIb grupi, sa atomskim brojem 48, atomskom masom 112.4, gustinom  $8.65 \text{ g cm}^{-3}$ , tačkom topljenja na  $320.9 \text{ °C}$  i tačkom ključanja na  $765 \text{ °C}$  (Jarup, 2003; Mahiya i drugi, 2014). U jedinjenjima, Cd se nalazi u obliku dvovalentnog jona  $\text{Cd}^{2+}$  (Shi i drugi, 2008) i ne podleže oksido-redukcionim reakcijama. U vodi, Cd se nalazi u obliku hidratisanog jona ili jonskog kompleksa sa drugim supstancama (ATSDR, 2012). Kadmijum pretežno gradi jedinjenja sa halogenima (nemetali VIIb grupe: fluor, hlor, brom, jod), amonijakom i supstancama koje sadrže sumpor u okviru sulfhidrilnih grupa. Rastvorljivost Cd u vodi zavisi od pH pa se Cd vezan u sedimentima rastvara u slučaju povećane kiselosti sredine.

1																	18																												
H	2											13	14	15	16	17	18																												
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne																												
Na	Mg	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Al	Si	P	S	Cl	Ar																												
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr																												
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe																												
Cs	Ba	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn																												
Fr	Ra	Lr	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Uut	Fl	Uup	Lv	Uus	Uuo																												
		<table border="1"> <tr> <td>La</td> <td>Ce</td> <td>Pr</td> <td>Nd</td> <td>Pm</td> <td>Sm</td> <td>Eu</td> <td>Gd</td> <td>Tb</td> <td>Dy</td> <td>Ho</td> <td>Er</td> <td>Tm</td> <td>Yb</td> </tr> <tr> <td>Ac</td> <td>Th</td> <td>Pa</td> <td>U</td> <td>Np</td> <td>Pu</td> <td>Am</td> <td>Cm</td> <td>Bk</td> <td>Cf</td> <td>Es</td> <td>Fm</td> <td>Md</td> <td>No</td> </tr> </table>																La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No
La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb																																
Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No																																

**Slika 1.** Mesto kadmijuma u periodnom sistemu elemenata  
Preuzeto sa: [http://www.knowledgedoor.com/2/elements\\_handbook/cadmium.html](http://www.knowledgedoor.com/2/elements_handbook/cadmium.html)

U periodnom sistemu elemenata (Slika 1), Cd se nalazi odmah ispod cinka (Zn), neophodnog mikroelementa biljaka i životinja, sa kojim deli pojedine fizičke i hemijske odlike (Shi i drugi, 2008) zbog istog rasporeda elektrona unutar atoma ovih metala. Ipak, razlike postoje pa je Cd reaktivniji od Zn i formira kompleksnije molekule (Carageorgiou i Katramadou, 2012). Za sada, fiziološka uloga Cd nije poznata osim u slučaju morske dijatomeje *Thalassiosira weissflogii* kod koje je pokazano da Cd omogućava aktivnost ugljene anhidraze u uslovima niskih koncentracija Zn (Lane i Morel, 2000).

### 1.1.1. Rasprostranjenost kadmijuma u životnoj sredini i njegova primena

Kao zagađivač životne sredine, Cd zauzima osmo mesto na listi od dvadeset toksičnih supstanci (ATSDR 2012; WHO, 2011). Kadmijum je prisutan u svim delovima životne sredine: u vazduhu se nalazi u formi čestica od kojih je kadmijum-oksidi (CdO) najzastupljeniji, u zemljinoj kori je najčešće prisutan u kompleksu sa cinkom, gvožđem, olovom i bakrom u sulfatnim i fosfatnim rudama u koncentraciji između 0.1 i 0.5 ppm (mg/kg) dok je nivo Cd u okeanima između 5 i 110 ng/l. Koncentracija Cd u površinskim i podzemnim vodama je uglavnom < 1 µg/l. Najviša koncentracija od 100 µg/l izmerena je u reci Rio Rimao (Peru). U Saudijskoj Arabiji, 1988. godine nivo Cd u uzorcima vode uzetih sa česme i bunara iznosio je 1 – 26 µg/l (ATSDR, 2012; WHO, 2011).

Kadmijum dospeva u životnu sredinu iz prirodnih i antropogenih izvora. Prirodni izvori Cd su gasovi koji nastaju i oslobađaju se tokom vulkanskih erupcija, dim nastao usled šumskih požara i erozija stena u reke i mora (ATSDR, 2012). Samo aktivnošću vulkana Etne (Sicilija) u životnu sredinu se oslobodi oko 10 tona Cd godišnje (Carageorgiou i Katramadou, 2012). U slučaju antropogenih izvora najznačajnija je primena Cd u industriji i poljoprivredi. Kadmijum se najviše koristi u proizvodnji niki-kadmijumskih (Ni/Cd) baterija, pigmenta, plastike, elektronskih uređaja i antikoroziivnih supstanci. Kadmijum se oslobađa kao sporedna

supstanca tokom prečišćavanja ruda olova i cinka (Klaassen i drugi, 2009; Shi i drugi, 2008) kao i sagorevanjem fosilnih goriva (Carageorgiou i Katramadou, 2012). Proizvodi koji sadrže Cd retko se recikliraju, a često se odlažu zajedno sa kućnim otpadom čime se dodatno zagađuje životna sredina pogotovo ako se takav otpad spaljuje. Prirodni, kao i antropogeni izvori Cd, a posebno primena fosfatnih đubriva i kanalizacionog mulja na poljoprivrednom zemljištu dovode do zagađenja zemljišta ovim metalom i njegovog preuzimanja od strane biljaka koje se uzgajaju za ishranu ljudi i životinja (Jarup, 2003; Klaassen i drugi, 2009; Nriagu, 1988).

Skoro 100 godina od otkrića ovog metala Nemačka je bila glavni proizvođač Cd dok su danas vodeći proizvođači Kina, Južna Koreja, Kanada, Kazahstan i Japan (Carageorgiou i Katramadou, 2012). Primena Cd u Evropskoj uniji je smanjena tokom 1990-ih i to uvođenjem strožijih zakona koji se odnose na zaštitu životne sredine (Direktiva 91/338/ECC), a 2004. godine je sasvim zabranjena upotreba Cd u proizvodnji elektronskih uređaja.

Iako je emisija Cd u životnu sredinu smanjena tokom proteklih godina u razvijenim industrijskim zemljama, ovaj metal i dalje predstavlja faktor rizika za zdravlje dela populacije koji naseljava zagađena područja slabije razvijenih zemalja (u kojima je upotreba Cd u porastu) kao i za ljude koji su profesionalno izloženi ovom metalu (Chang i drugi, 2012; Jarup, 2003; Nriagu 1988; Rani i drugi, 2014; Zhang i drugi, 2014).

### **1.1.2. Izloženost kadmijumu**

Izloženost Cd može biti oralna (kontaminirane hrana i voda), inhalaciona (vazduh i duvanski dim) i perkutana (prašina, voda, duvanski dim) (Godt i drugi, 2006). Prema dužini trajanja, izloženost Cd može biti kratkotrajna odnosno akutna (14 dana i manje), srednje dužine trajanja odnosno subhronična (15–364 dana) i hronična (365 dana i više) (ATSDR, 2012). Poznati su slučajevi akutne (Barbee i Prince, 1999; Fernandez i drugi, 1996; Seidal i drugi, 1993) i hronične (Elinder i drugi, 1985) inhalacione toksičnosti Cd kod izloženih radnika. Na osnovu prijavljenih štetnih efekata Cd kod profesionalno izloženih jedinki, uvedena je zakonska granica koncentracije ovog metala u vazduhu na radnom mestu koja iznosi  $5 \mu\text{g Cd/m}^3$  vazduha (ATSDR, 2012). Pored izloženosti na radnom mestu, osnovni izvor Cd kome je izložena opšta populacija su kontaminirana hrana, voda kao i duvanski dim (Asar i drugi, 2000; Klaassen i drugi, 2009; Lalor, 2008; Nordberg, 2009; Park i drugi, 2002). U zapadnoj Evropi, Americi i Australiji, prosečni oralni dnevni unos Cd u populaciji nepušača koji naseljavaju regione koji nisu zagađeni ovim metalom je 10-25  $\mu\text{g}$ , od čega se vodom unese oko 2  $\mu\text{g Cd/dnevno}$ . Pušači su dodatno izloženi količini od 1.7  $\mu\text{g Cd}$  po

cigareti, od čega se oko 10 % preuzme tokom udisanja duvanskog dima. Dnevni oralni unos Cd u najzagađenijim područjima je 600-2000 µg/dnevno, a u drugim, manje zagađenim područjima oko 100-390 µg/dnevno (WHO, 1992). Zastupljenost Cd u različitim namirnicama varira, ali je količina ovog metala u voću, povrću i mesu životinja namenjenim za ljudsku ishranu uglavnom ispod 10 µg/kg, sa tim da su najviše koncentracije Cd nađene u životinjskim iznutricama kao što su jetra (10–100 µg/kg) i bubrezi (100–1000 µg/kg). Visok sadržaj Cd nađen je i u školjkama (200–1000 µg/kg) (Galal-Gorchev, 1991). Jedna studija sprovedena u Kini ukazala je na porast sadržaja Cd u pirinču sa 0.23 mg Cd/kg na 0.59 mg Cd/kg (u vremenskom intervalu od 19 godina) što je značajno više od dozvoljenog standarda za pirinač u Kini (0.20 mg Cd/kg) (Zhang i drugi, 2014). Procenjena letalna oralna doza Cd za ljude je 350-3500 mg Cd (WHO, 1992). Izmerene doze Cd u dva fatalna slučaja su bile 25 mg Cd/kg (unetog kao kadmijum-jodid, smrt je nastupila 7 dana nakon unosa) i 1.840 mg Cd/kg (kao kadmijum-hlorid) gde je do smrtnog ishoda došlo 33 sata nakon oralnog unosa. Do smrtnog ishoda usled namernog unošenja Cd dolazi usled gubitka tečnosti, edema i gubitka funkcije organa (ATSDR, 2012).

### **1.1.3. Apsorpcija i distribucija kadmijuma**

Oblik u kome se Cd nalazi, put i vremenski interval izloženosti utiču na apsorpciju i distribuciju Cd i, na taj način, na njegovu koncentraciju u ciljnim organima i stepen toksičnih efekata. Osnovni ciljni organ za Cd je jetra u slučaju akutne izloženosti, a u slučaju hronične - bubreg i skelet (Cherian i drugi, 1978; Klaassen i drugi, 2009; Muller i drugi, 1986; Olszowski i drugi, 2012; Schnell i drugi, 1978). Prema postojećim podacima, kod čoveka, količina preuzetog Cd od strane creva je oko 7 % od ukupne količine oralno unetog Cd, dok se ostatak zadržava u lumenu creva do 68 sati. Apsorpcija Cd kod životinja je nižeg stepena u odnosu na ljude, naročito kad je duži vremenski period izloženosti u pitanju, i kod pacova je količina apsorbovanog Cd u crevu oko 0.3 i 3.5 % od ukupne količine oralno unetog metala (Åkesson i drugi, 2002; Andersen i drugi, 1988a, 1988b; Chertok i drugi, 1981; Goon i Klaassen, 1989). Dodatno, pokazano je da količina apsorbovanog Cd zavisi i od urođenih faktora domaćina kao što su uzrast (mlađi organizmi apsorbuju veće količine Cd u odnosu na starije), pol (pripadnici ženskog roda apsorbuju više Cd od pripadnika muškog roda) i rezerve neophodnih makro i mikroelemenata (kod jedinki sa niskim nivoom gvožđa, cinka ili kalcijuma u krvi, apsorpcija Cd se povećava na 15-20 % od ukupne količine oralno unetog metala) (Groten i van Bladeren, 1994; Kello i Kostial, 1977; Vahter i drugi, 2002; Vesey, 2010).

Da bi ispoljio toksičan efekat, Cd mora prvo da uđe iz lumena creva u enterocite, koristeći iste transportne mehanizme za esencijalne dvovalente metale, zbog sličnih hemijskih svojstava Cd i ovih metala (Satarug i drugi, 2010). Proces preuzimanja Cd iz lumena creva čine dva koraka: transmembranski transport u citoplazmu epitelne ćelije i transport iz ćelije, preko bazolateralne strane membrane u kapilare subepitelnog tkiva (*lamina propria*) (Andersen i drugi, 1994). Ukratko, prvi korak preuzimanja Cd u crevima vrši se posredstvom proteinskog transmembranskog nespecifičnog transportera divalentnih jona metala (engl., Divalent Metal Transporter 1 - DMT1), koji se nalazi na apikalnom delu membrane enterocita i ima ulogu u transportu jona gvožđa ( $Fe^{2+}$ ) (Kippler i drugi, 2009; Tallkvist i drugi, 2001; Thevenod, 2010). Još jedan protein, kalcijum-vezujući protein (engl., Calcium Binding Protein - CaBP) koji se nalazi u apikalnom regionu enterocita i koji ima ulogu u preuzimanju kalcijuma (Ca) iz creva, doprinosi prvom koraku apsorpcije Cd iz creva. Afinitet Cd prema CaBP je skoro identičan afinitetu Ca prema ovom proteinu, zahvaljujući sličnom jonskom radijusu ova dva elementa (Brzoska i Moniuszko-Jakoniuk, 1998).

U citoplazmi enterocita, Cd u velikoj meri gradi komplekse sa tiolima kao što su metalotioneini (MT), čime se ovaj metal zadržava u citoplazmi ćelija creva i sprečava se njegov transport u sistemsku cirkulaciju i druge organe. Ipak, prisutan je i drugi korak apsorpcije Cd iz creva i on podrazumeva izbacivanje jona Cd iz citoplazme enterocita u krvotok, aktivnošću proteinskog transportera metala (engl., Metal Transporter Protein 1 - MTP1), koji ima osnovnu funkciju u izbacivanju gvožđa iz ćelija (Ryu i drugi, 2004). U krvotoku, joni Cd se vezuju za proteine u krvi kao što su albumin, cistein i glutation dok kompleksi Cd-MT, formirani u citosolu enterocita, napuštaju ove ćelije u slučaju njihove apoptoze i nekroze kao posledice toksičnih efekata Cd i direktno ulaze u sistemsku cirkulaciju preko kapilara *lamina-e propria-e*. Apsorbovani Cd se transportuje krvotokom do ostalih organa (Zalups i Ahmad, 2003) i to u najvećoj meri do bubrega i jetre (50-85 % od ukupnog Cd u organizmu). U živim sistemima, apsorbovani Cd ima svojstvo bioakumulacije sa biološkim poluživotom u organizmu čoveka od 10-30 godina (Nordberg, 2009), a nekoliko meseci do nekoliko godina (70–270 dana) u organizmu pacova i miševa (ATSDR, 2012).

#### **1.1.4. Uklanjanje kadmijuma iz organizma**

Najveći deo oralno unetog Cd, koji nije apsorbovan od strane enterocita, izbacuje se fecesom. Apsorbovani Cd se izbacuje iz organizma veoma sporo: dnevno se oko 0.007 %

ukupnog Cd u telu ukloni urinom, a 0.009 % fecesom (ATSDR, 2012). Takođe, mala količina apsorbovanog Cd se eliminiše putem žuči (Cikrt i Tichy, 1974).

## 1.2. Metalotioneini i toksikologija kadmijuma

Metalotioneini (MT) su prvi put opisani 1957. godine kao proteini koji vezuju Cd u bubregu konja i od tada su sprovedene brojne studije sa ciljem određivanja njihove uloge u toksikologiji Cd (Klaassen i drugi, 2009). Metalotioneini su proteini male molekulske mase (6.5 kDa) bogati cisteinskim grupama, koji visokim afinitetom vezuju metale i imaju bitnu ulogu u zaštiti ćelija od oksidativnog stresa i toksičnosti izazvane metalima. Kod sisara su identifikovane četiri izoforme MT: MT1, MT2, MT3 i MT4. Za razliku od MT1 i MT2 koji su prisutni u mnogim tkivima, MT3 je specifično prisutan u mozgu i bubrezima a MT4 u koži (Nordberg, 2009; Wang i Du, 2013). Proizvodnju MT1 i 2 podstiču metali među kojima je i Cd, preko MRE (engl., Metal Response Elements), prisutnih u promotorskom regionu MT za koji se vezuje MRE - vezujući transkripcioni faktor 1 (MTF1). Iako se smatra da metalotioneini ispoljavaju svoju aktivnost unutar ćelija, vanćelijski MT možda imaju ulogu signala opasnosti koji aktivira leukocite i usmerava ih na mesto inflamacije (Lynes i drugi, 2006).

## 1.3. Mehanizmi toksičnosti kadmijuma

Mehanizmi toksičnosti Cd su ispitivani *in vitro*, na ćelijama čoveka i životinjskim ćelijama kao i *in vivo*, na životinjskim modelima. Pokazano je da su oksidativni stres i inflamacija osnovni mehanizmi toksičnog delovanja Cd u živim sistemima (Horiguchi i drugi, 2000; Kayama i drugi, 1995a, b; Rikans i Yamano, 2000; Valko i drugi, 2006). Oksidativni stres je posledica povećane proizvodnje reaktivnih hemijskih vrsta kao što su reaktivne vrste kiseonika (engl., Reactive Oxygen Species/ ROS) i azota (engl., Reactive Nitrogen Species/RNS-NO). Iako Cd ne pripada grupi Fentonovih metala i ne pokreće direktno redoks reakcije u biološkim sistemima, do oksidativnog stresa dolazi usled vezivanja Cd za sulfhidrilne grupe enzima antioksidativne odbrane. Kadmijum iscrpljuje ćelijske rezerve enzima zaduženih za uklanjanje slobodnih radikala (kao što je glutation), inhibira aktivnost antioksidativnih enzima superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT), inhibira elektron-transportni lanac mitohondrija, izaziva oštećenje mitohondrija i apoptozu ćelija (Carageorgiou i Katramadou, 2012; Ogunrinola i drugi, 2016; Rani i drugi, 2014).



Inflamacija je zaštitni odgovor organizma na infekciju ili na povredu tkiva izazvanu fizičkim stimulusom ili hemijskim agensom. Akutna ili hronična inflamacija je posredovana faktorima (proteini, lipidi, lipoproteini) koje proizvode ćelije u odgovoru na inflamatorni stimulus kao i medijatorima koji se oslobode iz ćelija koje umiru nekrozom tokom inflamatornog procesa (Olszowski i drugi, 2012). Takođe, do inflamacije dolazi i u odgovoru na oksidativni stres izazvan delovanjem Cd, a jedan od predloženih mehanizama je aktivacija signalnog puta MAP (engl., Mitogen-Activated Protein) kinaze i transkripcionih faktora koji imaju ulogu u inflamatornim procesima, kao što su AP-1 (engl., Activator Protein 1) i NF- $\kappa$ B (engl., Nuclear Factor-kappa B) (Chen i drugi, 2008; Hart i drugi, 1999). Na primeru akutne hepatotoksičnosti Cd pokazano je da ovaj metal oštećuje tkivo jetre najpre direktno, dovodeći do oksidativnog stresa, a do naknadnog oštećenja tkiva dolazi aktivacijom Kupffer-ovih ćelija. Ove ćelije po aktivaciji oslobađaju inflamatorne medijatore (citokine, adhezivne molekule, hemokine, reaktivne hemijske vrste) koji vrše aktivaciju drugih ćelija u jetri kao što su endotelne, stelatne ćelije i hepatocite. Dalje, inflamatorni medijatori i hemokini koje proizvode aktivisane ćelije jetre, privlače i aktiviraju inflamatorne ćelije iz cirkulacije (neutrofile i monocite) čime se povećava intenzitet inflamatornog odgovora na Cd i stepen oštećenja tkiva jetre (Rikans i Yamano, 2000). Kako je smrt ćelija krajnji rezultat oštećenja tkiva, predložen je mehanizam kojim Cd dovodi do apoptoze i nekroze ćelija. Naime, ovaj metal u niskim koncentracijama dovodi do produžene aktivacije ERK (engl., Extracellular signal Regulated Kinase) koja ostaje u aktivisanom stanju tokom dužeg vremenskog intervala (nekoliko dana). Iako je kratkotrajna aktivacija ERK u vezi sa deobom ćelija i njihovim preživljavanjem, u slučaju aktivacije posredstvom Cd, neprestano aktivna ERK je signal za ulazak ćelija u apoptozu (Martin i drugi, 2006). Sa druge strane, Lopez i saradnici (2003) su ukazali na efekat visokih koncentracija Cd na nekrozu ćelija iscrpljivanjem unutarćelijskog ATP-a.

#### **1.4. Štetni efekti kadmijuma na zdravlje ljudi**

Prvi nepoželjni efekti Cd na zdravlje ljudi zabeleženi su 1858. godine kada su opisani disajni i gastrointestinalni simptomi nakon oralne i inhalacione izloženosti sredstvima za čišćenje koja su sadržala kadmijum-karbonat. Do sredine XX veka opisani su brojni slučajevi toksičnih efekata Cd na zdravlje ljudi koji su bili izloženi ovom metalu na radnom mestu kao i ljudi koji su konzumirali zagađenu vodu i hranu. Nakon Drugog svetskog rata u Japanu je opisana „*Itai-Itai*” bolest koju su odlikovali izražen bol, prelomi kostiju, osteoporoza,

deformacije skeleta, poremećaj funkcije bubrega, imunodeficijencije i anemija, kod ljudi koji su unosili Cd preko ishrane pirinčem koji je sadržao visoke nivoe ovog metala (Jarup i drugi, 1998). Tek je pojavom „Itai-Itai” bolesti dobijen uvid u opasne razmere toksičnih efekata Cd kao zagađivača životne sredine i zdravstvenog faktora rizika opšte populacije (Nordberg, 2009).

Kako je bubreg ciljni organ toksičnosti Cd, najviše su opisani štetni efekti hronične inhalacione i oralne izloženosti Cd na rad ovog organa (Åkesson i drugi, 2005; Buchet i drugi, 1990; Friberg, 1984; Jarup i drugi, 2000). Kadmijum se iz jetre transportuje do bubrega u kojima se, posredstvom glomerula, filtrira u primarni urin koji reapsorbuju ćelije proksimalnih tubula u kojima se raskida veza između MT i Cd (u lizozomima). Kadmijum koji se oslobodio iz Cd-MT kompleksa, stimuliše *de novo* produkciju MT u ćelijama tubula bubrega, u kojima ponovo gradi isti kompleks. Procenjeno je da do oštećenja bubrega dolazi kada koncentracija Cd u kori bubrega dostigne nivo između 50 i 300 µg/g kore bubrega, pošto se tada prevazilazi kapacitet MT da vežu sve prisutne jone Cd (Ellis i drugi, 1981; Nordberg, 2009). Kod ljudi, koncentracija Cd od 50 µg/g kore bubrega se postiže dnevnim unosom od 1 µg Cd/kg telesne mase, tokom 50 godina (Satarug i drugi, 2000). Pri višim nivoima izloženosti ljudi Cd, dolazi do pada stope glomerularne filtracije i povećane smrtnosti usled disfunkcije bubrega. Pokazano je da je najraniji znak oštećenja bubrega kod ljudi povećan nivo proteina, naročito β<sub>2</sub>-mikroglobulina, N-acetil-β-glukozaminidaza/NAG i MT u urinu. Dodatno, anemija koja je čest nalaz kod ljudi izloženih Cd, u vezi je sa oštećenjem bubrega koji produkuju manje količine eritropoetina neophodnog za razvoj eritrocita.

Osim bubrega, opisani su efekti hronične oralne izloženosti Cd na skelet ljudi u vidu smanjene mase kostiju, demineralizacije i poremećene funkcije osteoblasta (Noda i Kitagawa, 1990; Ogawa i drugi, 2004; Sughis i drugi, 2011) kao i efekti na pluća nakon akutne i hronične inhalacione izloženosti ljudi, u vidu oštećenja epitelskih ćelija pluća, plućnog edema, bronhitisa i emfizema pluća (Beton i drugi, 1966; Davison i drugi, 1988; Leduc i drugi, 1993; Sorahan i drugi, 1995). Takođe, prijavljeni su efekti akutnog oralnog unosa Cd na gastrointestinalni sistem, kao što su mučnina, povraćanje, povećano lučenje pljuvačke, bol u predelu stomaka, grčevi i dijareja (ATSDR, 2012). Efekat Cd na imunski sistem ljudi je malo ispitivan i za sada je poznato da se Cd akumulira u limfocitima čoveka (Hildebrand i Cram, 1979) i ukazano je na imunosupresivne i imunostimulatorne efekte ovog metala kod ljudi u vidu povećanja broja limfocita i smanjenja broja neutrofila u perifernoj krvi (Ciarrocca i drugi, 2015). Kadmijum utiče na koncentraciju citokina (interleukina-1 beta/IL-

1 $\beta$  i interferona-gama/IFN- $\gamma$ ) u serumu ljudi (Yucesoy i drugi, 1997), proizvodnju antitela (Jelovcan i drugi, 2003), dužinu telomera leukocita (Zota i drugi, 2015), a poznato je da dovodi do apoptoze T limfocita (El Azzouzi i drugi, 1994). Hronična izloženost Cd je dovedena u vezu sa većom podložnosti ljudi prema hroničnim infekcijama (Krueger i Wade, 2016). Potrebno je naglasiti da je zbog efekata na razvoj tumora prostate, pluća i bubrega, Cd klasifikovan kao humani karcinogen prve grupe (International Agency of Research on Cancer - IARC, 1993).

### **1.5. Ispitivanje toksičnih efekata kadmijuma na eksperimentalnim modelima**

Osim iz epidemioloških studija, toksični efekti Cd su poznati i iz eksperimentalnih istraživanja na ćelijskim linijama (*in vitro*) kao i na životinjskim modelima (*in vivo*) (WHO, 1992). Prva eksperimentalna toksikološka studija na životinjskom modelu sprovedena je 1919. godine kada je pokazano da akutni subkutani tretman pacova Cd dovodi do promene obojenosti testisa (Prozialeck i drugi, 2008).

Najviši nivoi deponovanog Cd nađeni su u jetri i bubrezima eksperimentalnih glodara (Breton i drugi, 2013a; Klaassen i drugi, 2009) pa su hepatotoksičnost (Kayama i drugi, 1995a; Liu i drugi, 2015; Rikans i Yamano, 2000; Tzirogiannis i drugi, 2003) i nefrotoksičnost (Brzoska i drugi, 2003b; Kayama i drugi, 1995b; Nordberg, 2009) Cd najviše i ispitivane. Toksični efekti Cd pokazani su i na drugim tkivima i sistemima organa eksperimentalnih životinja među kojima su skeletni (Brzoska i Moniuszko-Jakoniuk, 2004), respiratorni (Kundu i drugi, 2009), reproduktivni (Shen i Sangiah, 1995), nervni (Yang i drugi, 2015), kardiovaskularni (Tellez-Plaza i drugi, 2013) i endokrini sistem (Lafuente i drugi, 2003b) a najmanje je podataka o efektu Cd na imunski (Lafuente i drugi, 2003a) i gastrointestinalni (Breton i drugi, 2013a) sistem.

### **1.6. Efekti kadmijuma na imunski sistem**

Iako je inflamacija kao posledica oksidativnog stresa u odgovoru na Cd u osnovi štetnog delovanja ovog metala (Rikans i Yamano, 2000), mehanizmi kojima Cd direktno i / ili indirektno utiče na inflamatorni proces i pojedine komponente imunskog sistema nisu jasno definisani.

### 1.6.1. Imunski sistem-kratak pregled

Imunski sistem čine tkiva, ćelije i molekuli koji obezbeđuju fiziološku funkciju ovog sistema, a to je odbrana od infektivnih mikroorganizama i neinfektivnih stranih molekula (mada u nekim situacijama i sopstveni molekuli mogu da dovedu do pokretanja imunskog odgovora), antitumorska aktivnost i obnavljanje oštećenog tkiva. Organe imunskog sistema čine centralni i periferni limfni organi. Kostna srž i timus su centralni limfni organi u kojima se limfociti fenotipski i funkcionalno razvijaju i sazrevaju. Periferni limfni organi su limfni čvorovi, slezina, imunski sistem kože i mukozni imunski sistem, u kojima se pokreće odgovor limfocita na antigene. Anatomska organizacija limfnih čvorova omogućava pokretanje imunskih odgovora na antigene dospele limfom dok se u slezini započinju imunski odgovori na antigene iz krvi. Osim toga, u slezini se uklanjaju ostarele i oštećene ćelije krvi, imunski kompleksi i opsonizovani mikrobi iz cirkulacije (Abbas i drugi, 2014a).

Odgovarajući imunski odgovor se obrazuje aktivnošću dve grane imunskog sistema, a to su urođena i stečena (adaptivna) imunost. Urođena imunost je starija komponenta imunskog sistema i ona je značajna za ranu zaštitu od infekcija tako što prva reaguje na prisustvo mikroorganizama i stranih molekula, onemogućava njihovo širenje, uklanja patogene i aktivira stečenu imunost. Komponente urođene imunosti su: fizičke i hemijske barijere (epitel kože, respiratornog, gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta kao i molekuli koji se proizvode na epitelnim površinama), zatim ćelije sa fagocitnom ulogom (neutrofil, makrofagi), dendritske ćelije (DĆ), ćelije prirodne ubice (engl., Natural Killer - NK ćelije) i druge limfoidne ćelije, kao i proteini u krvi (članovi sistema komplementa, hemokini, citokini). Receptori na ćelijama urođene imunosti prepoznaju molekulske obrasce zajedničke za mnoge patogene (engl., Pathogen Associated Molecular Patterns - PAMPs) ali i komponente ćelija i tkiva domaćina koji se oslobađaju usled ćelijskih oštećenja nakon povrede tkiva (ćelijska i mitohondrijska DNK, ćelijska RNK, formil peptidi mitohondrija, komponente vanćelijskog matriksa, mokraćna kiselina, kristali mononatrijum urata, kristali holesterola), takozvane molekulske obrasce oštećenja (engl., Damage Associated Molecular Patterns - DAMPs). Različiti PAMPs su zastupljeni kod različitih tipova mikroba (virusa, bakterija, gljiva) i obuhvataju nukleinske kiseline (primer: dvolančana RNK, nemetilovani CpG motivi DNK), proteine (primer: N-formilmietionin), lipide i ugljene hidrate (primer: lipopolisaharid/LPS, lipoteihoična kiselina, manani, beta glukani) koji nisu prisutni kod sisara a neophodni su za preživljavanje mikroba. Prepoznavanje molekulskih obrazaca prati aktivacija unutarćelijskih signalnih puteva i indukcija inflamatornog odgovora (Abbas i drugi, 2014b, 2014c).

Sa druge strane, stečeni (adaptivni) imunski sistem je nastao kasnije u evoluciji vertebrata i karakteriše se specifičnošću za antigen. Stečenu imunost čine B i T limfociti čiji receptori, nastali somatskim rekombinacijama tokom ontogenetskog razvića, prepoznaju specifične antigene. Stečena imunost se deli na humoralnu, koja se može preneti antitelima iz donora u primaoca u odsustvu ćelija, i ćelijsku koja može biti preneti putem živih T ćelija specifičnih za dati antigen. Humoralna imunost ima ulogu u neutralizaciji i uklanjanju vanćelijskih mikroba i toksina koji su pristupačni antitelima ali nije efikasna protiv mikroba unutar ćelija. Ćelijska stečena imunost je posredovana T limfocitima i služi kao odbrambeni mehanizam protiv unutarćelijskih i fagocitovanih mikroba (Abbas i drugi, 2014c).  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T limfociti sa antigenskom specifičnošću, a koji nisu bili u kontaktu sa antigenom („naivni“ T limfociti) cirkulišu telom i nalaze se u stanju mirovanja, a aktiviraju se nakon prepoznavanja specifičnih antigena prikazanih od strane antigen prezentujućih ćelija (APĆ) u perifernim limfnim organima. Vanćeljski antigeni prikazani u sklopu molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl., Major Histocompatibility Complex - MHC) II klase na APĆ, aktiviraju specifične  $CD4^+$  T limfocite koji se, u zavisnosti od tipa antigena (poreklom od bakterija, helminta, gljiva), diferenciraju u pravcu pomoćničkih Tip1/Th1, Tip2/Th2, Tip3/Th3 ili Tip17/Th17 ćelija. Do diferencijacije naivnih T limfocita u Th1 tip dolazi delovanjem citokinima IL-12 i IFN- $\gamma$  koje luče DĆ, makrofagi i NK ćelije u odgovoru na mikrobe. Nakon diferencijacije, Th1 ćelije produkuju IFN- $\gamma$  koji vodi daljoj Th1 diferencijaciji uz istovremenu inhibiciju diferencijacije naivnih  $CD4^+$  T ćelija u Th2 i Th17 subpopulacije. Citokini IFN- $\gamma$  i IL-12 posreduju u Th1 diferencijaciji aktivacijom transkripcionih faktora T-bet (engl., T-box transcription factor), STAT-1 (engl., Signal Transducer and Activator of Transcription - 1) i STAT-4. Diferencijacija u Th2 tip je stimulirana citokinom IL-4 i odigrava se u slučaju infekcije helmintima ili alergijskih reakcija. Citokin IL-4 aktivira transkripcioni faktor STAT-6 koji zajedno sa signalima poreklom od aktivisanog TCR, dovodi do ekspresije GATA-3 i Th2 diferencijacije. GATA-3 je transkripcioni faktor koji je osnovni regulator Th2 diferencijacije zato što pojačava ekspresiju gena za citokine koje produkuju Th2 limfociti, a to su IL-4, IL-5 i IL-13. Dodatno, GATA-3 blokira diferencijaciju naivnih T ćelija u Th1 tip, inhibicijom ekspresije signalnog lanca receptora za IL-12. Razvoj Th17 ćelija je stimulisan proinflamatornim citokinima IL-6, IL-1 i IL-23 koje produkuju antigen-prezentujuće ćelije u odgovoru na bakterijske i gljivične infekcije. Razvoj Th17 ćelija zavisi od transkripcionih faktora ROR $\gamma$ t (engl., Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor gamma-T) i STAT-3 (Luckheeram i drugi, 2012).

U slučaju prepoznavanja unutrćelijskog antigena u sklopu MHC molekula I klase na membrani APĆ, naivni CD8<sup>+</sup> T limfociti se diferenciraju u efektorske citolitičke ćelije. Osim specifičnog prepoznavanja antigena, za aktivaciju T limfocita neophodno je i prisustvo signala poreklom od urođene imunosti. Dodatno, pod određenim uslovima (kao što je prisustvo TGF-β i IL-2) naivne ili efektorske T ćelije se mogu diferencirati u regulatorne ćelije (Abbas i drugi, 2014d, 2014e; Ho, 2009). Generalno, prepoznavanje antigena, zajedno sa drugim aktivirajućim signalima, pokreće odgovor naivnih T ćelija u vidu sekrecije citokina, deobe ćelija i diferencijacije u efektorske i memorijske limfocite. Integrisanost imunskog sistema je od ključne važnosti za odbranu od infektivnih organizama i njihovih toksina, pa samim tim i za preživljavanje domaćina (Abbas i drugi, 2014b, 2014e).

### **1.6.2. Imunotoksičnost kadmijuma**

Dosadašnje studije su pokazale kako supresivne tako i stimulatorne efekte Cd na imunski sistem, u zavisnosti od korišćenog eksperimentalnog sistema (*in vivo* ili *in vitro*), puta primene Cd, doze, perioda izlaganja, ispitivanog tkiva i korišćene vrste ili soja (čovjek ili eksperimentalni glodari) u pojedinim studijama (Olszowski i drugi, 2012).

Pokazano je da je infiltracija inflamatornih ćelija iz cirkulacije u organe osetljive na toksična svojstva Cd, uobičajeni histopatološki nalaz kod tretiranih ekperimentalnih glodara. U jetri miševa (Horiguchi i drugi, 2000), plućima (Kataranovski i drugi, 1998) i slezini (Demenesku i drugi, 2014) pacova ukazano je na infiltrate neutrofilnih leukocita nakon akutnog intraperitonealnog tretmana Cd. U slučaju hroničnog oralnog unosa Cd, zapaženi su infiltrati mononuklearnih ćelija u tkivu jetre i bubrega pacova (Brzoska i drugi, 2003a; Jihen i drugi, 2008). Na sistemskom nivou, akutna intraperitonealna primena Cd dovodi do povećane brojnosti granulocita periferne krvi, smanjenog broja limfocita, i povećanog nivoa TNF i IL-6 u plazmi tretiranih pacova (Kataranovski i drugi, 1998). Takođe, akutni tretman dovodi do povećane aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO), proizvodnje ROS i NO od strane granulocita periferne krvi pacova kao i smanjenog nivoa iRNK za IL-6, IL-1β i TNF u ovim ćelijama (Djokic i drugi, 2014).

Efekti hroničnog oralnog tretmana Cd su zabeleženi na sistemskom nivou, ali nisu dovoljno razjašnjeni. U hroničnom režimu oralne primene Cd izmereni su povećani nivoi IL-6, TNF (Alghasham i drugi, 2013), IFN-γ i smanjeni nivo IL-4 (Moniuszko-Jakoniuk i drugi, 2009) u serumu i plazmi tretiranih pacova. Pokazano je da hronični oralni tretman Cd utiče na zastupljenost (Lafuente i drugi, 2004) i aktivnost B i T limfocita u perifernoj krvi eksperimentalnih glodara (Dan i drugi, 2000; Leffel i drugi, 2003). Sa druge strane, pokazan

je izostanak efekata Cd na humoralnu i ćelijsku imunost nakon njegove hronične oralne primene kod miševa (Schulte i drugi, 1994) i pacova (Wesenberg i Wesenberg, 1983).

Pošto je u ranim studijama pokazano da se Cd deponuje u značajnoj meri u slezini miševa i pacova gde ispoljava različite efekte na brojnost i aktivnost B i T limfocita (Ohsawa i drugi, 1986; Matsubara-Khan i Machida, 1975), ispitivani su efekti Cd na uspostavljanje imunskog odgovora u ovom limfnom tkivu. Tako je pokazano da akutni intraperitonealni tretman pacova Cd ima negativni efekat na ćelijsku imunost (proliferacija T limfocita, proizvodnja IFN- $\gamma$ ) i pozitivan efekat na pojedine parametre urođene imunosti (broj CD11b<sup>+</sup> ćelija, ekspresija iRNK za inducibilnu formu azot sintaze/ iNOS, proizvodnja NO, TNF, IL-1 $\beta$ ) u slezini (Demenesku i drugi, 2014). U drugoj studiji je pokazano da intraperitonealni tretman (28 dana) miševa Cd dovodi do apoptoze limfocita slezine (Chatterjee i drugi, 2008). Ispitivanja efekata hronične oralne primene Cd na zastupljenost i aktivnost limfocita slezine ukazuju na negativan efekat Cd na B (proizvodnja antitela) i T limfocite (proliferativni odgovor) pacova (vremenski period oralne izloženosti - 35 dana) (Dan i drugi, 2000) i miševa (vremenski period oralne izloženosti - 90 dana) (Thomas i drugi, 1985). Pokazano je da efekat Cd na zastupljenost i aktivnost limfocita slezine zavisi od primenjene doze: tretman pacova niskim dozama (5 ppm i 10 ppm Cd, u trajanju od 30 dana) dovodi do smanjene zastupljenosti CD4<sup>+</sup> T limfocita dok primena viših doza (25 ppm i 50 ppm Cd) utiče na povećanje zastupljenosti CD8<sup>+</sup> T limfocita u slezini (Lafuente i drugi, 2003a). Da primenjena doza Cd ima različite efekte na aktivnost različitih tipova ćelija pokazali su Malave i de Ruffino (1984) u čijoj studiji je hronična oralna primena Cd (50 ppm, 200 ppm i 300 ppm Cd) imala pozitivan efekat na proliferaciju T limfocita slezine miševa u odgovoru na stimulaciju konkanavalinom A (ConA), dok je produkcija IgM u odgovoru B limfocita na stimulaciju ovčijim eritrocitima bila dozno zavisna (pozitivan efekat 50 i 200 ppm Cd i negativan efekat 300 ppm Cd, na proizvodnju IgM).

Dodatno, rezultati ispitivanja efekata sistemske primene Cd ukazuju na veću osetljivost mužjaka pacova na njegove imunotoksične efekte u odnosu na ženke sugerišući postojanje polnih razlika u imunotoksičnom efektu ovog metala (Kataranovski i drugi, 2009; Stosic i drugi, 2010).

### **1.7. Efekti kadmijuma na gastrointestinalni sistem**

U gastrointestinalnom traktu (GIT) je prisutan najveći broj imunskih ćelija u poređenju sa bilo kojim drugim tkivom u organizmu. Dok je u lumenu creva konstantno prisutan veliki



broj raznovrsnih antigena, osnovna funkcija imunskog odgovora u crevu je održavanje homeostaze i barijerne funkcije epitela creva (Mowat i Agace, 2014). Epitel creva predstavlja strukturnu i funkcionalnu selektivnu barijeru koja sprečava prodor toksičnih supstanci iz lumena creva u cirkulaciju i njena celovitost može biti narušena delovanjem teških metala među kojima je i Cd (Rusanov i drugi, 2015). U slučaju oralne izloženosti Cd, GIT je primarni organ toksičnih efekata Cd i ima ključnu ulogu u zaštiti organizama domaćina od ovog metala (Zhao i drugi, 2006).

### 1.7.1. Imunski sistem creva

Imunski sistem pridružen mukoznim tkivima (engl., Mucosa-Associated Lymphoid Tissue - MALT) čine limfoidna tkiva mukoznih površina nosne i oralne duplje, gornjeg respiratornog, gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta. Organizovani limfoidni folikuli i difuzno limfno tkivo koje obuhvata limfocite, dendritske ćelije, makrofage, mast ćelije u *lamina propria*-i i intaeptelske limfocite u bazalnoj membrani, predstavljaju limfno tkivo pridruženo crevu (engl., Gut Associated Lymphoid Tissue -GALT) (Cesta, 2006).

U svim delovima creva, površinski epitel se neprekidno zamenjuje novim ćelijama koje se obrazuju u oblasti Lieberkuhn-ovih kripti bogatih multipotentnim stem ćelijama. Pored enterocita kao osnovnih ćelija, čija je osnovna uloga apsorpcija hranljivih supstanci, u epitelu creva se nalaze i Paneth-ove ćelije koje luče molekule sa ulogom u hemijskoj zaštiti creva (lizozim, laktoferin, defenzini), peharaste ćelije koje luče glikoproteine mukusa, intraepitelni limfociti (IEL) i neuroendokrine ćelije (Mowat i Agace, 2014). Ispod jednoslojnog epitela se nalazi sloj rastresitog vezivnog tkiva - *lamina propria*, u kome se nalaze krvni i limfni sudovi kao i ćelije urođene (DĆ, makrofagi, eozinofili, mast ćelije) i stečene imunosti (B i T limfociti). Dok su IEL pretežno CD8<sup>+</sup>, T limfociti *lamina-e propria-e* su uglavnom CD4<sup>+</sup> T ćelije (Mowat i Agace, 2014).

Imunski odgovor na antigene iz creva se obrazuje u induktivnim mestima koja predstavljaju organizovano tkivo Pejerovih ploča (PP), mezenteričnih limfnih čvorova (MLČ) i izolovanih limfoidnih folikula dok epitel creva i *lamina propria* predstavljaju efektorska mesta imunskog odgovora u crevu (Mowat, 2003). Pejerove ploče su makroskopski agregati limfoidnog tkiva koje čine zonu B ćelija sa germinativnim centrima, a u blizini ove zone nalazi se zona T ćelija sa efektorskim i regulatornim T limfocitima. U epitelu iznad PP, koji se još naziva i epitel pridružen folikulima, nalaze se specijalizovane M (engl., Microfold) ćelije koje uzorkuju sadržaj creva. M ćelije predaju preuzete antigene DĆ u PP koje dalje



mogu da migriraju do susednih zona T ćelija u PP ili mogu da odu u MLČ limfnim sudovima i tamo prikažu antigene naivnim T limfocitima.

Osim M ćelija, i DC *lamina-e propria*-e mogu da uzorkuju crevni sadržaj tako što provlače svoje izdužene ćelijske nastavke između enterocita, fagocituju luminalne antigene i migriraju u MLČ. Migracija DC iz creva u MLČ zavisi od prisustva hemokinskog receptora CCR7 na zrelih DC i hemokina CCL21 i CCR6 na nezrelim DC i hemokina CCL20 (Newberry i Lorenz, 2005). Drenirajući limfni čvorovi creva, MLČ, su osnovna mesta pokretanja imunskih odgovora na antigene iz creva (Mowat, 2003). Ukratko, DC iz PP ili *lamina-e propria*-e, prezentuju antigene poreklom iz creva naivnim T limfocitima koji se u zavisnosti od tipa antigena diferenciraju u efektorske (Th1, Th2 ili Th17) ili regulatorne limfocite koji svoju aktivnost obavljaju u *lamina propria*-i (Newberry i Lorenz, 2005). Put diferencijacije naivnih T limfocita u MLČ kao i u drugim limfnim čvorovima, zavisi od citokinske signalizacije i aktivacije transkripcionih faktora. Nakon diferencijacije, efektorski i regulatorni T limfociti napuštaju MLČ i usmeravaju se ka crevu, u kome je prisutan antigen koji je doveo do aktivacije ovih ćelija.

Kretanje limfocita iz MLČ u tkivo creva je posredovano u najvećoj meri  $\alpha 4\beta 7$  integrinima na T limfocitima, koji se vezuju za MadCAM-1 molekule na endotelnim ćelijama postkapilarnih venula *lamina-e propria*-e creva. Dodatno, za migraciju aktivisanih limfocita u region creva, neophodna je ekspresija hemokinskog receptora CCR9 na B i T limfocitima i prisustvo hemokinskog liganda CCL25, koji proizvode epitelne ćelije creva. Najbrojniji efektorski T limfociti u crevu su Th17 tipa koji osim IL-17 proizvode i IL-22 i imaju bitnu ulogu kako u zaštitnim imunskim odgovorima protiv patogena tako i u očuvanju barijerne funkcije creva.

Tolerogeni imunski odgovori na antigene poreklom od komensalnih mikroorganizama i hrane se osim specifične anatomske organizacije (induktivna i efektorska mesta imunskih odgovora), fizičke (vilusi) i hemijske (mukus, antimikrobni peptidi, IgA) barijere uspostavljaju i održavaju brojnim mehanizmima među kojima su: selektivna ekspresija receptora za PAMPs u citoplazmi (NLRs) i bazolateralnim površinama epitelne ćelije crevne barijere (TLRs) čime se omogućava indukcija zaštitnih odgovora samo u slučaju prodora antigena dublje u tkivo creva; diferencijacijom regulatornih Foxp3<sup>+</sup> T ćelija (Treg) koje se diferenciraju od naivnih i aktivisanih T ćelija pod uticajem CD103<sup>+</sup> DC u mezenteričnim limfnim čvorovima a koje inhibiraju adaptivni imunski odgovor; sekrecijom anti-inflamatornih citokina TGF- $\beta$  i IL-10 od strane rezidentnih makrofaga, DC, epitelne ćelije kao i Treg. Takođe, regulaciji intestinalnih imunskih odgovora doprinosi i komensalna flora i

poznato je da promene u sastavu i zastupljenosti populacija komensalnih mikroba mogu dovesti do narušavanja imunske homeostaze u crevu ali i na sistemskom nivou (Abbas i drugi, 2014f; Mowat, 2003).

### 1.7.2. Intestinalna toksičnost kadmijuma

Kako je GIT svakodnevno izložen komensalnim mikroorganizmima, patogenima i antigenima iz hrane, kao što je napred pomenuto, od posebnog značaja je uspostavljanje i održavanje imunološke tolerance creva. Imunološka toleranca predstavlja odsustvo odgovora imunskog sistema creva na bezopasne antigene, ali i uspostavljanje adekvatnog proinflatornog zaštitnog odgovora na patogene i otrove. Takav imunski odgovor creva se obrazuje u samom limfoidnom tkivu i drenirajućim MLC (Mowat, 2003) i čini barijeru između imunskih odgovora u crevu i ostatka imunskog sistema čime se sprečava sistemski inflamatorni imunski odgovor (MacPherson i Smith, 2006). U *in vitro* i *in vivo* studijama je ukazano na toksične efekte Cd na homeostazu tkiva creva u vidu oštećenja tkiva, oksidativnog stresa i efekata na epitelni imunski odgovor, ali efekat ovog metala na MLC je neispitan.

U *in vitro* studijama na Caco-2 ćelijskoj liniji je pokazano da Cd ima direktan, negativan uticaj na proteine tesnih veza između ćelija crevnog epitela (Rusanov i drugi, 2015) čime se narušava celovitost crevne barijere. Na Caco-2 ćelijskoj liniji je takođe ukazano na proinflatorne efekte Cd u vidu stimulacije produkcije IL-8 od strane ovih ćelija aktivacijom NF- $\kappa$ B transkripcionog faktora (Hyun i drugi, 2007).

U akutnom režimu oralni tretman Cd dovodi do histološki vidljivog oštećenja epitela creva kod miševa, uključujući: prisustvo skraćenih i zadebljanih crevnih resica, prisustvo vakuola nalik peharastim ćelijama, nekrozu enterocita, smanjenu debljinu mukusnog sloja i priliv neutrofila i mononuklearnih leukocita u *lamina propria*-u (Andersen i drugi, 1988b). U duodenumu, akutni oralni unos Cd utiče na povećanu ekspresiju gena za hemokin MIP-2 (engl., Macrophage Inflammatory Protein-2) i povećanu aktivnost enzima mijeloperoksidaze dok efekat na ekspresiju gena za IL-1 $\beta$  i TNF nije zapažen u ovoj studiji (Zhao i drugi, 2006).

Oralni tretman pacova Cd u trajanju od 30 dana je doveo do smanjenog broja površinskih mukoznih, parijetalnih i glavnih ćelija želuca (Asar i drugi, 2000) a oralni tretman miševa Cd izaziva smanjenje debljine mukusnog sloja u crevu nakon tri nedelje (Liu i drugi, 2014). Iako u modelu hroničnog (4-12 nedelja) oralnog izlaganja miševa Cd u koncentraciji 5 ppm i 100 ppm nisu uočene histološke promene u tkivu tankog creva, ukazano je na povećanu ekspresiju gena za MT 1 i 2 u tkivu duodenuma. Dodatno, pokazan

je slab uticaj na ekspresiju gena za inducibilnu formu azot sintaze, superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (Gpx2) i hem oksigenaze (Hmox1), dok je ekspresija gena za proinflamatorne citokine IL-1 $\beta$ , TNF i IFN- $\gamma$  kao i anti-inflamatorne citokine IL-10 i TGF- $\beta$  negativno regulisana u duodenumu miševa nakon oralnog unosa Cd (Breton i drugi, 2013b). Rezultati drugog istraživanja ukazali su na povećanje nivoa TNF u tkivu debelog creva miševa nakon tri nedelje oralnog tretmana (20 i 100 ppm Cd) (Liu i drugi, 2014).

Na osnovu poznatih efekata oralnog unosa Cd na crevo, predložen je mehanizam toksičnosti Cd u ovom tkivu po kome Cd direktno deluje na enterocite gde prvenstveno remeti funkciju mitohondrija i dovodi do nekroze ovih ćelija. Ostaci nekrotskih ćelija (ćelijski „debris“) oštećuju susedne ćelije epitela creva čime se narušava celovitost crevne barijere. Takođe, oštećene epitelne ćelije proizvode i oslobađaju inflamatorne hemokine/citokine, što dovodi do priliva inflamatornih ćelija u pogođeni region creva i posledično, lokalne zapaljenske reakcije (Tarasub i drugi, 2010; Zhao i drugi, 2006).

### **1.7.3. Efekat kadmijuma na mikrobiotu creva**

Nakon oralnog unosa, Cd direktno utiče na mikrobijalni ekosistem creva (Breton i drugi, 2013b) koji je neophodan za uspostavljanje i održavanje imunske homeostaze u ovoj regiji kao i za odbranu od patogenih mikroorganizama (Liu i drugi, 2014).

Od rođenja, mukozne površine creva su kolonizovane mikrobnim ekosistemom koji se označava pojmom mikrobiota a čine ga raznovrsne gljive, bakterije, arheobakterije i virusi (Ivanov i Honda, 2012). Između mikrobiote i domaćina postoji komensalni odnos u kome crevo pruža zaštićenu životnu sredinu i hranljive materije a mikrobiota doprinosi procesu varenja hrane, onemogućava razvoj patogena i stimuliše imunski odgovor domaćina da brže i efikasnije odgovara na pojavu patogena. Mikrobiota utiče i na uspostavljanje i održavanje imunskog odgovora creva (Brown i drugi, 2013; El Aidy i drugi, 2012). Sa druge strane, komensalne bakterije su istovremeno i oportunistički patogeni koji su sposobni za prodor kroz mukoznu membranu i izazivanje sistemske infekcije (Fazeli i drugi, 2011). Bitna odlika imunskog sistema creva je uspostavljanje kontrolisanog specifičnog odgovora ili odsustvo reaktivnosti na komensalne mikrobe, uz istovremeni razvoj zaštitnog odgovora na patogene mikroorganizme. Ovakva selektivna reaktivnost je omogućena ograničavanjem direktnog kontakta između bakterija i ćelija epitela creva (usled peristaltičkog pokreta creva, prisustva crevnih resica, mukusa i antimikrobnih peptida) kao i uklanjanjem bakterija koje pređu preko crevnog epitela, čime se sprečava aktivacija sistemskog imunskog odgovora. Kao što je već napred pomenuto, DC u *lamina propria*-i uzorkuju sadržaj creva, prikazuju preuzete antigene

B i T ćelijama u PP. Aktivirane B ćelije sekretuju IgA (specifičan za bakterije u lumenu) koji se transcitozom prenosi u lumen creva. Sekretovani IgA se vezuje za bakterije u lumenu creva i sprečava njihov ulazak u tkivo preko epitelne barijere. Komensalne mikrobe koji pređu epitel i dospeju u *lamina propria*-u, fagocituju i eliminišu rezidentni makrofagi. Takođe, ove bakterije preuzimaju i DC u *lamina propria*-i koje odlaze u MLC gde prikazuju antigene ovih bakterija i pokreću zaštitni imunski odgovor u crevu (Hooper i drugi, 2012).

Brojni faktori (hrana, lekovi, infekcija, inflamacija), među kojima je i Cd, mogu dovesti do poremećaja u sastavu mikrobiote (disbioze) koju odlikuje smanjena zastupljenost komensalnih bakterijskih populacija i prekomerni rast patogena (Ivanov i Honda, 2012). Negativan efekat Cd na komensalne bakterije gastrointestinalnog trakta sisara pokazan je *in vitro* i *in vivo*, a kao najosetljiviji sojevi komensalnih bakterija izdvojeni su *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Pokazano je da oralni tretman miševa Cd (20–50 ppm Cd) u trajanju od 3 - 8 nedelja, doveodi do smanjene brojnosti crevne mikroflore i promene odnosa između probiotskih i patogenih bakterija (Fazeli i drugi, 2011; Liu i drugi, 2014).

### **1.8. Doprinos genetičke osnove (soja) toksičnim efektima kadmijuma**

Genetička osnova doprinosi razlikama u podložnosti toksičnim efektima Cd (Gochfeld, 1997; Kacew i drugi, 1995). Ukazano je da se Cd deponuje u različitom nivou kod različitih sojeva miševa i pacova i da povećano deponovanje Cd kod pojedinih sojeva utiče na razvoj kancera (Theocharis i drugi, 1994; Shimada i drugi, 2008; Waalkes i Rehm, 1994) i ispoljava toksične efekte u jetri miševa i pacova (Shaikh i drugi, 1993; Shimada i drugi, 2004) kao i testisima pacova (Shimada i drugi, 2009, 2011). Ipak, u drugim studijama sojne razlike u toksičnim efektima Cd su uočene u jetri (Kuester i drugi, 2002) i plućima pacova (McKenna i drugi, 1997) kao i testisima miševa (King i drugi, 1998; Liu i drugi, 2001; Nolan i Shaikh, 1986), čak i pri sličnim nivoima Cd u ovim tkivima, čime je ukazano na značaj genetičke osnove u osetljivosti na štetne efekte ovog metala. Sojne razlike u podložnosti tkiva Cd, pri sličnim nivoima deponovanja metala, pripisuju se aktivnosti rezidentnih leukocita ili leukocita koji su migrirali u tkiva iz sistemske cirkulacije. Kupferove ćelije, rezidentni makrofagi jetre, odgovorne su za različite toksične efekte Cd u jetri Fischer 344 i Sprague-Dawley pacova (Kuester i drugi, 2002). Razlike u stopi infiltracije leukocita u pluća u odgovoru na Cd, smatraju se odgovornim za razlike u stepenu oštećenja pluća kod C57BL/6 i

DBA miševa (McKenna i drugi, 1997). Mehanizmi koji leže u osnovi sojnih razlika u odgovoru na Cd nisu poznati za druge organe.

## 2. CILJEVI

Iako je poznato da Cd unet oralnim putem može da ispolji toksičan efekat na intestinalnu imunost, mehanizmi imunotoksičnosti nisu dovoljno ispitani. Zato je osnovni cilj ove doktorske disertacije karakterizacija efekta subhronične oralne aplikacije Cd na imunski sistem creva.

U okviru lokalnog imunomodulatornog efekta će biti ispitani osnovni parametri imunskog odgovora u duodenumu (regionu najveće apsorpcije Cd u crevima) i glavnim limfnim čvorovima koji dreniraju intestinum (mezenterični limfni čvorovi). Analiza duodenuma će uključiti ispitivanje prisustva pokazatelja oksidativnog stresa i tkivnog oštećenja, histološki evidentnih zapaljenskih promena kao i citokinski odgovor tkiva na unos Cd. Analiza osnovnih fenotipiskih karakteristika i parametara aktivnosti mezenteričnih limfnih čvorova (celularnost, proliferacija, citokinski odgovor, urođeno imunska aktivnost ćelija) će biti vršena u cilju ispitivanja imunskog odgovora ovog limfnog tkiva.

Osim lokalnog, cilj je i ispitati efekte oralne primene Cd na sistemskom nivou uključujući humoralne i ćelijske parametre zapaljenjske reakcije u krvi (promene hematoloških parametara, prisustva medijatora inflamacije i oksidativnog stresa) kao i oksidativni stres i osnovne karakteristike urođenog i adaptivnog imunskog odgovora u slezini, limfnom organu u kome se uspostavlja imunski odgovor na antigene iz krvi.

Da bi se ispitaio uticaj soja na efekat oralno unetog Cd na lokalni i sistemski imunski odgovor, u ovoj doktorskoj disertaciji će se uporedno analizirati efekat ovog metala kod dva soja pacova: Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO), koji uspostavljaju kvalitativno i/ili kvantitativno različit imunski odgovor na iste stimuluse (Kovacevic-Jovanovic i drugi, 2015; Lukic i drugi, 2001; Mirkov i drugi, 2015; Popov Aleksandrov i drugi, 2015).

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Hemikalije i reagensi

Kadmijum-hlorid ( $\text{CdCl}_2$ ) od proizvođača Serva (Feinbiochemica, Hajdelberg, Nemačka), rastvaran je u dejonizovanoj vodi.

RPMI-1640 (Biowest, Nuele, Francuska) tečna podloga dopunjena sa 20  $\mu\text{g/ml}$  gentamicinom (Galenika a.d., Srbija), 5 % (v/v) inaktivisanim fetalnim telećim serumom (engl., Fetal Calf Serum/FCS, Biowest, Nuele, Francuska) i 5  $\mu\text{g/ml}$  vorikonazolom (Pfizer PGM, Francuska), korišćena je za kulturu ćelija (kompletni medijum).

PBS (engl. Phosphate Buffer Saline, pH 7.4) je pravljen od: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1.76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (svi LachNer, Neratovice, Češka).

$^3\text{H}$ -Timidin (GE Healthcare, Little Chalfont, VB) rastvaran je u RPMI-1640 medijumu za kulturu ćelija, i dodavan u kulturu ćelija u finalnoj koncentraciji 5  $\mu\text{Ci/ml}$ .

Za stimulaciju ćelija, konkanavalin A (ConA) i lipopolisaharid (LPS; tip 0111: B4 iz *E. Coli*) rastvarani su u RPMI-1640 medijumu. Forbol-12-miristat-13-acetat (engl., Phorbol-12-Myristate 13-Acetate/PMA) rastvaran je u dimetilsulfoksidu (DMSO). Korišćeni ConA, LPS, PMA i DMSO su od proizvođača Sigma (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, SAD).

Tetrazolijumova so, tetrazolijum nitro plavo (engl., NitroBlue Tetrasolium/NBT; ICN Pharmaceutical, Kosta Mesa, SAD) je rastvarana u destilovanoj vodi u koncentraciji 5 mg/ml.

Supstrat za određivanje aktivnosti mijeloperksidaze (MPO) dobijen je dodavanjem 0.167 mg/ml *o*-dianizidin dihidrohlorida (Sigma) i 0.0005 % vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Zorka Farma, Šabac, Srbija) u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu (pH 6.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma).

Griess-ov reagens sačinjen je od jednakih zapremina 0.1 % rastvora N-(1-naftil) etilendiamin-dihidrohlorida (Sigma-Aldrich Inc, St. Luis, MO, SAD) (u destilovanoj vodi) i 1 % rastvora sulfanilamida (u 5 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (Sigma-Aldrich Inc, St. Luis, SAD).

Sve hemikalije i rastvori korišćeni za rad sa ćelijama sterilisani su pomoću filtera sa porama (Minisart, veličina pora 0.2  $\mu\text{m}$ , Sartorius Stedim Biotech, Getingen, Nemačka) pre upotrebe. Matični rastvori čuvani su na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  ili  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  do upotrebe.

### 3.2. Ekperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni mužjaci DA i AO sojeva pacova, starosti osam do dvanaest nedelja. Pacovi su odgajani na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (IBISS) u Beogradu, pod standardnim uslovima (temperatura 21/24 °C, 60 % relativna vlažnost vazduha, režim svetlo-mrak 12 h, bez ograničenja pristupa hrani i vodi). Eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta IBISS-a (rešenje broj 03-07/15). Tretman životinja i eksperimentalni protokoli su sprovedeni u saglasnosti sa Direktivom 2010/ 63/EU o zaštiti životinja korišćenih u eksperimentalne i druge naučne svrhe.

### 3.3. Tretman pacova kadmijumom

Pacovi su izlagani 30 dana oralno kadmijumu u obliku kadmijum hlorida ( $\text{CdCl}_2$ ), rastvorenog u dejonizovanoj vodi u kojoj je koncentracija Cd bila 5 ppm (5 mg/l) i 50 ppm (50 mg/l). Kadmijum hlorid ( $\text{CdCl}_2$ ) je odabran zbog toga što je ovo jedinjenje Cd najviše korišćeno u ispitivanju efekata oralne izloženosti na životinjskim modelima, lako je rastvorljiv u vodi i njegovom primenom se postiže visoka koncentracija u ciljnim organima. Korišćene su tri eksperimentalne grupe (kontrolna grupa, grupa izložena dozi Cd od 5 ppm i grupa izložena dozi Cd od 50 ppm) sa 4-6 pacova po grupi, po soju i po eksperimentu, u najmanje dva a najviše četiri zasebna eksperimenta. U svakom kavezu su bile smeštene po dve životinje iz iste grupe tretmana. Kontrolni pacovi su dobijali čistu dejonizovanu vodu. Tokom trajanja eksperimentalnog tretmana svi pacovi su imali slobodan pristup hrani i vodi. Rastvori Cd i voda su zamenjivani svežim rastvorima ili vodom dva puta nedeljno tokom 30 dana. Kontrolnim i tretiranim pacovima je merena telesna masa dva puta nedeljno. Takođe, dva puta nedeljno je merena i količina popijene vode po kavezu. Tridesetog dana oralnog tretmana Cd, životinje su anestetizirane *i.p.* injekcijom 40 mg/kg b.w. tiopental natrijuma (Rotexmedica, Tritau, Nemačka).

### 3.4. Praćenje osnovnih metaboličkih parametara

Pred kraj tretmana, 28. i 29. dana pacovi oba soja su pojedinačno smeštani u metaboličke kaveze tokom naredna 24 sata. Metabolički kavezi (Slika 2) omogućuju praćenje metaboličkih aktivnosti pojedinačnih životinja kroz merenje: težine pojedene hrane, zapremine popijene vode, zapremine izlučenog urina i težine fecesa.





**Slika 2.** Metabolički kavez  
preuzeto sa: [http://labexofma.com/ERP/companies/Labex/part\\_pics/8083.jpg](http://labexofma.com/ERP/companies/Labex/part_pics/8083.jpg)

### 3.5. Određivanje tkivne dispozicije kadmijuma

Sadržaj kadmijuma u krvi i tkivu slezine, pluća, creva, MLČ, jetre i bubrega određivan je atomskom apsorpcionom spektrometrijom, grafitnom tehnikom (AAS Varian 1275; graphite tube, GTA-95, Palo Alto, SAD). Uzorci od oko 1 ml pune krvi i 0.5 g tkiva odmereni su na analitičkoj vagi u posudama aparata za mikrotalasnu digestiju (MBS-9, CEM Innovators, Bakingem, VB) u koje je zatim dodato po 7 ml koncentrovane azotne kiseline ( $\text{HNO}_3$ ) i 1 ml 33 % vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Azotna kiselina povećava rastvorljivost metala prevođenjem u nitrite a vodonik peroksid sprečava nastanak azotnih isparenja i ubrzava razlaganje uzoraka sa porastom temperature. Posude su zatvorene i smeštene u sistem za digestiju sa zadatim programom: povećanje temperature do  $200\text{ }^\circ\text{C}$  tokom prvih 15 min i održavanje ove temperature narednih 20 min. Temperatura je praćena na ekranu toplotnog senzora smeštenog u jednu od posuda za digestiju. Po isteku programa, uzorci su ohlađeni do sobne temperature, prebaćeni u staklene čaše od 50 ml u koje je dodato po 5 ml koncentrovane HCl. Čaše su postavljene na parno kupatilo narednih 45 minuta na temperaturu od  $100\text{ }^\circ\text{C}$  kako bi se osigurala precipitacija kadmijuma iz kompleksa koji su potencijalno očuvani i nakon mikrotalasne digestije. Po isteku ovog vremena, uzorci su



profiltrirani kroz filter papir i prebačeni u volumetrijske posude kojima je dodata dejonizovana voda do zapremine od 25 ml.

Atomska apsorpciona spektrofotometrija je apsorpciona metoda koja meri smanjenje intenziteta (apsorbancu) monohromatskog zračenja pri prolasku kroz atomsku paru uzorka. Smanjenje intenziteta zračenja je srazmerno količini analita u atomskoj pari. Kao izvor monohromatskog zračenja koristi se lampa sa šupljom katodom sačinjena od metala koji se ispituje, jer emituje veoma usku spektralnu liniju ispitivanog elementa karakterističnu za dati element. U ovom slučaju korišćena je lampa sa šupljom katodom sačinjena od kadmijuma, a merenje se vršilo na talasnoj dužini od 228.8 nm specifičnoj za kadmijum. Određivanje je rađeno grafitnom tehnikom atomske apsorpcije, što podrazumeva da se atomizacija vrši unutar grafitne kivete, što omogućava veću koncentraciju ispitivanih atoma na manjem prostoru, čime se dobija veća osetljivost. Uzorak se u kivetu unosi u tečnom stanju (20 µl pripremljenog uzorka). Prilikom snimanja, aparat prati temperaturni režim, prilikom koga dolazi do sušenja, mineralizacije uzorka, nakon čega dolazi do atomizacije, pri čemu se meri apsorbanca na osnovu koje se određuje koncentracija analita. Uzorak je sušen na 90 °C i 120 °C, mineralizacija je rađena na 300 °C, dok je atomizacija vršena na 1800 °C. Aparat je kalibrisan serijom standardnih rastvora u opsegu linearnosti, nakon čega se vršilo očitavanje vrednosti za ispitivane uzorke. Vrednosti su očitavane u µg Cd/l pripremljenih rastvora, koje su dalje preračunate na masu čvrstog uzorka pa su koncentracije kadmijuma izražene kao µg kadmijuma po kg mokrog tkiva. Kao kontrolni uzorak upotrebljen je referentni materijal: Seronorm™ Trace Elements Serum L-1 i ClinChek Plasma Control. Limit detekcije metode (LOD) je 0.1 mg/kg (0.00089 mmol/kg) a limit kvantifikacije (LOQ) 0.3 mg/kg (0.00267 mmol/kg).

### **3.6. Histologija**

Uzorci tkiva duodenuma (oko 4 cm dužine distalno od pilorusa želuca), slezine, jetre i bubrega su uzeti odmah nakon žrtvovanja životinje i fiksirani u 4 % formalinu (pH 6.9). Tkiva su zatim sprovedena kroz seriju alkohola (etanola) rastuće koncentracije (70 %, 86 %, 96 % i 100 %), isprana u ksilolu i ukalupljena u parafin. Na mikrotomu su tkiva sečena na debljinu od 5 µm i preseci su obojeni hematoksilinom i eozinom. Histološki preparati su analizirani pomoću digitalnog svetlosnog mikroskopa (Coolscope, Nikon Co, Japan).

U tkivu duodenuma rađena je kvantitativna analiza broja limfocita prisutnih u crevnim resicama, nakon čega je računata srednja vrednost broja ćelija po crevnoj resici (po uzorku).

### **3.7. Ispitivanje promena u duodenumu**

#### **3.7.1. Homogenizacija tkiva**

Uzorci duodenuma (segmenti dužine 4 cm distalno od izlaznog otvora želuca) uzeti su neposredno nakon žrtvovanja životinja. Lumen segmenata je ispran hladnim fiziološkim rastvorom, nakon čega su segmenti uzdužno isečeni, očišćeni špatulom od sadržaja i zamrznuti u tečnom azotu na - 80 °C do upotrebe. Pre homogenizacije, uzorci su otopljeni na ledu i odmereno je 0.5 g tkiva na analitičkoj vagi. Uzorci tkiva su zatim homogenizovani u 5 ml saharoznog pufera (pH 7.6; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 250 mM saharoza) pomoću električnog homogenizatora (IKA T18 Basic Homogenizer, IKA Works Inc., Vilmington NC, SAD), u trajanju od tri puta po 15 s sa pauzama između intervala od 10 s. Homogenati su potom sonifikovani pomoću laboratorijskog sonifikatora (Bandelin electronic, UW 2070, Berlin, Nemačka). Ceo proces homogenizacije i sonifikacije rađen je na ledu. Deo homogenata centrifugiran je 15 min na 3000 rpm na 4 °C (Eppendorf AG, Nemačka) i supernatant je izdvojen za merenje sadržaja citokina. Preostali deo homogenata je centrifugiran u ultracentrifugi 1 h i 45 min, na 100000 x g i 4 °C. Supernatanti su izdvojeni za merenje parametara oksidativnog stresa u duodenumu.

#### **3.7.2. DGGE (Engl, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, elektroforeza u gradijentu denaturišućeg agensa) analiza**

Kako bi se odredio diverzitet kolonija komensalnih bakterija (Rod *Lactobacillus*) u duodenumu, prvo je izolovana bakterijska DNK iz tkiva duodenuma pomoću QIAamp DNA stool minikit (Qiagen, Hilden, Nemačka). Izolovana DNK je upotrebljena kao matrica za lančano umnožavanje (engl., Polymerase Chain Reaction/PCR) prema metodi Heilig-a i saradnika (2002), upotrebom seta prajmera specifičnih za laktobacile Lab-0159f (sekvenca prajmera: GGA AAC AG (A/G) TGC TAA TAC CG) i Uni-0515r (sekvenca prajmera: ATC GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA) (Metabion International, Martinsred, Nemačka). Reakcija lančanog umnožavanja je vršena u aparatu Gene AmpRPCR system 2700 (AppliedBiosystems, Foster Siti, SAD). Umnožavanje je vršeno dodavanjem 10 pmol svakog od prajmera, 1 U (jedinica aktivnosti) Kapa Taq DNK Polimeraze (Kapa Biosystems, Kejp Taun, Južna Afrika), 1 × TaqA pufera sa magnezijumom, 0.2 mM dNTP (Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija) i 1 µl izolovane DNK. Neposredno nakon završetka reakcije, PCR produkti su pomešani sa bojom za nanošenje 6 × Loading Dye Solution (Thermo Scientific) u

odnosu 3:1 i 10  $\mu$ l smeše naneto je na gel sa gradijentom denaturišućeg agensa koji je pripremljen uz pomoć aparata DGGE-2001 (C.B.S. SCIENTIFIC, San Diego, Kalifornija, SAD) po protokolu koji su opisali Lukic i saranici (2013). Gelovi su fiksirani 20 min u 10 % etanolu i 0.5 % glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Zatim su 10 min bojani u 0.1 % srebro-nitratu. Razvijanje je vršeno sve do pojave vidljivih traka u 1.5 % rastvoru natrijum hidroksida (NaOH), 0.1 % natrijum-borhidridu (NaBH<sub>4</sub>) i 0.048 % formaldehidu. Svi opisani koraci izvođeni su na sobnoj temperaturi u zamračenoj posudi uz blago mešanje. Razvijeni gelovi su fotografisani.

### 3.7.2.1. Sekvenciranje DGGE traka

Trake od interesa su isečene iz gela sterilnim hirurškim skalpelom. Isečeno parče gela postavljeno je u tubu od 1.5 ml gde je dodato 60  $\mu$ l sterilne bidestilovane vode. Gel je izdrobljen teflonskim tučkom nakon čega je suspenzija inkubirana 10 min na 98 °C. Nakon koraka inkubacije suspenzija je vorteksovana i centrifugirana 2 min na 15 500  $\times$  g (5415D, Eppendorf centrifuge). Supernatanti (30  $\mu$ l) su korišćeni za dalju analizu. Sa 5  $\mu$ l supernatanta urađena je PCR reakcija sa prajmerima Lab-0159f/Uni-0515r (Heilig i drugi, 2002) uz gore navedene uslove i povećanje temperature za vezivanje prajmera na 68 °C kako bi se sprečilo umnožavanje pozadinskih signala sa DGGE gela. Ukupna zapremina PCR smeše bila je 30  $\mu$ l, a umnožavanje je vršeno uz 1 U Kapa polimeraze, 1  $\times$  TaqA pufer, 10 pmol svakog od prajmera i 0.2 mM koncentraciju dNTP smeše. Dobijeni PCR produkti prečišćeni su QIAquick sistemom za prečišćavanje PCR produkata (Qiagen) i ligirani su u pBluescriptT/A vektor (Uzelac i drugi, 2015). Ligirani konstrukti su transformisani u Ca<sup>2+</sup> kompetentne Escherichia coli DH5 $\alpha$  ćelije (Hanahan, 1983). Ukratko, ukupna zapremina ligacione smeše (10  $\mu$ l) dodata je pripremljenim kompetentnim DH5 $\alpha$  ćelijama (200  $\mu$ l), nakon čega su ćelije inkubirane na ledu 40 min uz povremeno blago mešanje. U sledećem koraku ćelije su izložene toplotnom šoku na 42 °C u trajanju od 90 s i neposredno posle smeštene na led. Posle 5 min inkubacije na ledu, ćelijama je dodat LB medijum za regeneraciju nakon čega su ćelije regenerisane 1 h na 37 °C uz kontinuirano mešanje. Bakterijska suspenzija je utrljana na čvrste selektivne LA (Luria Agar) podloge sa 100  $\mu$ g/ml ampicilina i 20  $\mu$ g/ml X-Gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid). Transformanti sa insertom su selektovani nakon 24 h aerobne inkubacije na 37 °C kao bele kolonije. Bele kolonije su zasejane u tečni LB medijum sa 100  $\mu$ g/ml ampicilina i iz prekonocne kulture su izolovani plazmidi pomoću QIAprep Spin Miniprep sistema (Qiagen). Sekvenciranje izolovanih pBluescriptT/A vektora sa ligiranim PCR produktima urađeno je M13F/R parom prajmera u Macrogen Europe servisu u Amsterdamu, Holandija

([http://dna.macrogen.com/eng/support/seq/seq\\_uniprimer.jsp](http://dna.macrogen.com/eng/support/seq/seq_uniprimer.jsp)). Identifikacija sekvenci obavljena je upotrebom BLAST programa (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### **3.7.3. Određivanje nivoa HMGB1 (High Mobility Group Box1) molekula Western blot metodom**

#### **3.7.3.1. Izolacija tkivnih homogenata**

Tkivo duodenuma (100 µg) je homogenizovano u 1 ml hladnog saharoznog pufera kome je dodata smeša inhibitora proteaza (Protease inhibitors mix G, Serva Electrophoresis GmbH, Hajdelberg, Nemačka). Dobijeni homogenati su centrifugirani na  $9700 \times g$  na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  tokom 20 min. Supernatanti sa proteinima su prebačeni u nove epruvete i trenutno su zamrznuti u tečnom azotu i ostavljeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do upotrebe.

#### **3.7.3.2. Elektroforetsko razdvajanje proteina na poliakrilamidnom gelu**

Homogenati tkiva (50 µg) razblaženi su u  $2 \times$  Lemli puferu [(Tris-HCl pH 6.8, SDS,  $\beta$ -merkaptoetanol (Applichem, Darmstadt, Nemačka), bromfenol plavo (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD), glicerol (LachNer, Neratovice, Češka)] u cilju denaturacije proteina i zagrevani na  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  tokom 5 min. Proteini uzoraka homogenata duodenuma razdvojeni su elektroforezom u Bio-Rad sistemu (Mini-PROTEAN II, Electrophoresis Cell. Cat. Num. 165-2940) na 12 % SDS-poliakrilamidnom gelu [0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.05 % amonijum-persulfat (AMPS) i 0.05 % TEMED (tetrametilendiamin)]. Preko polimerizovanog 12 % gela nalivan je 4 % gel za koncentrovanje uzorka (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% AMPS i 0.1% TEMED). Elektroadni pufer za elektroforezu sadrži 0.192 M glicin, 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, i 0.1% SDS (Laemmli, 1970). Elektroforetsko razdvajanje proteina vršeno je pod naponom od 0.12 kV u gelu za koncentrovanje, tj. 0.15 kV kroz gel za razdvajanje proteina u trajanju od 1 h.

#### **3.7.3.3. Prenos proteina na membranu**

Razdvojeni proteini su zatim prebačeni na PVDF, polivinil difluoridnu membranu (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, Bakingamšir, Engleska), pomoću (vlažnog) sistema za transfer (Fastblot B43, Biorad, Minhen, Nemačka). Delovanjem konstantne struje prenos proteina vršen je na 0.03 kV i 40 mA u trajanju od 16 h. Po završenom transferu membrana je bojena bojom Ponceau-S (1 % 53 Ponceau-S u 5 % sirćetnoj kiselini) kako bi se proverila uspešnost elektroforeze i transfera proteina.

#### **3.7.3.4. Imunoblot analiza proteina - Western blot**

Nespecifično vezivanje antitela blokirano je inkubacijom uzoraka 1h na sobnoj temperaturi u 5 % nemasnom mleku u 0.2 % rastvoru Tween 20 u TBS puferu [20 mM Tris-

HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl] skraćeno TBS-T puffer (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD). Za Western imunoblot analizu korišćena su mišije monoklonsko anti-HMGB1 (Sigma-Aldrich, H9537) i zečije anti- $\beta$ -aktin (Abcam, Ab8227) primarna antitela rastvorena u 3 % rastvoru mleka u TBS-T puferu. Membrane su inkubirane sa primarnim antitelima 2 h na sobnoj temperaturi uz lagano mešanje. Nakon ispiranja od primarnog antitela TBS-T puferom usledila je inkubacija sa sekundarnim antitelima konjugovanim sa peroksidazom rena: anti-mišiji IgG (Cell Signaling, 7076S) i goveđi anti-zečiji IgG (Santa Cruz Biotechnology, SC-2379) u trajanju od 1h na sobnoj temperaturi uz lagano mešanje. Nakon inkubacije nevezana sekundarna antitela uklonjena su ponovnim ispiranjem TBS-T puferom. Vizuelizacija imunoreaktivnih traka vršena je pomoću sistema za detekciju hemiluminiscencije (ECL, Santa Cruz Biotechnology) prema preporukama proizvođača. Imunoreaktivne trake su kvantifikovane pomoću TotalLab (Phoretix) softvera za elektroforezu, a nivoi proteina su izraženi kao relativne promene (kontrola je dodeljena vrednost 1).

#### **3.7.4. Određivanje koncentracije proteina Lowry-jevom metodom**

Koncentracija proteina u uzorcima homogenata creva merena je Lowry-jevom metodom (Lowry i drugi, 1951) koja je zasnovana na reakciji peptidnih veza i jona bakra u baznoj sredini. Po 20  $\mu$ l uzoraka mešano je sa 300  $\mu$ l rastvora koga čine: 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Carlo Erba, Milano, Italija) u NaOH (LachNer, Neratovice, Češka), 1 % CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O (Zorka, Šabac, Srbija) i 2 % K-Na-tartarat (Alkaloid, Skoplje, Makedonija) u H<sub>2</sub>O. Nakon inkubacije u trajanju od 15 min na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodavano po 60  $\mu$ l Folin-Ciocalteu reagensa (Mol, Beograd, Srbija) razblaženog 5 puta u destilovanoj vodi. Nakon 30 min inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku, po 100  $\mu$ l uzorka je sipano u triplikatu u mikrotitar ploču i merena je apsorbance uzoraka na 670 nm automatskim ELISA čitačem (GRD, Rim, Italija). Srednja vrednost tri izmerene vrednosti je uzimana za vrednost apsorbance. Za konstruisanje standardne krive, na osnovu koje su određivane koncentracije proteina u uzorcima, korišćen je rastvor goveđeg serumskog albumina (engl, Bovine Serum Albumin/BSA; Frakcija V, Sigma Chemical) u dejonizovanoj vodi (0.1- 1 mg/ml). Dobijene vrednosti proteina (u mg/ml) korišćene su za preračunavanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane.

### **3.7.5. Procena parametara oksidativnog stresa**

#### **3.7.5.1. Određivanje nivoa malondialdehida (MDA)**

Krajnji produkt oksidacije nezasićenih masnih kiselina ćelijske membrane je malondialdehid (MDA), biohemijski marker stepena oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana. U reakciji MDA sa tiobarbiturnom kiselinom u homogenatima tkiva nastaju jedinjenja žute boje, TBARS - (TBA - reagujuće supstance) čija se koncentracija meri spektrofotometrijski (Girotti i drugi, 1991). Uzorcima homogenata tkiva duodenuma (50 µl) dodat je Tris-Cl (pH 7.6) i TBA reagens (tiobarbiturna kiselina, HCl, trihlorsirćetna kiselina; Zorka Farma) i smeša je inkubirana na 60 °C tokom 1 h. Nakon inkubacije, reakciona smeša je ohlađena do nivoa sobne temperature i centrifugirana na 3000 rpm (Eppendorf AG, Nemačka) tokom 10 min. Zatim je po 200 µl supernatanta prebačeno u mikrotitar ploču i očitavana je apsorbanca na automatskom ELISA čitaču na 540 nm. Standardna kriva je konstruisana na osnovu apsorbaneci poznatih koncentracija MDA. Količina lipidnih peroksida je izražena u nM/mg proteina.

#### **3.7.5.2. Određivanje nivoa redukovanog glutationa - GSH**

Uzorci tkiva duodenuma su homogenizovani u 10% sulfosalicilnoj kiselini (SAA, MOL, Beograd, Srbija) pomoću električnog homogenizera tkiva čemu je sledila sonifikacija. Uzorci su centrifugirani na 8000 x g tokom 10 min na 4 °C. Supernatant je razblažen 10 x i zamrznut na - 80 °C. U talog sa proteinima je dodat 1M NaOH preko noći na sobnoj temperaturi, čemu je sledilo centrifugiranje na 12000 rpm (Eppendorf AG, Nemačka) tokom 20 min. U dobijenim supernatantima je merena koncentracija proteina po Lowry-ovoj metodi.

U osnovi određivanja sadržaja GSH je reakcija između GSH i DTNB (5,5'-ditio-bis )2-nitrobenzoična kiselina, Elmanov reagens) u kojoj se formira obojeno jedinjenje TNB (5-tio-2-nitrobenzoična kiselina) i kompleks oksidovanog glutationa i TNB-a. Reakcionu smešu čine 100 µl uzorka 10 x razblaženog homogenata, dejonizovana voda, Tris-Cl (pH 8.9, rastvoren u dejonizovanoj vodi) i DTNB rastvoren u metanolu. Tako pripremljen uzorak se inkubira na sobnoj temperaturi 20 min, u mraku (zbog nestabilnosti DTNB-a u prisustvu svetlosti). Po 200 µl uzorka je naliveno u mikrotitar ploču u triplikatu i merena je apsorbanca na 405 nm pomoću automatskog ELISA čitača (GRD). Standardna kriva je određivana na osnovu apsorbaneci poznatih koncentracija GSH. Nivoi GSH su izraženi kao µM GSH/mg proteina. Protokol je prilagođen prema Rahman i drugi (2006).

### **3.7.5.3. Merenje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite: superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation-S-transferaze(GST)**

#### Određivanje aktivnosti SOD (EC 1.15.1.1)

Enzim SOD katalizuje reakciju neutralizacije superoksidnog anjon radikala ( $O_2^{\bullet-}$ ). Aktivnost ukupne SOD u homogenatima tkiva zasniva se na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini. Aktivnost ukupne SOD određivana je epinefrinskom metodom (Misra i Fridovich, 1972), kao promena apsorbancije u vremenu na talasnoj dužini od 480 nm. Reakciona smeša je sadržala 20  $\mu$ l uzorka, 3 ml natrijum-bikarbonatnog pufera ( $Na_2CO_3$  i EDTA rastvoreni u dejonizovanoj vodi; pH 10.2) i 20  $\mu$ l epinefrina (Sigma). Promena apsorbance je merena na svakih 1 min u ukupnom trajanju od 10 min na spektrofotometru (Shimadzu UV-160, Kjoto, Japan). Jedinica aktivnosti enzima definisana je kao količina enzima neophodna da smanji stopu autooksidacije adrenalina za 50 % u baznoj sredini, u linearnom delu promene apsorbance u minuti. Aktivnost ukupne SOD izražena je u jedinicama po miligramu proteina (U/mg proteina).

#### Određivanje aktivnosti CAT (EC 1.11.1.6)

Katalaza (CAT) razlaže vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) do vode i kiseonika. Aktivnost katalaze određivana je merenjem stope razlaganja  $H_2O_2$ , spektrofotometrijski (Shimadzu UV-160) na 240 nm (Beutler, 1982). Uzorcima (20  $\mu$ l) je dodavan Tris-EDTA pufer (pH 8) i  $H_2O_2$ . Promena apsorbancije je merena na svakih 30 s tokom 180 s. Jedinica aktivnosti katalaze definisana je kao količina enzima koja razloži 1 mmol  $H_2O_2$  u minuti na 25 °C. Aktivnost CAT izražena je u jedinicama po miligramu proteina (U/mg proteina).

#### Određivanje aktivnosti GST (EC 2.5.1.18)

Glutation-S-transferaza (GST) smanjuje reaktivnost različitih elektrofilnih supstanci njihovim vezivanjem za GSH. Princip metode zasniva se na sposobnosti enzima GST da katalizuje reakciju vezivanja 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (DNCB) za sulfhidrilnu grupu cisteina koji ulazi u sastav GSH, pri čemu se formira DNCB-GSH kompleks. Stopa porasta apsorbance usled formiranog DNCB-GSH direktno je proporcionalna aktivnosti GST u uzorku. Reakcionu smešu za merenje aktivnosti enzima je osim uzorka (10  $\mu$ l) činila dejonizovana voda, DNCB rastvoren u 95 % etanolu, fosfatni pufer (pH 6.5) i GSH. Povećanje apsorbancije je praćeno spektrofotometrijski (Shimadzu UV-160) na talasnoj dužini od 340 nm na svakih 30 s tokom 180 s na temperaturi od 25 °C. Jedinica aktivnosti GST izražava se kao broj nanomola DNCB-GSH kompleksa nastalog u minuti (U = nmol DNCB-GSH/min). Aktivnost GST izražena je u jedinicama po miligramu proteina (U/mg proteina).



#### **3.7.5.4. Merenje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO) u homogenatu tkiva**

Aktivnost mijeloperoksidaze (MPO) je procenjena na osnovu oksidacije supstrata *o*-dianizidin dihidrohlorida (Bozeman i drugi, 1990) u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. MPO aktivnost je merena tako što je u 33 µl homogenata dodato 966 µl supstrata za određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze (0.167 mg/ml *o*-dianizidin dihidrohlorid, 0.0005 % vodonik peroksid u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu). Apsorbancija je očitavana nakon 10 min na talasnoj dužini od 450 nm pomoću automatskog ELISA čitača. Aktivnost MPO u homogenatima preračunata je na osnovu standardne krive konstruisane prema poznatim koncentracijama MPO (Sigma-Aldrich). Aktivnost enzima je prikazana u jedinicama MPO (U) /ml homogenata.

#### **3.7.6. Određivanje produkcije citokina (TNF, IL-1β, IL-17, IFN-γ, IL-10) u homogenatu duodenuma imunoenzimskim testom na čvrstoj fazi (engl, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay/ELISA)**

Koncentracija citokina u homogenatima tkiva duodenuma određivana je upotrebom komercijalno dostupnih setova za ELISA test za mišiji IL-17 (koji je reaktivan sa pacovskim IL-17), pacovski TNF, pacovski IFN-γ (eBioscience Inc., San Diego, CA, SAD), pacovski IL-1β i pacovski IL-10 (R&D systems, Mineapolis, SAD). Testovi su izvođeni prema uputstvu proizvođača. Količina citokina određivana je sa standardne krive koja je konstruisana na osnovu poznate količine rekombinantnih IL-17, TNF, IFN-γ, IL-1β i IL-10.

### **3.8. Ispitivanje promena u mezenteričnim limfnim čvorovima (MLČ) i slezini**

#### **3.8.1. Priprema ćelija mezenteričnih limfnih čvorova**

Nakon 30 dana oralnog tretmana Cd izolovani su mezenterični limfni čvorovi (MLČ) koji dreniraju crevo. Izmerena masa MLČ na analitičkoj vagi (+/- 0.0001 g) je prikazana kao relativna masa prema formuli: [masa MLČ (mg) / masa tela (g)] x100 %. Suspenzija ćelija MLČ pripremana je pod sterilnim uslovima, mehaničkim istiskivanjem ćelija kroz najlon mrežice (70 µm nylon, BD Bioscience, Bedford, SAD). Izolovane ćelije su resuspendovane u kompletnom medijumu. Ukupan broj ćelija i vijabilnost su određivani brojanjem ćelija razblaženih u 0.1 % Tripan plavom, pomoću Neubauer hemocitometra. Vijabilnost je određivana na osnovu formule: broj živih/broj mrtvih x 100 %, i uvek je prelazila 95 %. Koncentracija ćelija je podešavana na 5 x 10<sup>6</sup> ćelija/ml.



### 3.8.2. Ispitivanje promena u tkivu slezine

Masa i otisak slezine

Slezina, izvađena pod sterilnim uslovima, izmerena je na analitičkoj vagi. Prikazana je relativna masa slezine prema formuli: [masa slezine (mg) / masa tela (g)] x 100 %. Nakon merenja, slezina je presečena na dva dela i pravljen je razmaz/otisak prevlačenjem preseka slezine preko staklene mikroskopske pločice. Nakon sušenja razmaza na vazduhu, uzorci su obojeni prema May Grunwald Giems protokolu (Alkaloid AD, Skopje, Makedonia) i diferencijalni sastav leukocita je određivan brojanjem bar 1000 ćelija po uzorku.

#### Određivanje nivoa HMGB1 (High Mobility Group Box1) molekula u homogenatu slezine Western blot metodom

Tkivo slezine (100 µg) je homogenizovano u 1 ml hladnog saharoznog pufera kome je dodata smeša inhibitora proteaza (Protease inhibitors mix G, Serva Electrophoresis GmbH, Hajdelberg, Nemačka). Dobijeni homogenati su centrifugirani na  $9700 \times g$  na 4 °C tokom 20 min. Supernatanti sa proteinima su prebačeni u nove epruvete i trenutno su zamrznuti u tečnom azotu i ostavljeni na - 80 °C do upotrebe, dok je talog sa ćelijskim debrisom i DNK odbačen. Elektroforetsko razdvajanje proteina na poliakrilamidnom gelu, prenos proteina na membranu i imunoblot analiza proteina rađeni su kao što je opisano za uzorke tkiva duodenuma.

### 3.8.3. Priprema ćelija slezine

Ćelije slezine (splenocyte) su izolovane pod sterilnim uslovima, mehaničkim istiskivanjem tkiva slezine kroz mrežice (BD Falcon, BD Bioscience, Bedford, SAD). Izolovane ćelije su resuspendovane u kompletnom RPMI-1640 medijumu. Ukupan broj ćelija i vijabilnost su određivani brojanjem ćelija razblaženih u 0.1 % Tripan plavom, pomoću Neubauer hemocitometra. Vijabilnost je određivana na osnovu formule: broj živih / broj mrtvih x 100 %, i uvek je prelazila 95 %. Koncentracija ćelija je podešavana na  $3 \times 10^6$  ćelija/ml.

Izolovane ćelije MLC i slezine su kultivisane u inkubatoru za gajenje ćelija (Flow Laboratories CO<sub>2</sub> incubator 1500, ICN Flow, SAD), u mikrotitar pločama sa 96 mesta (Spektar, Čačak, Srbija), pod standardnim uslovima (koncentracija CO<sub>2</sub> 5 %, vlažna atmosfera, temperatura 37 °C), tokom 48 h.

#### **3.8.4. Merenje proliferativnog odgovora ćelija MLČ i slezine**

Za određivanje proliferativnog odgovora, suspenziji ćelija MLČ ili slezine ( $0.3 \times 10^6$  ćelija / bunariću u 100  $\mu$ l) dodato je 20  $\mu$ l medijuma (nestimulisana proliferacija) ili 20  $\mu$ l ConA (finalno 2.5  $\mu$ g ConA/ml ćelijske kulture; stimulisana proliferacija). Uzorci za nestimulisanu i stimulisanu proliferaciju su postavljeni u duplikatu u ploče za mikrokulturu sa 96 mesta (Spektar, Čačak), tokom 48 h. Nakon 48 h kultivacije dodat je [ $^3$ H]-timidin (0.5  $\mu$ Ci/bunariću; GE Healthcare, VB) i uzorci su inkubirani narednih 16 h. Skidanje kultura vršeno je pomoću poluautomatskog skidača kultura (Titertec Cell Harvester, ICN Flow, SAD). Proliferativna aktivnost određivana je na osnovu ugradnje radioaktivno obeleženog timidina u ćelijsku DNK što je mereno  $\beta$ -scintilacionim brojačem (LKB-1219, Rackbeta, Finska). Proliferacija je izražena kao broj otkucaja u minutu (b.o.m.).

#### **3.8.5. Procena apoptoze ćelija MLČ i slezine dvostrukim bojenjem aneksinom V i propidijum jodidom**

Kod ćelija koje ulaze u apoptozu, sastavni protein ćelijske membrane, fosfatidil serin, se premešta iz citoplazmatskog u spoljašnji sloj plazma membrane gde se za njega može vezati aneksin V. Propidijum jodid se koristi kao kontrastna boja koja može ući samo u ćelije kojima je narušena celovitost plazma membrane. Za analizu je korišćen Aneksin V kit za detekciju apoptoze (alofikocjaninom/APC obeležen aneksin V i propidijum jodid; eBioscience Inc., San Diego, CA, SAD) sledeći uputstva proizvođača. Ukratko, sveže izolovane ćelije ( $2 \times 10^6$ ) se centrifugiraju na 700 x g, 5 min, čemu sledi ispiranje u PBS-u pod istim uslovima. Zatim se u talog dodaje aneksin vezujući pufer i uzorci se centrifugiraju na 700 x g, 5 min. Talog ćelija se resuspenduje u 100  $\mu$ l aneksin vezujućeg pufera, kome je dodato 2  $\mu$ l aneksina V i inkubira se 15 min u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u aneksin vezujućem puferu, uzorcima se dodaje po 200  $\mu$ l vezujućeg pufera i 3  $\mu$ l propidijum jodida. Po završetku bojenja, uzorci su analizirani na protočnom citofluorimetru. Žive ćelije su detektovane kao duplo negativne (aneksin V negativne, propidijum jodid negativne), rane apoptotične ćelije su detektovane kao aneksin V pozitivne - propidijum jodid negativne dok su ćelije u kasnoj apoptozi bile dvostruko pozitivne ćelije (aneksin V pozitivne - propidijum jodid pozitivne). Ukupan procenat apoptotskih ćelija je prikazan sabiranjem procentualne zastupljenosti ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi.

### 3.8.6. Fenotipska karakterizacija ćelija MLČ i slezine protočnom citofluorimetrijom

Fenotipska analiza ćelija MLČ i slezine je urađena korišćenjem antitela za markere ćelija pacova uključujući CD4, CD8 $\alpha$ , NKG2D (za NK ćelije), HIS48 (za granulocite) metodom protočne citofluorimetrije. Analiza zastupljenosti ćelija sa CD68 (M1-slični makrofagi) i CD163 (M2-slični makrofagi) markerima rađena je samo za ćelije MLČ. Korišćena su mišija antitela za pacovski CD4, CD8 $\alpha$ , HIS48 i CD314 (NKG2D) od proizvođača eBioscience (eBioscience Inc., San Diego, CA, SAD). Membranska ekspresija CD4, CD8 $\alpha$ , NKG2D i HIS48 molekula određivana je nakon inkubacije ćelija ( $1 \times 10^6$ ) sa direktno obeleženim antitelima: CD4 i HIS48 antitelima obeleženim sa FITC-om (Fluorescein izotiocianat) i CD8 $\alpha$  i NKG2D antitelima obeleženim sa PE-om (Fikoeritrin).  $1 \times 10^6$  ćelija inkubirano je sa antitelima u finalnoj zapremini od 100  $\mu$ l, 45 min na 4 °C. Nakon toga ćelije su ispirane dva puta u PBS-u sa 0.1 % natrijum azidom i zatim fiksirane u 1 % paraformaldehidu. Svi koraci su rađeni na 4 °C. Analiza je vršena na CyFlow Space sistemu (Partec, Minhen, Nemačka). Minimum 10000 događaja/ uzorku je postignuto za svako merenje i za analizu je korišćen FlowMax softver (Partec). Rezultati su izraženi kao srednji procenat zastupljenosti pozitivnih ćelija u ćelijskoj populaciji pojedinačnih uzoraka MLČ odnosno splenocita.

Ekspresija adhezivnog molekula CD11b je određivana inkubacijom ćelija MLČ ili splenocita ( $1 \times 10^6$ ) sa mišijim antipacovskim CD11b antitelom (Monoklonsko antitelo OX-42; AbD Serotec, Serotec Ltd., Oksford, VB), na ledu 30 min. Uzorci su isprani PBS-om i inkubirani narednih 30 min sa PE obeleženim F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub> kozijim anti mišijim IgG (eBioscience). Nakon bojenja, ćelije su isprane u PBS-u, fiksirane u 1 % paraformaldehidu i čuvane u mraku na 4 °C do analize.

Ekspresija CD163 je merena inkubacijom MLČ ćelija sa mišijim antipacovskim CD163 (Serotec) tokom 30 min, nakon čega je rađeno bojenje sa FITC-obeleženim F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub> kozijim anti mišijim IgG narednih 30 min. Po završenom bojenju, za detekciju CD68<sup>+</sup> ćelija, ćelije MLČ su fiksirane u paraformaldehidu, permeabilizovane 15 min pomoću PBS-a sa 0.2 % Tween-20 (Sigma Chemical) i inkubirane 30 min sa mišijim anti pacovskim Alexa Fluor 488 obeleženim CD68 (Serotec). Nakon bojenja, ćelije su dva puta isprane u PBS-u, fiksirane u 1 % paraformaldehidu i čuvane u mraku, na 4 °C do analize.

Rezultati citofluorimetrijske analize su predstavljeni kao procenat ćelija za koje je vezano antitelo za ispitivani marker. Odgovarajuća izotopska kontrolna antitela su korišćena za postavljanje okvira čitanja zastupljenosti ćelijskih markera. Udeo ćelija obojenih izotipskim kontrolnim antitelima bio je uvek < 1 %. U svim analizama, nivo autofluorescence

određen je na kontrolnim uzorcima kojima nisu dodata antitela, i ona je bila manja od 0.5 % pozitivnih ćelija.

### **3.8.7. Merenje produkcije citokina u kondicioniranom medijumu kulture ćelija imunoenzimskim testom na čvrstoj fazi**

Za određivanje produkcije citokina (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 i IL-17) od strane ćelija drenirajućih limfnih čvorova, postavljano je  $5 \times 10^6$  ćelija/ml kulture u finalnoj zapremini od 220  $\mu$ l, dok je za određivanje produkcije ovih citokina od strane ćelija slezine postavljano  $3 \times 10^6$  ćelija/ml u finalnoj zapremini kulture od 200  $\mu$ l, u pločama sa 96 mesta. Ćelije su gajene tokom 48 h u prisustvu medijuma (nestimulisana produkcija) ili ConA (1  $\mu$ g/ml kulture, stimulisana produkcija). Nakon inkubacije, ploče sa ćelijskom kulturom su centrifugirane na 1200 rpm (Eppendorf AG) u trajanju od 10 min. U dobijenom supernatantu (kondicioniranom medijumu) merena je produkcija citokina korišćenjem komercijalno dostupnih ELISA setova za pacovski IFN- $\gamma$  i mišiji IL-17 koji je kros-reaktivan sa pacovskim IL-17 (eBioscience Inc., San Diego, CA, SAD), kao i pacovski IL-1 $\beta$  i pacovski IL-10 (R&D systems, Mineapolis, SAD), prema uputstvu proizvođača. Apsorbanca je merena na automatskom ELISA čitaču na talasnoj dužini od 450 nm (referentna vrednost 570 nm). Koncentracija citokina je preračunata na osnovu standardne krive konstruisane korišćenjem poznatih koncentracija odgovarajućih rekombinativnih citokina i izražavana je u pg/ml.

### **3.8.8. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (Engl, Real Time-Polymerase Chain Reaction /RT-PCR)**

Nivo ekspresije gena za citokine (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, p19, p35 i p40) u ćelijama MLČ i gena za metalotioneine (MT1, MT2) u ćelijama MLČ i slezine određivan je reakcijom lančanog umnožavanja u realnom vremenu. Pomoću RT-PCR detektuju se produkti umnožavanja DNK u toku eksponencijalne faze, u kojoj se u toku svakog ciklusa, količina DNK duplo uvećava.

#### **3.8.8.1. Priprema uzoraka za reakciju lančanog umnožavanja**

Totalna RNK izolovana je iz  $5 \times 10^6$  ćelija MLČ ili slezine, dodavanjem po 500  $\mu$ l rastvora za izolaciju RNK (mi-Total RNA Isolation Kit; Metabion, Martinsried, Nemačka) prema uputstvima proizvođača. Uzorci su čuvani na -20 °C do dalje upotrebe, kada je uzorcima dodavano po 100  $\mu$ l hloroforma (Merck, Darmstadt, Nemačka) čemu je sledila inkubacija na 4 °C tokom 15 min i centrifugiranje na 12000 x g u trajanju od 20 min, na 4 °C.

Nakon centrifuge u epruvetama su se mogla razlikovati tri sloja: gornji sa RNK, srednji sa DNK i donji sa proteinima.

U nove epruvete u koje je prebačen gornji sloj, dodavano je po 300  $\mu$ l izopropanola (Zorka, Šabac, Srbija) uz stalno mešanje. Nakon inkubacije na - 20 °C tokom 10 min, epruvete su centrifugirane 20 min na 12000 x g, čime je postignuta precipitacija RNK na dno epruvete. Supernatant je odbacivan a talog se ispirao dodavanjem po 700  $\mu$ l etanola (Zorka, Šabac, Srbija), da bi se RNK nakon centrifugiranja (12000 x g, 10 min, 4° C) resuspendovala u destilovanoj vodi.

#### **3.8.8.2. Reakcija reverzne transkripcije**

Nakon izolacije RNK vršeno je prepisivanje (engl, reverse transcription/reverzna transkripcija) 1  $\mu$ g RNK u komplemetarnu DNK (cDNK) dodavanjem po 1  $\mu$ l nasumičnih heksamernih prajmera (Applied Biosystems), 1  $\mu$ l smeše dezoksiribonukleotidtrifosfata (dNTP, Fermentas, Vilnius, Litvanija) i 10  $\mu$ l vode u uzorke sa rastvorenim RNK. U sledećem koraku reakciona smeša sa RNK je inkubirana na 70 °C 10 min, radi denaturacije sekundarne strukture RNK, posle čega su uzorci ostavljani 2 min u ledu radi vezivanja prajmera za RNK. Zatim se u uzorke dodavalo po 4  $\mu$ l koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju (5 x reaction buffer, Fermentas, Vilnius, Litvanija), 1  $\mu$ l enzima reverzne transkriptaze iz Moloni leukemija virusa (Fermentas), 0.5  $\mu$ l inhibitora RNA-ze (Fermentas, Vilnius, Litvanija) i 2.5  $\mu$ l vode do ukupne zapremine od 20  $\mu$ l po uzorku. Uzorci su inkubirani na 25 °C, 15 min, čemu je sledila inkubacija na 42 °C, 60 min. Reakcija je prekinuta inkubacijom uzoraka na 70 °C, 10 min i 95 °C, 3 min.

#### **3.8.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja**

Za RT-PCR, po 2  $\mu$ l 10 puta razblažene cDNK i po 8  $\mu$ l reakcione smeše za PCR dodavano je u ploču sa 96 mesta za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD). Reakciona smeša se sastojala od 5  $\mu$ l SYBR Green (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD) koji se nespecifično vezuje za DNK, po 1  $\mu$ l specifičnih prajmera (Metabion, Martinsried, Nemačka) koji prepoznaju sekvencu cDNK od interesa i na kraju je dodato po 2  $\mu$ l vode. Svi uzorci su rađeni u duplikatu. Preko ploče sa uzorcima je postavljan prijanjajući film (Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD) nakon čega je ploča centrifugirana 2 min na 1000 x g i postavljena u aparat za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD). Umnožavanje cDNK se odvijalo pod sledećim uslovima: početni korak aktivacije dUTP na 50 °C tokom 5 min, praćen korakom na 95 °C tokom 10 min kako bi došlo do denaturacije DNK, nakon čega je sledilo 40 ciklusa umnožavanja cDNK. Svaki

ciklus sastojao se iz denaturacije (15 s na 95 °C), vezivanja pramera za lanac cDNK i sinteze novog lanca cDNK (1 min na 60 °C) Za analizu dobijenih rezultata korišćen je kompjuterski program (7000 System software, Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD). Nivo ekspresije iRNK je preračunat u odnosu na ekspresiju iRNK za  $\beta$ -aktin u istom uzorku, na osnovu formule  $2^{-dCt}$  gde je dCt razlika između Ct vrednosti iRNK specifičnog gena i kontrolne iRNK za  $\beta$ -aktin. Rezultati analize iRNK iz ćelija MLČ i slezine izolovanih iz životinja tretiranih kadmijumom izraženi su kao relativne vrednosti u odnosu na vrednosti za iRNK izolovanu iz ćelija MLČ odnosno ćelija slezine kontrolnih životinja (kojoj je dodeljena vrednost 1). Parovi prajmera korišćenih u reakciji (engl, Forward/Fw i Reverse/Rw) su prikazani u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Nukleotidne sekvence prajmera

Molekul	Sekvenca prajmera (5'/3')	
	5' - 3' (Fw)	3' - 5' (Rw)
IL-1 $\beta$	CACCTCTCAAGCAGAGCA	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
IFN- $\gamma$	AACAGTAAAGCAAAAAAGGATGCA	TGTGCTGGATCTGTGGGTTGT
IL-17	CTACCTCAACCGTTCCACTTCAC	CCTCCCAGATCACAGAAGGATATC
IL-10	GAAGACCCTCTGGATACAGCT	TGCTCCACTGCCTTGCTTTT
p40	ACGGACTTGAAGTTTAACATCAAGAG	AGAGATGCTCGTCCACATGTCA
p35	CCGGTCCAGCATGTGTCA	GCCGAAGTGAGGTGGTTTAGG
p19	GACCAGCTTCATACCTCCCTACT	TCAGGCGAGGCATCTGTTG
MT-1	GAACTGCAAATGCACCTCCTGC	CAAGACTCTGAGTTGGTCCG
MT'2	TGCAAGAAAAGCTGCTGTTCC	TTACACCATTGTGAGGACGCC
$\beta$ -aktin	CCCTGGCTCCTAGCACCAT	GAGCCACCAATCCACACAGA

### 3.8.9. Određivanje aktivnosti unutarćelijske mijeloperoksidaze (MPO)

Aktivnost mijeloperoksidaze u ćelijama slezine nakon oslobađanja prisustva eritrocita pomoću pufera za uklanjanje eritrocita (eBioscience), kao i u ćelijama MLČ je procenjena na osnovu oksidacije supstrata *o*-dianizidin dihidrohlorida od strane ćelija u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bozeman i drugi, 1990). MPO aktivnost je merena dodavanjem 33  $\mu$ l ćelijskog lizata (dobijenog ponovljenim otapanjem i zamrzavanjem uzoraka ćelija) u 966  $\mu$ l rastvora supstrata za MPO. Apsorbanca je očitavana nakon 10 minuta na talasnoj dužini od 450 nm

pomoću automatskog ELISA čitača. Aktivnost MPO u ćelijama je preračunavana pomoću standardne krive konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija MPO (Sigma-Aldrich Inc, St. Luis, MO, SAD), a rezultat je izražavan kao jedinice MPO (U)/10<sup>6</sup> ćelija.

### **3.8.10. Određivanje nivoa produkovanog azot monoksida (NO) u kondicioniranom medijumu kulture ćelija Griess-ovom reakcijom**

Krajnji produkti metabolizma azot monoksida (NO) u ćelijskim kulturama su nitrati i nitriti koji se nalaze u stabilnom međuodnosu. Određivanje produkcije NO se zasniva na merenju koncentracije nitrita (NO<sup>2-</sup>) u kondicioniranom medijumu kulture ćelija Griess-ovom reakcijom (Hibbs i drugi, 1988). Za merenje NO, izolovane ćelije MLČ su postavljene u ploče sa 96 mesta u finalnoj zapremini od 220 µl (1 x 10<sup>6</sup> ćelija/ml) a izolovane ćelije slezine su postavljene u finalnoj zapremini od 200 µl (0.3 x 10<sup>6</sup> ćelija/ml) u prisustvu medijuma (nestimulisana produkcija) ili u prisustvu LPS-a (100 ng LPS/ml kulture; stimulisana NO produkcija) i inkubirane 48 h. U 50 µl supernatanta (kondicioniranog medijuma) dodavano je 50 µl Griess-ovog reagensa koga čine sulfonilamid (SA) i N-(1-Naftiletildiamin) (NAD) u odnosu 1:1. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 min, tokom koga nitriti iz kondicioniranog medijuma u prisustvu SA formiraju prelaznu diazonijum so koja reaguje sa NAD i formira stabilno azo jedinjenje ljubičaste boje, merena je apsorbanca na automatskom ELISA čitaču, na talasnoj dužini od 570 nm, sa korekcijom nespecifične apsorpcije na 650 nm. Količina produkovanih nitrita je određivana na osnovu standardne krive konstruisane korišćenjem poznatih koncentracija natrijum-nitrita (NaNO<sub>2</sub>; MOL, Beograd, Srbija) i rezultat je izražen kao µM produkovanog NO.

### **3.8.11. Određivanje nivoa unutarćelijskog redukovano glutationa (GSH)**

Sveže izolovane ćelije MLČ i ćelije slezine (2 x 10<sup>6</sup>) su centrifugirane 5 min na 600 x g, isprane u PBS-u i resuspendovane u 10 mM HCl. Oslobođanje unutarćelijskog GSH je postignuto otapanjem i zamrzavanjem uzoraka. Nakon dve serije otapanja/zamrzavanja, uzorcima je dodato 5 % SAA, nakon čega su uzorci centrifugirani na 8000 x g, 10 min. Supernatanti su prebačeni u nove epruvete i dodat im je Tris-Cl, DTNB i voda. U talog se dodaje 1M NaOH i inkubira preko noći pa se tako pripremljen uzorak koristi za određivanje koncentracije proteina Lowry-evom metodom.

Nakon 20 min inkubacije na sobnoj temperaturi uzorak sa supernatantom se sipa u ploču sa 96 mesta i očitava se apsorbanca na automatskom ELISA čitaču na 405 nm.



Redukovani glutation poznate koncentracije je korišćen za konstrukciju standardne krive (Anderson, 1986). Nivo unuarćelijskog GSH je izražen kao  $\mu\text{M GSH}/10^6$  ćelija.

### **3.8.12. Određivanje produkcije reaktivnih vrsta kiseonika citohemijskim NBT testom**

Oksidativna aktivnost ćelija slezine (oslobođenih prisustva eritrocita) i ćelija MLČ procenjena je kvantitativnim citohemijskim testom za respiratorni prasak zasnovanog na unutarćelijskoj redukciji tetrazolijumove soli NBT do formazana (Choi i drugi, 2006). Ćelije ( $5 \times 10^5$  ćelija po bunariću) su inkubirane samo u medijumu (nestimulisana NBT redukcija) ili uz dodatak 100 ng/ml kulture PMA (PMA stimulisana NBT redukcija) u prisustvu NBT-a (500  $\mu\text{g/ml}$  kulture) tokom 30 min. Svaki uzorak je postavljan u četvoroplikatu. Ekstrakcija nastalog formazana rađena je preko noći pomoću natrijum dodecil sulfata (10% SDS / 0,01N HCl). Apsorbanca je merena pomoću ELISA čitača na talasnoj dužini od 540 nm, sa korekcijom za nespecifičnu apsorpciju na talasnoj dužini od 670 nm. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost apsorbance dobijena iz četvoroplikata pojedinačnih uzoraka.

### **3.8.13. Određivanje produkcije reaktivnih vrsta kiseonika procenom zastupljenosti dihidroksirodamin pozitivnih ćelija**

Za merenje nivoa reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u uzorcima ćelija slezine (oslobođenih prisustva eritrocita) i MLČ, rađen je test sa dihidrorodaminom 123 (DHR 123), zasnovan na oksidaciji DHR 123 (nefluorescentan molekul) do fluorescentnog rodamina 123 od strane  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Walrand i drugi, 2003). Ćelije ( $1 \times 10^6$ ) su inkubirane 1 h samo u medijumu (nestimulisana produkcija) ili u medijumu sa dodatkom PMA (100 ng PMA/ml kulture ćelija; PMA-stimulisana produkcija) i to u prisustvu 4 mM DHR 123 (Life Technologies Corp; Carlsbad, CA, SAD). Nakon inkubacije, ćelije su isprane u PBS-u, fiksirane u 1 % paraformaldehidu i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Nivo ROS u ćelijama je proporcionalan intenzitetu fluorescence rodamina. Rezultat je predstavljen procentualnom zastupljenošću  $\text{DHR}^+$  ćelija u ukupnoj populaciji ćelija slezine i MLČ.

## **3.9. Ispitivanje promena u perifernoj krvi**

Nakon anesteziranja životinja, krv je uzimana iz abdominalne arterije u sterilnim uslovima. Špricevi (Nipro, Nissho Corporation, Osaka, Japan) obloženi heparinom (Galenika a.d., Zemun, Srbija) su korišćeni za uzimanje krvi za izolaciju plazme. Plazma je izdvojena centrifugiranjem uzoraka krvi na 1500 x g, tokom 10 min. Krv iz koje se izolovao serum je



uzimana špricivima bez heparina. Uzorci krvi su inkubirani 30 min na 4 °C nakon čega je serum izdvojen centrifugiranjem na 1500 x g, 20 min. Komercijalni testovi za merenje biohemijskih i hematoloških parametara analizirani su na Siemens Healthcare Diagnostic sistemima (Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Marburg, Nemačka).

### **3.9.1. Merenje nivoa proteina akutne faze**

Koncentracija fibrinogena u plazmi je određivana pomoću komercijalno dostupnog reagensa (Multifibren U; Siemens Healthcare Diagnostics Products) na automatizovanom koagulacionom analizatoru (Siemens Healthcare Diagnostic BCS-XP)

Koncentracija haptoglobina je merena u serumu imunohemijskom metodom, komercijalnim N-antiserumom za haptoglobin pomoću Siemens BNII nefelometra (Siemens Healthcare Diagnostics Products). Koncentracija haptoglobina je određivana na osnovu standarda poznate koncentracije.

Koncentracija C- reaktivnog proteina (CRP) u serumu je određivana komercijalnim testom (Siemens) pomoću analitičkog sistema (Siemens Healthcare Diagnostics Products).

Koncentracija albumina u serumu je merena upotrebom komercijalnog testa (Siemens) koji se zasniva na formiranju kompleksa između albumina i brom krezol ljubičastog na pH 4.9. Merenje je rađeno na analitičkom sistemu Siemens Healthcare Diagnostic Dimension.

Rezultati merenja fibrinogena, haptoglobina, CRP i albumina su predstavljeni kao relativna promena vrednosti tretiranih životinja u odnosu na vrednosti zabeležene kod kontrolnih životinja (dodeljena vrednost 1) koje nisu unosile kadmijum.

### **3.9.2. Određivanje koncentracije alanin-aminotransferaza (ALT) i aspartat-aminotransferaza (AST)**

Koncentracije alanin-aminotransferaza (ALT) i aspartat aminotransferaza (AST) u serumu su određene komercijalnim biohemijskim testovima spektrofotometrijski (SIEMENS ADVIA 1800 Chemistry System) prateći preporuke proizvođača. Rezultati su predstavljeni kao U/mL.

### **3.9.3. Određivanje nivoa citokina u plazmi ELISA testom**

Nivo citokina u plazmi je meren primenom komercijalno dostupnih ELISA setova za pacovski IL-1 $\beta$  i IL-6 (R&D Systems, Mineapolis, SAD) kao i TNF (eBioscience) prema uputstvu proizvođača. Koncentracija citokina je određivana na osnovu standardne krive

konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija rekombinantnih citokina. Rezultati su izraženi u pg/ml.

#### **3.9.4. Priprema uzoraka seruma za određivanje nivoa HMGB1 Western blot metodom**

Uzorci seruma (1 µl) DA i AO pacova su razblaženi u Lemli puferu i zagrevani 5 min na 95 °C. Serumski proteini su razdvojeni elektroforezom na 15 % poliakrilamidnom gelu u puferu za gel (3 M Tris, pH 8.45, 0.3 % SDS), 16.67 % glicerolu, 0.05 % AMPS i 0.05 % TEMED. Preko polimerizovanog gela nalivao se 4 % gel za skoncentrisavanje uzorka u čijem je sastavu pufer za gel (3 M Tris, pH 8.45, 0.3 % SDS), 0.05 % AMPS i 0.1 % TEMED. Anodni pufer čini 200 mM Tris, pH 8.9, dok katodni pufer sadrži 100 mM Tris, 100 mM Tricin i 0.1 % SDS. Nakon nanošenja na gel, proteini su elektroforetski razdvajani na 0.2 kV, 45 min na 4 °C. Po završenoj elektroforezi proteini su sa gela prenošeni na membranu i rađena je imunoblot analiza kao što je opisano za uzorke tkiva duodenuma.

#### **3.9.5. Određivanje diferencijalnog sastava leukocita iz razmaza periferne krvi**

Od 20 µl periferne krvi su pravljene razmazi na predmetnoj mikroskopskoj pločici. Preparati su osušeni na vazduhu i bojene May Grunwald Giemsa rastvorom (Alkaloid, Skoplje, Makedonija). Nakon sušenja, krvni razmazi su posmatrani pod mikroskopom (100 x uveličanje) i izbrojano je i kategorizovano najmanje 300 leukocita po uzorku.

#### **3.9.6. Određivanje diferencijalnog sastava leukocita periferne krvi automatizovanom metodom**

U uzorcima pune krvi određivan je broj ukupnih leukocita kao i zastupljenost populacija neutrofila, limfocita, monocita, eozinofila i bazofila na automatskom protočnom citometru ADVIA 120 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Newark, SAD). Vrednosti su prikazane u apsolutnom ( $10^9$  ćelija/l) i relativnom (%) broju.

#### **3.9.7. Određivanje hematoloških parametara**

U uzorcima pune krvi u kojima je određivan diferencijalni sastav automatizovanom metodom, određivani su i hematološki parametri: ukupan broj eritrocita, hematokrit, hemoglobin, prosečna zapremina eritrocita (engl., Mean Corpuscular Volume/MCV), prosečna količina hemoglobina u eritrocitima (engl., Mean Corpuscular Hemoglobin/MCH), prosečna koncentracija hemoglobina na litar eritrocita (engl., Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration/MCHC), anizocitoza i hipohromija. Određivan je i ukupni broj trombocita kao

i prosečna zapremina trombocita (engl., Mean Platelet Volume/MPV). Za merenja je korišćena metoda protočne citometrije (Siemens ADVIA).

### **3.9.8. Procena oksidativnog stresa u eritrocitima**

#### **3.9.8.1. Izolacija eritrocita**

Eritrociti su izolovani iz 1 ml periferne krvi uzorkovane špricom obloženim heparinom. Uzorci su centrifugirani na 400 x g, 20 min. Izdvojena plazma je prebačena u nove epruvete a u talog je dodato po 20 µl heparina i uzorci su isprani dva puta hladnim fiziološkim rastvorom. Hemoliza je postignuta dodavanjem po 3 ml hladne dejonizovane vode u talog i inkubacijom 30 min na ledu.

#### **3.9.8.2. Određivanje koncentracije hemoglobina**

Uzorcima hemolizovane krvi (20 µl) dodavano je po 5 ml Drapkin-ovog rastvora (MOL, Beograd, Srbija) dok je za slepu probu umesto uzorka korišćena dejonizovana voda sa Drapkin-ovim rastvorom. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi, u mraku tokom 15 min, nakon čega se meri apsorbance na talasnoj dužini od 545 nm na spektrofotometru (Shimadzu UV-160, Kjoto, Japan). Koncentracija hemoglobina je dobijena na osnovu formule:  $[Hb] = A_{545} \times 36,77$  ; gde  $A_{545}$  predstavlja izmerenu apsorbancu uzorka na talasnoj dužini od 545 nm. Koncentracija hemoglobina je izražena u g/100 ml krvi.

#### **3.9.8.3. Merenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD, EC. 1.15.1.1) u eritrocitima**

Uzorcima hemolizirane krvi (500 µl) se dodaje dejonizovana voda, hladan etanol i hladan hloroform uz neprekidno mešanje. Uzorci se centrifugiraju na 3000 rpm (Eppendorf AG) 10 min na 4 °C i u dobijenom bistrom supernatantu, koji se prebacuje u nove epruvete, meri se aktivnost SOD. Određivanje aktivnosti SOD je zasnovano na epinefrinskoj metodi (Misra i Fridovich, 1972) i meri se na spektrofotometru (Shimadzu UV-160) na talasnoj dužini od 480 nm, na svakih 60 s tokom 10 min. Aktivnost SOD je preračunata prema formuli:  $[SOD] = 2 \times (\Delta K - \Delta A) \times R \times 100 / (Hb \times V \times \Delta K)$ ; gde je R - razblaženje uzorka,  $\Delta K$  - promena apsorbance adrenalina,  $\Delta A$  - promena apsorbance uzorka, Hb – koncentracija hemoglobina u uzorku (g/100 ml) i V – zapremina uzorka (ml). Rezultati su izraženi kao jedinice aktivnosti SOD (U)/g hemoglobina.

#### **3.9.8.4. Merenje aktivnosti katalaze (CAT, EC. 1.11.1.6) u eritrocitima**

Aktivnost katalaze je merena spektrofotometrijski na osnovu stope razgradnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Beutler, 1982). Uzorci hemolizirane krvi (100 µl) su inkubirani sa dejonizovanom vodom i etanolom 10 min na 37 °C. Po inkubaciji, u 25 µl uzorka se dodaje TRIS-EDTA (pH 8) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pa se meri promena apsorbance na talasnoj dužini od 240 nm, na svakih 30 s tokom 180 s.

Promena apsorbance je merena na spektrofotometru (Shimadzu UV-160). Aktivnost CAT je preračunata prema formuli:  $[CAT] = 100 \times R \times \Delta A / (Hb \times V \times 0.071)$ ; gde je R - razblaženje uzorka,  $\Delta A$  - promena apsorbance uzorka, Hb – koncentracija hemoglobina u uzorku (g/100ml) i V – zapremina uzorka (ml). Aktivnost CAT je izražena kao  $\mu\text{MH}_2\text{O}_2/\text{min/g Hb}$ .

### **3.10. Ispitivanje promena u bubrezima**

#### **3.10.1. Određivanje nivoa kreatinina i $\beta$ 2-mikroglobulina**

**Kreatinin** nastaje konverzijom kreatina i kreatin-fosfata. Ova konverzija je konstantna i oko 2 % ukupnog kreatina u telu se prevede u kreatinin tokom 24 h. U slučaju ispravnog funkcionisanja bubrega, stopa nastanka kreatinina i njegova eliminacija su u ravnoteži. Ipak, ako dođe do smanjene stope eliminacije kreatinina putem urina, njegova koncentracija u serumu se povećava. U cilju procene funkcionalnosti tubula bubrega, određivan je nivo kreatinina u serumu i urinu (24 h urin), komercijalno dostupnim testom spektrofotometrijski (Siemens ADVIA 1800 Chemistry System), merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 510 nm na svakih 30 s tokom 90 s. Rezultati su izraženi u mg/dl.

**$\beta$ 2-mikroglobulin** prolazi preko membrane ćelija bubrežnih glomerula i više od 99.9 % se reapsorbuje i degraduje u ćelijama proksimalnih tubula i samo se niske koncentracije ovog proteina mogu naći u finalnom urinu. Ako dođe do oštećenja proksimalnih tubula dolazi i do povećanja koncentracije  $\beta$ 2-mikroglobulina u urinu. Nivo  $\beta$ 2-mikroglobulina u serumu zavisi od ravnoteže između njegove sinteze i njegove filtracije putem glomerula (Karlsson i drugi, 1979). Nivo  $\beta$ 2-mikroglobulina u serumu i urinu (24 h urin) određivan je nefelometrijski, imunohistohemijskom reakcijom pomoću Siemens BNII nefelometra (Siemens BNII Nephelometric System, Siemens Healthcare Diagnostics Products).

#### **3.10.2. Određivanje biohemijskih parametara u urinu**

Određivanje prisustva leukocita, eritrocita, ukupnih proteina, ketona, urobilinogena, bilirubina i glukoze kao i procena relativne gustine i kiselosti u urinu sakupljenom tokom 24 h boravka životinja u metaboličkim kavezima, kao i uzoraka sakupljenih neposredno pred žrtvovanje, rađeno je pomoću Combur10 Test M (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemačka).

### 3.11. Statistika

Rezultati eksperimenata (iz najmanje dva a najviše četiri zasebna eksperimenta) predstavljeni su kao srednja vrednost svih merenja sa standardnom devijacijom ( $\pm$  S.D.). Statistička obrada podataka je rađena u kompjuterskom programu 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

Pokazano je da oralna izloženost Cd, tokom 30 dana nije dovela do razlika između tretiranih i kontrolnih pacova oba soja u unosu vode i hrane, ekskreciji urina i fecesa (Tabela 2).

**Tabela 2.** Pregled osnovnih metaboličkih parametara

Cd (ppm)	DA				AO			
	voda (ml)	hrana (g)	urin (ml)	feces (g)	voda (ml)	hrana (g)	urin (ml)	feces (g)
0	20.8 $\pm$ 2.0	15.3 $\pm$ 0.8	4.7 $\pm$ 0.9	8.8 $\pm$ 1.6	25.1 $\pm$ 7.1	17.3 $\pm$ 2.1	6.1 $\pm$ 1.8	9.2 $\pm$ 0.6
5	21.0 $\pm$ 5.3	15.8 $\pm$ 1.1	4.5 $\pm$ 0.1	9.8 $\pm$ 1.4	26.7 $\pm$ 9.1	17.9 $\pm$ 1.1	5.3 $\pm$ 0.9	9.2 $\pm$ 1.1
50	22.7 $\pm$ 4.1	14.3 $\pm$ 1.6	5.8 $\pm$ 1.2	8.9 $\pm$ 0.1	26.7 $\pm$ 8.3	15.9 $\pm$ 1.4	6.1 $\pm$ 1.6	9.9 $\pm$ 1.1

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9).

Razlika u telesnoj masi na početku i kraju tretmana, kod tretiranih u odnosu na kontrolne životinje, nije zapažena kod oba soja pacova. Dnevni unos Cd, preračunat na osnovu zapremine popijene vodei telesne mase, bio je istog nivoa kod tretiranih DA i AO pacova tokom 30 dana tretmana (Tabela 3).

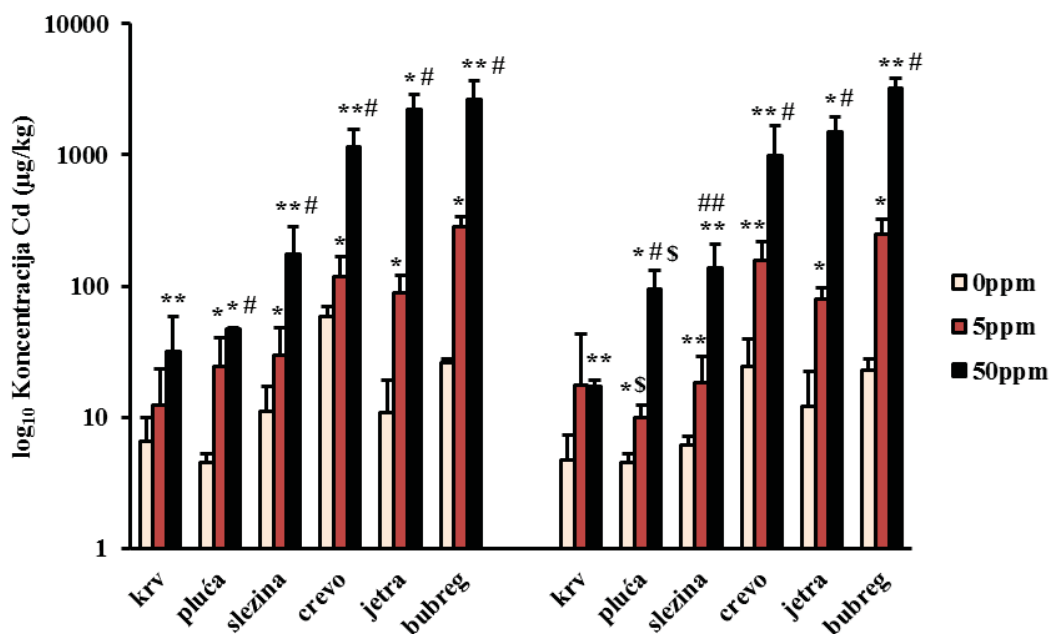
**Tabela 3. Dnevni unos kadmijuma**

Cd (ppm)	DA			AO		
	Početna masa tela (g)	Masa tela na kraju tretmana (g)	Prosečni dnevni unos Cd (mg/kg t.m.)	Početna masa tela (g)	Masa tela na kraju tretmana (g)	Prosečni dnevni unos Cd (mg/kg t.m.)
0	186.7 ± 15.3	214.2 ± 15.9	0	245.1 ± 31.1	271.0 ± 43.4	0
5	190.0 ± 10.0	223.8 ± 23.1	0.4 ± 0.1	252.5 ± 17.1	294.3 ± 38.7	0.4 ± 0.1
50	192.5 ± 14.1	220.1 ± 20.8	4.7 ± 0.6	252.5 ± 9.6	323.8 ± 51.8	4.1 ± 0.5

Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 5 - 9); t.m.- telesna masa

#### 4.1. Deponovanje kadmijuma

Oralni unos Cd je doveo do povećane koncentracije ovog metala u krvi, plućima, slezini, crevu, jetri i bubrezima tretiranih pacova (Slika 3). Najviši nivoi su izmereni u jetri i bubrezima u poređenju sa drugim ispitivanim tkivima. Visok nivo metala je deponovan i u tkivu creva, praćen nivoima u slezini a najniže vrednosti su izmerene u krvi i plućima. Koncentracije Cd u svim ispitivanim tkivima su bile slične kod DA i AO pacova, osim u slučaju pluća kod AO pacova tretiranih sa 5 ppm Cd gde su zabeleženi niži nivoi metala u odnosu na DA pacove (tretirane sa 5 ppm Cd) a koncentracije Cd u plućima AO pacova tretiranih sa 50 ppm bile su više u odnosu na DA pacove tretirane sa 50 ppm Cd. Više koncentracije Cd zabeležene su na 50 ppm u odnosu na 5 ppm u svim tkivima osim u krvi.



**Slika 3. Deponovanje kadmijuma u tkivima.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost deponovanja kadmijuma iz dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). 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 50 ppm odgovarajućeg soja;  $^{\S}P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

## 4.2. Efekat oralno unetog kadmijuma na jetru i bubrege

Kako su najviše koncentracije Cd nađene u tkivu bubrega, a visoke koncentracije Cd su izmerene i u tkivu jetre u obe primenjene koncentracije, dalje su ispitivani osnovni pokazatelji oštećenja i funkcionalnog stanja jetre i bubrega.

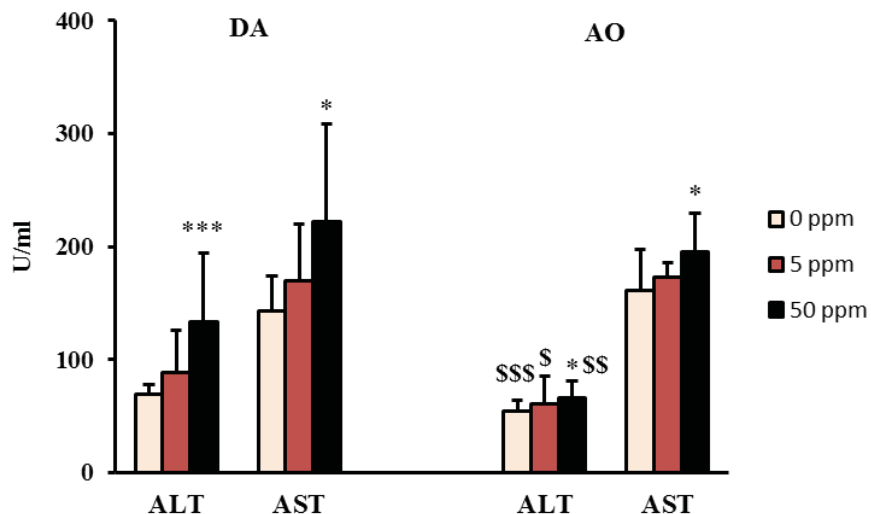
### 4.2.1. Parametri oštećenja i funkcije jetre

#### 4.2.1.1. Histopatološka analiza tkiva jetre

Iako je visoka koncentracija Cd nađena u tkivu jetre, histopatološka analiza ovog tkiva nije ukazala na morfološke promene kod tretiranih pacova oba soja u odnosu na odgovarajuće kontrole (rezultat nije prikazan).

#### 4.2.1.2. Efekat oralnog tretmana kadmijumom na koncentraciju alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST) u serumu

Koncentracija obe transaminaze je bila povećana kod pacova oba soja koji su bili tretirani višom dozom metala, u odnosu na odgovarajuće kontrole (Slika 4). Nivo ALT je bio viši kod DA pacova u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na odgovarajuće grupe AO pacova.



Slika 4. Efekat oralnog tretmana kadmijumom na koncentracije alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaza (AST) u serumu. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja;  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{\$\$}P < 0.01$ ,  $^{\$ \$ \$}P < 0.001$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.2.2. Parametri oštećenja i funkcije bubrega

##### 4.2.2.1. Histopatološka analiza tkiva bubrega

Iako je najveća koncentracija Cd nađena u tkivu bubrega u obe primenjene koncentracije, histopatološka analiza ovog tkiva nije ukazala na morfološke promene kod tretiranih pacova oba soja u odnosu na odgovarajuće kontrole (rezultat nije prikazan).

##### 4.2.2.2. Uticaj oralnog unosa kadmijuma na koncentraciju $\beta$ 2-mikroglobulina i kreatinina u serumu i urinu

Kako bi se procenila funkcija bubrega nakon tretmana Cd, merene su koncentracije  $\beta$ 2-mikroglobulina i kreatinina u serumu i urinu. Nivo  $\beta$ 2-mikroglobulina je u svim uzorcima bio ispod nivoa detekcije metode ( $< 0.22$  mg/l). Oralni tretman Cd nije uticao na koncentraciju kreatinina kod DA i AO pacova, u uzorcima seruma i urina (24 h urin) a više



koncentracije kreatinina su zabeležene u serumu kod kontrolnih DA u odnosu na kontrolne AO pacove (Tabela 4).

**Tabela 4.** Koncentracije kreatinina u serumu i urinu

Kreatinin(mg/dL)	DA			AO		
	Doza kadmijuma (ppm)			Doza kadmijuma (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
Serum	0.40 ± 0.05	0.37 ± 0.07	0.42 ± 0.08	0.27 ± 0.01 <sup>S</sup>	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.05
Urin	99.30 ± 11.50	116.40 ± 11.88	84.80 ± 26.39	87.25 ± 31.18	112.85 ± 3.75	107.00 ± 30.38

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: <sup>S</sup>P < 0.05 u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.2.2.3. Biohemijski parametri u urinu

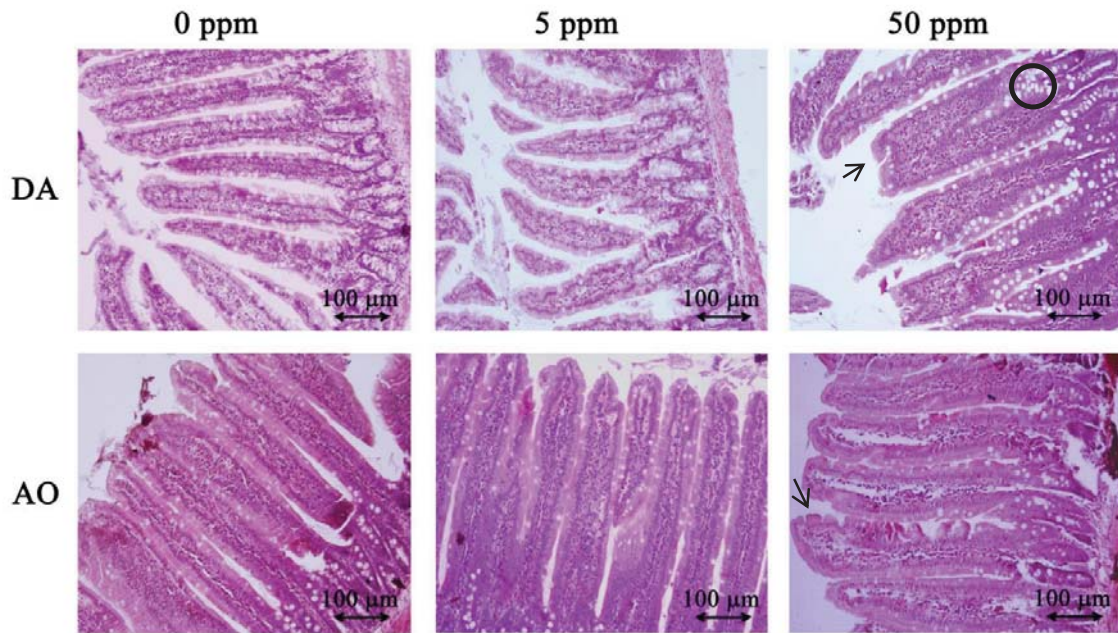
U uzorcima urina (uzorci 24 h urina i uzorci urina uzeti neposredno pred žrtvovanje životinja) nije detektovano prisustvo nitrita, eritrocita, bilirubina i glukoze. Nivo leukocita, koncentracija urobilingena i specifična gustina urina bili su u nivou kontrolnih pacova kod oba soja. Koncentracija proteina u urinu kao i pH su takođe bili sličnog nivoa kod tretiranih i kontrolnih pacova. Jedina promena je zabeležena u koncentraciji ketona. Kontrolni uzorci urina su bili negativni na prisustvo ketona i kod DA i kod AO pacova, dok je povećanje zabeleženo na nižoj ( $2.5 \pm 0.6$  g/l kod DA i  $3.2 \pm 0.5$  g/l kod AO pacova,  $P < 0.05$ ) i višoj ( $3.0 \pm 0.0$  g/l kod DA,  $P < 0.01$ ; i  $2.7 \pm 0.5$  g/l kod AO pacova,  $P < 0.05$ ) dozi Cd.

### 4.3. Efekat oralnog unosa kadmijuma na crevo

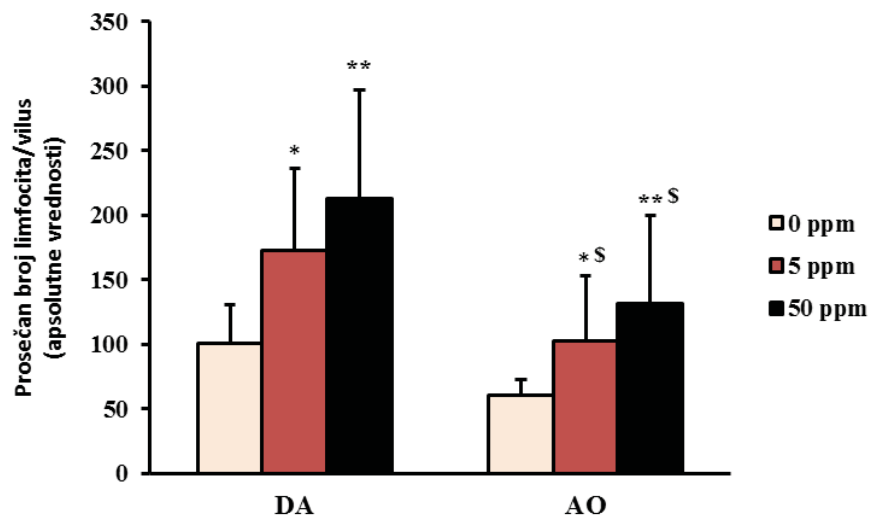
#### 4.3.1. Histopatološke promene

Jedna od posledica oralnog unosa Cd je oštećenje tkiva creva koje je uočljivo na histološkim preparatima (Slika 5). U suprotnosti sa visokim, tankim, uspravnim i pravilno raspoređenim crevnim resicama (vilusima) sa jasnim regionom lamine proprie kod kontrolnih životinja oba soja, skraćeni i zadebljali vilusi (od kojih su neki spojeni bočnim stranama) su zapaženi kod tretiranih životinja. Regioni zahvaćeni nekrozom u oblasti vrhova vilusa prisutni su na obe primenjene doze ali su masivna nekroza kao i prisustvo vakuola nalik peharastim ćelijama karakteristične za višu dozu. Histološka analiza je ukazala na prisustvo infiltrata limfocita (Slika 6) u *lamina propria*-i u odgovoru na obe primenjene doze dok je na 50 ppm zapažen mešoviti infiltrat limfocita i plazma ćelija. Oštećenje tkiva creva i intenzitet

infiltracije leukocita po unosu 5 ppm i 50 ppm Cd manje su izraženi kod AO u odnosu na DA pacove.



**Slika 5. Histologija creva.**Gore, DA x 100; (0 ppm) Kontrolni tanki vilusi; (5 ppm) Kraći i deblji vilusi nepravilnog oblika; (50 ppm) Nekroza vrhova vilusa i površinskog epitela (strelica); fuzija susednih vilusa, infiltrati leukocita u lamini proprii, grupacije vakuola nalik goblet ćelijama (krug). Dole, AO x 100; (0 ppm) Kontrolni tanki vilusi; (5 ppm) Blago prošireni vilusi; (50 ppm) Nekroza vrhova vilusa (strelica), nepravilan oblik vilusa, infiltrati leukocita u lamina propria-i.



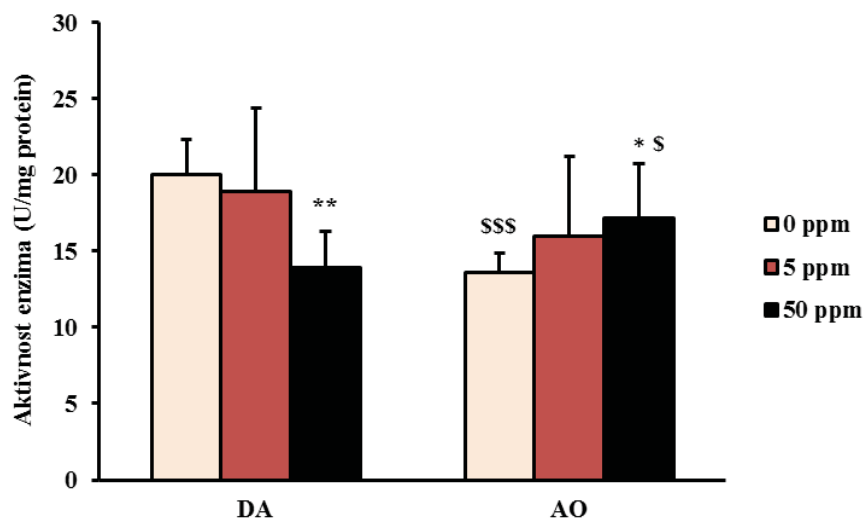
**Slika 6. Prosečan broj limfocita po vilusu.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost broja limfocita po vilusu iz dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 6 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; § $P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

### 4.3.2. Parametri oksidativnog stresa određivani u homogenatu duodenuma

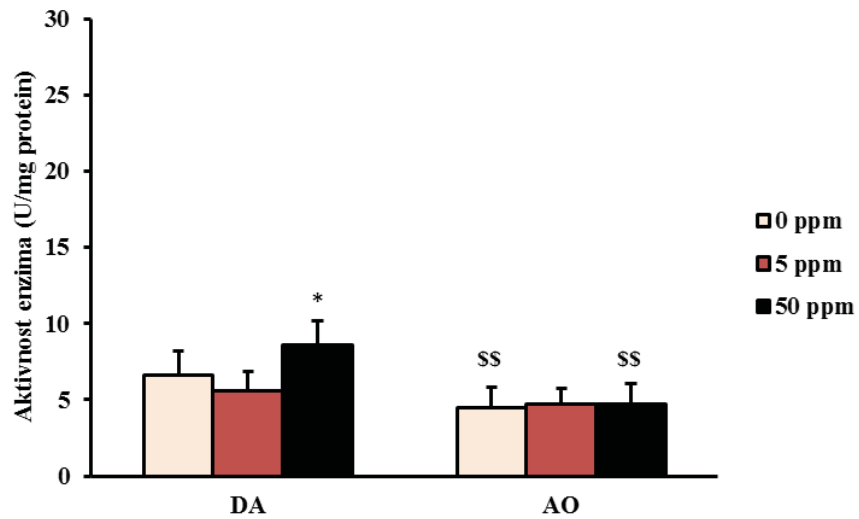
#### 4.3.2.1. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation-S-transferaze (GST)

Merenje aktivnosti osnovnih enzima antioksidativne zaštite, SOD (Slika 7A) i CAT (Slika 7B), ukazalo je na različit efekat Cd na ove enzime u tkivu creva. Kod oba soja je izostala promena u aktivnosti SOD u odgovoru na nižu dozu Cd, a efekat je bio prisutan na višoj dozi i to u vidu smanjene aktivnosti enzima kod DA i povećane aktivnosti kod AO pacova. Aktivnost CAT je povećana samo kod DA pacova nakon primene više doze Cd i izmereni nivo aktivnosti je bio viši u odnosu na AO pacove. Aktivnost GST, enzima odgovornog za vezivanje elektrofilnih supstanci (kao što je Cd) za GSH, je bila povećana kod oba ispitivana soja (Slika 7C) nakon primene više doze Cd u odnosu na kontrolne životinje, dok je povećana aktivnost na nižoj dozi, u odnosu na kontrole, zabeležena samo kod DA pacova. Ispitivanjem efekta Cd na aktivnost SOD, CAT i GST, ukazano je i na postojanje razlika između sojeva na bazalnom nivou (između kontrola) sa nižim vrednostima kod AO nego kod DA pacova.

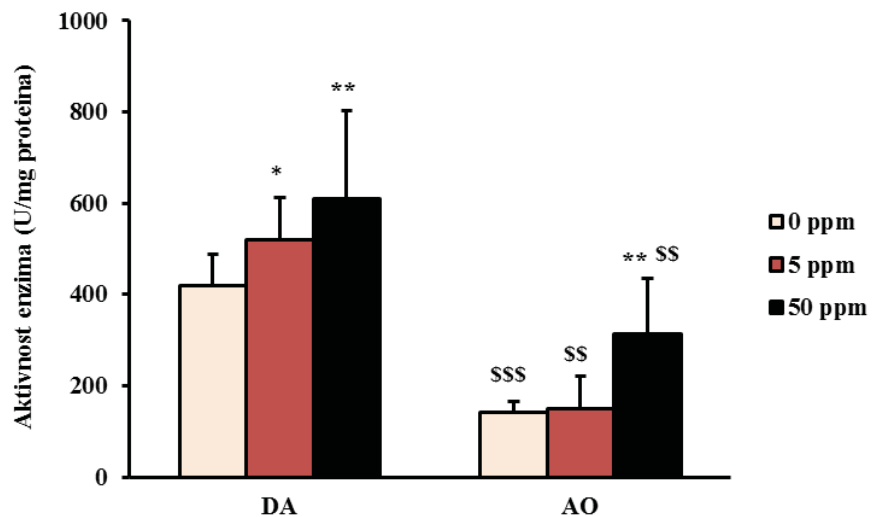
A.



B.



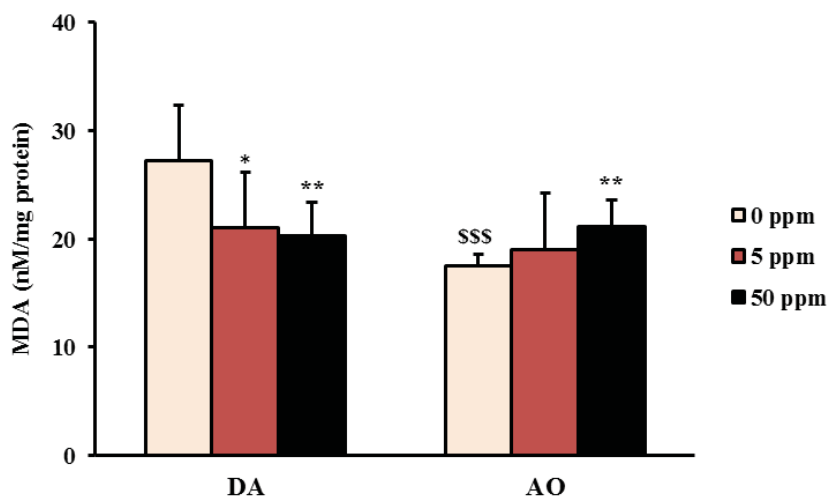
C.



Slika 7. Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) (A), katalaze (CAT) (B) i glutation-S transferaze (C) u homogenatima duodenuma. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost izmerenih aktivnosti enzima iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>S</sup> $P < 0.05$ , <sup>SS</sup> $P < 0.01$ , <sup>SSS</sup> $P < 0.001$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.3.2.2. Stepen oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana (nivo malondialdehida/MDA)

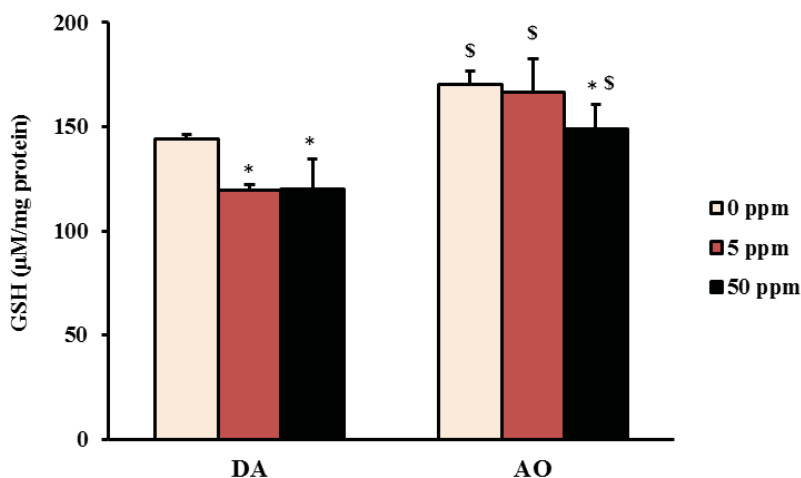
Smanjenje nivoa MDA, krajnjeg produkta oksidacije nezasićenih masnih kiselina ćelijske membrane, zapaženo je kod pacova DA soja na 5 ppm i 50 ppm Cd u odnosu na nivoe kod kontrolnih DA pacova, dok je promena kod pacova AO soja zabeležena u vidu povećanih nivoa MDA na 50 ppm u odnosu na kontrolne AO pacove. Koncentracija MDA kod kontrolnih DA je viša u odnosu na kontrolne AO pacove (0 ppm Cd) (Slika 8).



**Slika 8. Koncentracije malondialdehida (MDA) u homogenatu creva.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost izmerenih koncentracija MDA iz dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$\$\$ $P < 0.001$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.3.2.3. Redukovani glutacion (GSH)

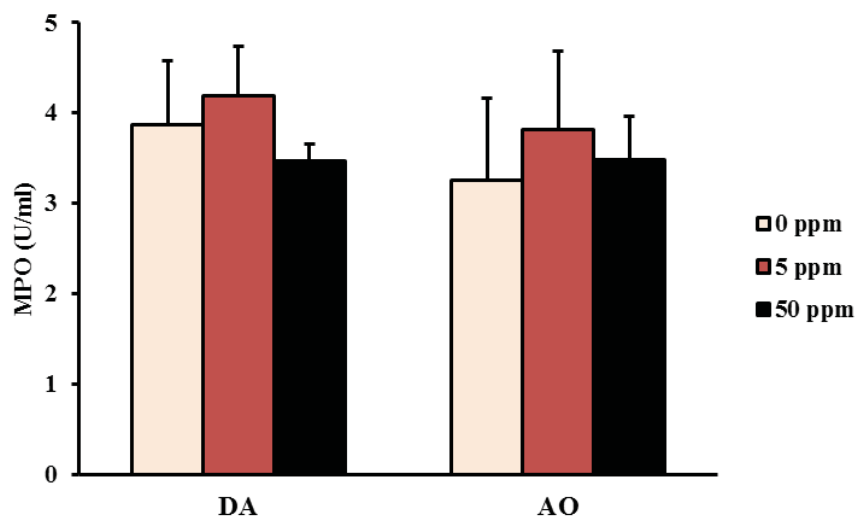
Oralni unos Cd je doveo do smanjenja koncentracije redukovanog glutationa u homogenatima creva kod oba soja pacova (izuzev niže doze kod AO pacova) (Slika 9). Ipak nivoi GSH su bili viši kod jedinki AO soja u svim eksperimentalnim grupama (0 ppm, 5 ppm, 50 ppm Cd) u odnosu na DA pacove.



**Slika 9. Koncentracije redukovanog glutationa (GSH) u homogenatu creva.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost koncentracije GSH iz dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm u okviru pojedinačnog soja; <sup>S</sup> $P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.3.2.4. Aktivnost mijeloperoksidaze (MPO) u homogenatu creva

Aktivnost MPO, enzima koji se smatra markerom neutrofilnih granulocita (Mullane i drugi, 1985), nije promenjena nakon tretmana Cd, kod oba soja pacova (Slika 10).

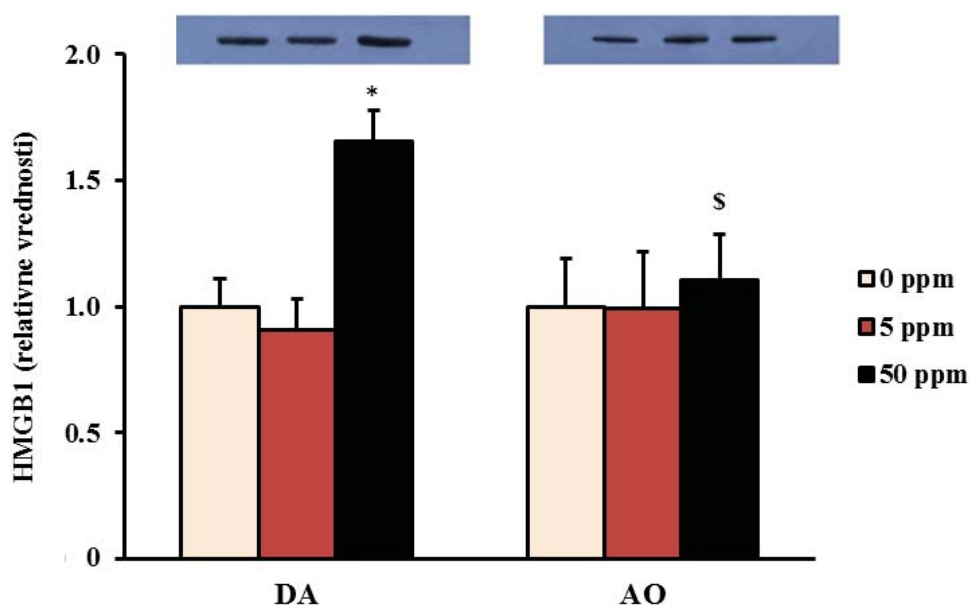


**Slika 10. Aktivnost mijeloperoksidaze (MPO) u homogenatu creva.** Rezultati su prikazani kao srednja vrednost izmerenih aktivnosti MPO iz tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9).

### 4.3.3. Medijatori imunskog odgovora u homogenatu creva

#### 4.3.3.1. Koncentracija HMGB1 molekula

Pokazatelj nekrotskih promena tkiva i ćelija, molekul HMGB1 (Slika 11), bio je prisutan u povećanim koncentracijama samo kod DA pacova nakon primene 50 ppm Cd u odnosu na netretirane DA pacove, dok kod AO pacova nije zapažena promena u koncentraciji ovog molekula. Poređenjem izmerenih nivoa HMGB1 između DA i AO pacova, zapažen je viši nivo ovog molekula kod jedinki DA soja tretiranih sa 50 ppm Cd.

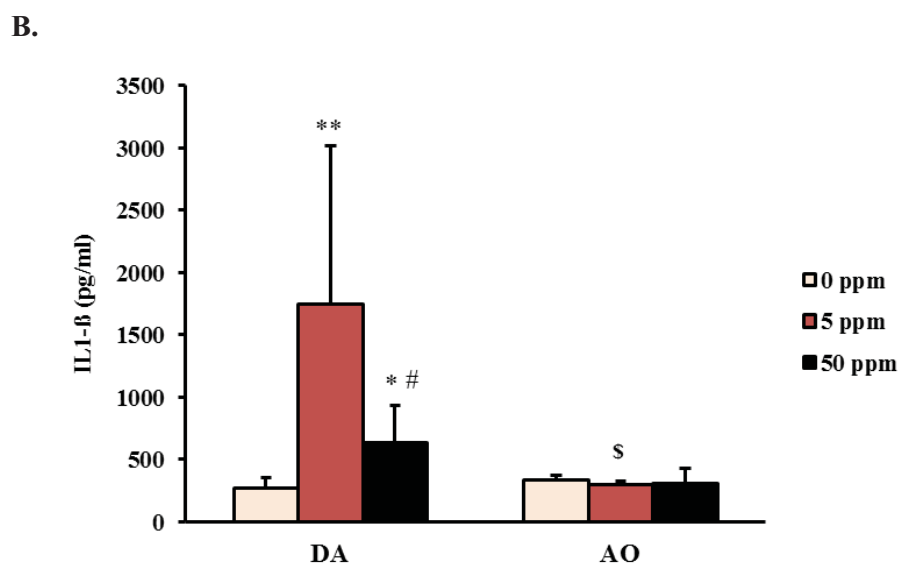
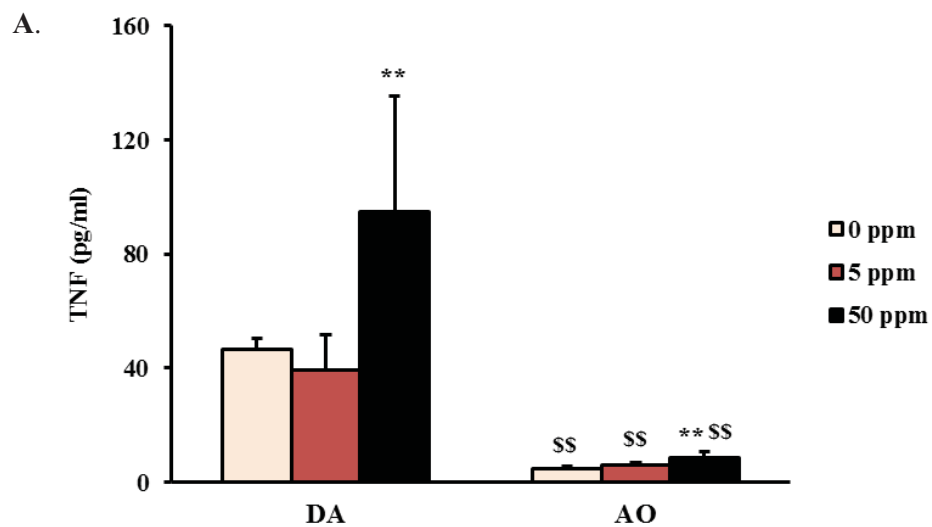


Slika 11. Koncentracija HMGB1 molekula u homogenatu creva. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost izmerenih koncentracija HMGB1 molekula iz dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>s</sup> $P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.3.3.2. Citokinski odgovor u homogenatu creva

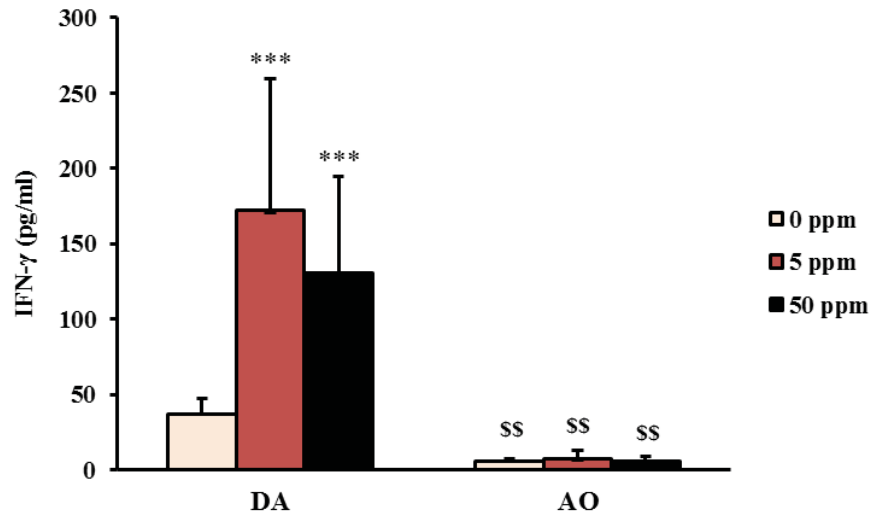
Ispitivanje citokinskog odgovora u homogenatima creva ukazalo je na diferencijalni efekat Cd na produkciju pojedinih citokina, uz postojanje sojnih razlika, kako kod tretiranih tako i kontrolnih životinja. Unos više doze Cd (50 ppm) doveo je do povećanja nivoa TNF (Slika 12A) kod oba soja pacova dok je povećanje IL-1 $\beta$  zapaženo na obe doze Cd (sa višim nivoima na 5 ppm Cd) ali samo kod DA pacova (Slika 12B). Povećan nivo proinflamatornih citokina IFN- $\gamma$  (Slika 12C) i IL-17 (Slika 12D) zapažen je samo kod DA pacova nakon primene obe doze Cd (bez razlika u odgovoru na primenjenu dozu). Nepromenjen nivo antiinflamatornog citokina IL-10 (Slika 12E) kod tretiranih DA pacova u odnosu na kontrolne životinje ovog soja i povećanje IL-10 kod AO pacova tretiranih sa 5 ppm i 50 ppm Cd,

takođe ukazuje na sojne razlike u ctkinskom odgovoru na oralni tretman Cd. Generalno, niži nivoi citokina zapaženi su kod AO u odnosu na DA soj.

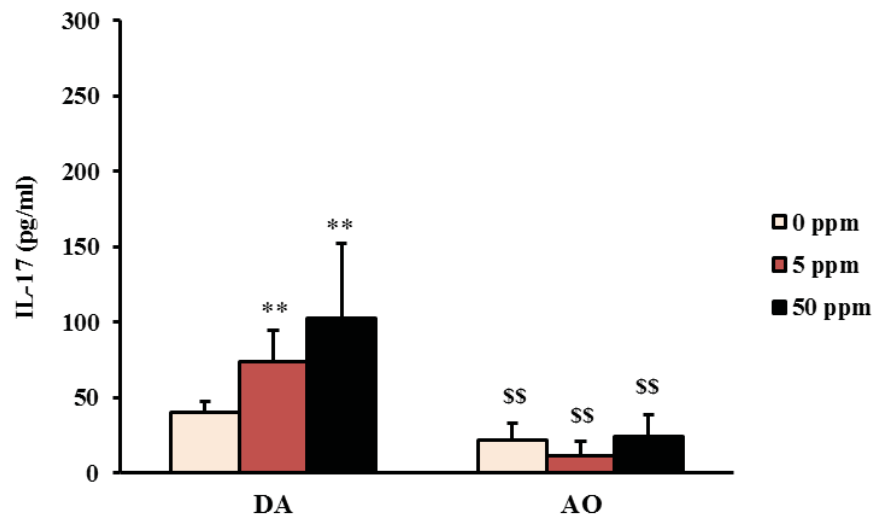




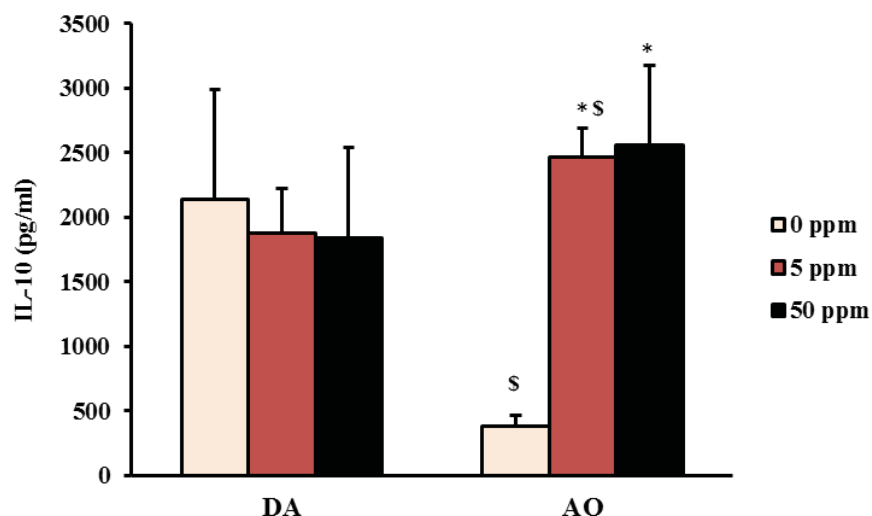
C.



D.



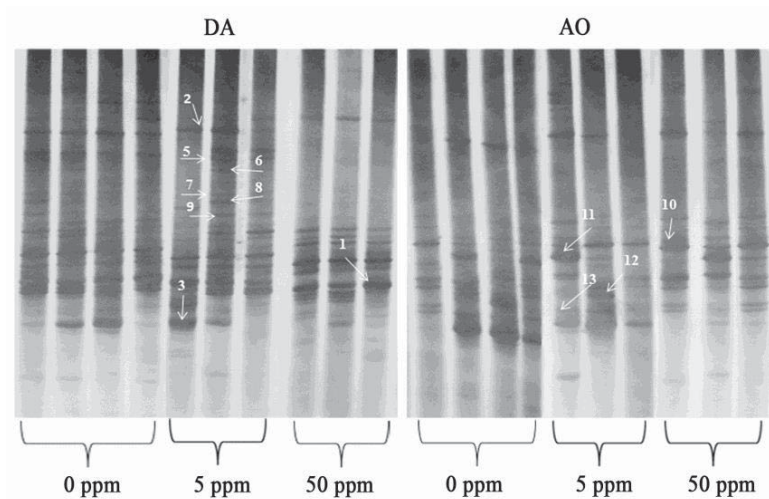
E.



Slika 12. Koncentracija relevantnih citokina u homogenatu creva: (A) TNF; (B) IL-1 $\beta$ ; (C) IFN- $\gamma$ ; (D) IL-17; (E) IL-10. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost koncentracija citokina iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; # $P < 0.05$  u odnosu na 50 ppm odgovarajućeg soja; \$ $P < 0.05$ , \$\$ $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.3.4. Kadmijum i mikrobiom creva - analiza efekata na soj *Lactobacillus*

Analiza raznovrsnosti vrsta koje pripadaju rodu *Lactobacillus* [(član komensalne mikrobiote sa ulogom u regulaciji imunske homeostaze creva (van Baarlen i drugi, 2013)] pokazala je da unos Cd dovodi do disbioze (kada je u pitanju rod *Lactobacillus*) kod oba soja pacova (Slika 13). Analiza sekvenci 12 različitih traka (fragmenata) DNK (Tabela 5) koje odgovaraju različitim vrstama laktobacila i koje se razlikuju između DA i AO pacova nakon tretmana Cd, ukazuje na sojne razlike u zastupljenosti i raznovrsnosti laktobacila nakon primene 50 ppm Cd. U suprotnosti sa naglašenim smanjenjem raznovrsnosti i zastupljenosti pojedinih DNK fragmenata kod DA pacova, kod AO pacova je pored načelnog očuvanja diverziteta došlo i do povećanja zastupljenosti vrsta *L. johnsonii* (odgovara fragmentu DNK pod rednim brojem 10) i *L. murinus* (odgovara fragmentu DNK pod rednim brojem 11).



**Slika 13. Uticaj oralnog unosa kadmijuma na raznovrsnost i zastupljenost vrsta komensalnog roda *Lactobacillus*.** Prikazan je reprezentativni rezultat jednog eksperimenta. Obeležene trake su dalje korišćene za sekvencijalnu analizu.

**Tabela 5. Analiza DNK sekvenci roda *Lactobacillus***

Soj (poreklo uzorka)	Redni broj klona	Vrsta	NSI (%)
AO i DA	1	<i>Lactobacillus intestinalis</i> soj JCM 7548	100%
	2	<i>Lactobacillus johnsonii</i> soj NCC 533	99.49%
	3	<i>Lactobacillus faecis</i> soj AFL13-2	99.49%
	7	<i>Lactobacillus reuteri</i> soj DSM 20016	98.71%
	8	<i>Lactobacillus reuteri</i> soj DSM 20016	98.97%
	9	<i>Lactobacillus johnsonii</i> soj NCC 533	99.49%
	10	<i>Lactobacillus johnsonii</i> soj NCC 533	99.74%
	11	<i>Lactobacillus murinus</i> soj NBRC 14221	99.49%
	12	<i>Lactobacillus faecis</i> soj AFL13-2	99.49%
	13	<i>Lactobacillus reuteri</i> soj DSM 20016	99.23%
DA	5	<i>Lactobacillus gasseri</i> soj ATCC 33323	98.97%
	6	<i>Lactobacillus reuteri</i> soj NBRC 15892	99.23%

#### **4.4. Efekat kadmijuma na mezenterične limfne čvorove (MLČ)**

##### **4.4.1. Pregled opštih parametara MLČ (masa, celularnost, osnovne subpopulacije T limfocita, vijabilnost i proliferativni odgovor ćelija)**

Nakon ispitivanja efekata Cd u tkivu duodenuma, dalje su ispitivani efekti ovog metala u mezenteričnim limfnim čvorovima (MLČ) koji osim duodenuma dreniraju i region jejunuma, ileuma i gornjih delova debelog creva pacova (Tilney, 1971). Iako pankreatični limfni čvorovi dobijaju limfu primarno iz regiona duodenuma (Richter i drugi, 1991) prinos ćelija koje se mogu izolovati iz ovih limfnih čvorova bio bi nedovoljan za funkcionalnu analizu. Dodatno, ukazivanjem veze na karcinom duodenuma sa metastazom u MLČ (Lee i drugi, 2002; Maruyama i drugi, 2012) opravdana je upotreba MLČ u proceni intestinalne imunotoksičnosti Cd.

Oralni unos Cd je doveo do povećane koncentracije ovog metala u MLČ kod DA ( $26.1 \pm 8.7$  i  $203.3 \pm 86.5$  na 5 ppm i 50 ppm Cd u odnosu na  $8.2 \pm 3.5$  na 0 ppm Cd,  $P < 0.05$ ) i AO ( $27.3 \pm 10.8$  i  $217.2 \pm 95.8$  na 5 ppm i 50 ppm Cd u odnosu na  $10.0 \pm 4.1$  na 0 ppm Cd,  $P < 0.05$ ) pacova. Nivo deponovanog metala je bio viši na 50 ppm u odnosu na 5 ppm Cd kod oba soja pacova, a deponovanje Cd je bilo sličnog nivoa kod tretiranih DA i AO pacova.

Oralni tretman Cd je doveo do povećanja relativne mase MLČ (Tabela 6) kod tretiranih jedinki DA i AO pacova u odnosu na kontrolne pacove, a povećanje je bilo dozno zavisno samo kod DA pacova. Veće bazalne vrednosti relativne mase MLČ kod AO pacova su doprinele višim vrednostima ovog parametra i kod tretiranih AO u poređenju sa tretiranim DA pacovima. Ipak, relativna promena mase MLČ je izraženija kod tretiranih DA u odnosu na kontrolne DA pacove (i do tri puta viši nivoi kod tretiranih u odnosu na kontrolne životinje ovog soja). Zabeleženo je povećanje broja ćelija MLČ nakon primene obe doze Cd kod oba ispitivana soja pacova. Iako je broj ćelija MLČ bio viši kod kontrolnih AO u odnosu na kontrolne DA životinje, nije bilo sojnih razlika u broju ćelija nakon tretmana metalom. Ispitivanje procentualne zastupljenosti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija, glavnih subpopulacija T ćelija, u MLČ pokazalo je da unos Cd nije imao efekta na relativni broj CD4<sup>+</sup> ćelija u MLČ kod oba ispitivana soja pacova, dok je relativni broj CD8<sup>+</sup> ćelija bio povećan na obe doze Cd kod AO, a samo na višoj dozi kod DA pacova. Odnos relativnih vrednosti CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> (CD4/CD8) ćelija bio je smanjen kod oba soja na 50 ppm u odnosu na 0 ppm Cd, i to smanjenje je kod AO pacova bilo statistički značajno dok je kod DA pacova zabeleženo samo numeričko

smanjenje ( $P = 0.08$ ). Tretman Cd nije doveo do promene u vijabilnosti ćelija MLČ. Proliferativni odgovor (nestimulisana proliferacija) ćelija MLČ na tretman Cd bio je povećan kod tretiranih u odnosu na kontrolne DA pacove dok je promena kod AO pacova izostala. Merenje nestimulisane proliferacije ukazalo je na više vrednosti kod kontrolnih AO u odnosu na kontrolne DA pacove. Proliferativni odgovor ćelija MLČ stimulisanih mitogenom T ćelija, konkanavalinom A (ConA), bio je povećan kod tretiranih u odnosu na kontrolne DA pacove i višeg nivoa u odnosu na nestimulisanu proliferaciju. Nivo ConA stimulisanih odgovora ćelija MLČ tretiranih DA pacova je bio viši od ConA stimulisanih proliferativnog odgovora ćelija MLČ tretiranih AO pacova. Nivo proliferativnog odgovora ćelija MLČ AO pacova nakon stimulacije sa ConA bio je viši u poređenju sa nestimulisanim odgovorom, ali je kao i u slučaju nestimulisane proliferacije, promena između tretiranih i kontrolnih AO pacova izostala.

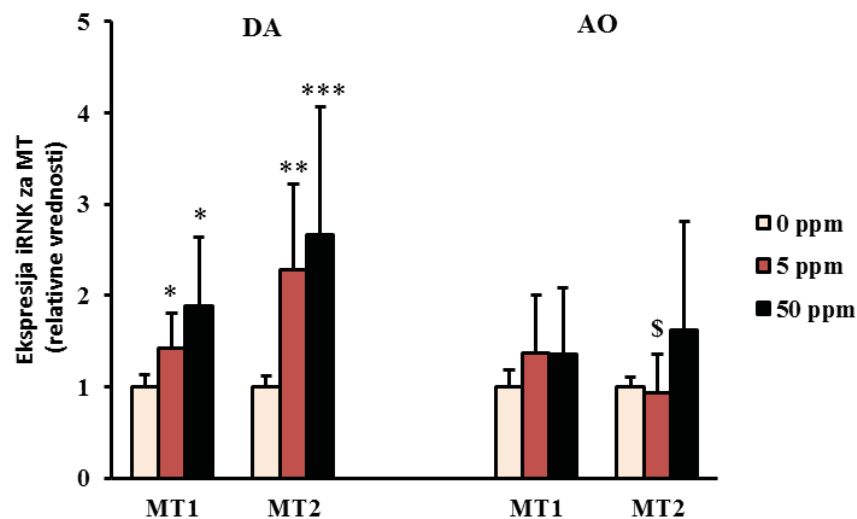
**Tabela 6.** Efekat kadmijuma na relativnu masu mezenteričnih limfnih čvorova (MLČ), celularnost, osnovne subpopulacije T limfocita, vijabilnost i proliferativni odgovor ćelija MLČ

Parametar	DA			AO		
	Doza kadmijuma (ppm)			Doza kadmijuma (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
Relativna masa (%)	0.04 ± 0.02	0.08 ± 0.01**	0.11 ± 0.01***	0.09 ± 0.01 <sup>SS</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>S</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>S</sup>
Broj ćelija (×10 <sup>6</sup> )	36.3 ± 6.8	44.2 ± 8.1**	44.9 ± 15.3*	42.5 ± 7.4 <sup>SS</sup>	50.6 ± 9.3*	56.9 ± 21.2*
CD4 (%)	55.8 ± 3.2	55.0 ± 4.6	53.7 ± 7.4	43.5 ± 5.6 <sup>S</sup>	39.8 ± 4.3 <sup>S</sup>	42.2 ± 4.5 <sup>S</sup>
CD8 (%)	21.5 ± 1.4	22.4 ± 2.4	23.2 ± 1.9*	19.3 ± 2.6 <sup>S</sup>	20.8 ± 5.3 <sup>SS</sup>	21.6 ± 2.5**
CD4/CD8	2.6 ± 0.2	2.5 ± 0.3	2.3 ± 0.4	2.3 ± 0.3 <sup>S</sup>	2.0 ± 0.5 <sup>S</sup>	2.0 ± 0.1*
<b>Vijabilnost(%)</b>						
Žive	94.0 ± 0.8	94.1 ± 1.0	93.9 ± 0.6	93.2 ± 1.8	92.6 ± 1.2	94.0 ± 0.6
Apoptotične	5.0 ± 0.7	4.9 ± 0.8	4.9 ± 0.4	5.4 ± 1.4	5.5 ± 1.6	5.2 ± 0.4
<b>Proliferativni odgovor (b.o.m × 10<sup>3</sup>)</b>						
Bez stimulacije	0.33 ± 0.16	0.54 ± 0.12*	0.51 ± 0.14*	0.53 ± 0.13 <sup>S</sup>	0.43 ± 0.14	0.54 ± 0.19
Stimulisan sa						
ConA	37.0 ± 4.8	49.4 ± 17.4*	50.6 ± 16.4**	39.6 ± 7.8	32.2 ± 10.9 <sup>S</sup>	35.0 ± 8.1 <sup>SS</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; # $P < 0.05$  u odnosu na 50 ppm odgovarajućeg soja; <sup>S</sup> $P < 0.05$ , <sup>SS</sup> $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.4.2. Efekat oralnog unosa kadmijuma na ekspresiju gena za metalotioneine 1 i 2 (MT1 i MT2) od strane ćelija MLČ

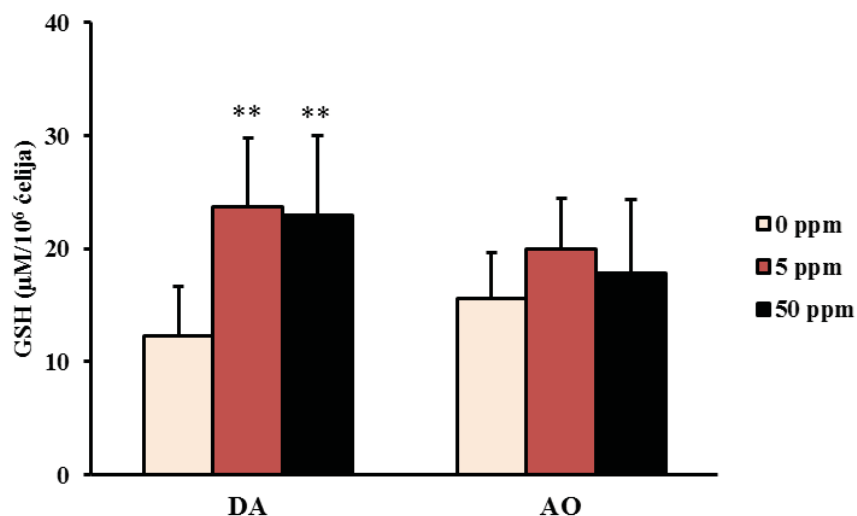
Metalotioneini imaju funkciju u zaštiti ćelija i tkiva od štetnih efekata teških metala a poznato je i da Cd indukuje ekspresiju gena za MT1 i MT2 (Haq i drugi, 2003). Pošto se Cd deponuje u MLČ, dalje je ispitivan efekat Cd na ekspresiju gena za MT i pokazano je da je oralni unos Cd doveo do povećane ekspresije iRNK gena za MT1 i MT2 u ćelijama MLČ DA pacova nakon primene obe doze Cd, u odnosu na kontrolne DA životinje. Relativne vrednosti iRNK za MT2 su bile više kod DA u odnosu na AO pacove (statistički značajno na nižoj dozi i tendencija povećanja na višoj dozi,  $P = 0.06$ ) kod kojih su relativne vrednosti iRNK za obe ispitivane forme MT nepromenjene kod tretiranih u odnosu na kontrolne životinje (Slika 14).



Slika 14. Ekspresija gena za metalotioneine-MT1 i MT2 u ćelijama MLČ. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ekspresije iRNK gena za MT1 i MT2 iz dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$ $P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.4.3. Efekat oralnog unosa kadmijuma na nivo unutarćelijskog redukovanog glutaciona (GSH) u ćelijama MLČ

Ispitivanjem efekta oralnog tretmana Cd na glutation (GSH), pokazan je povećani nivo unutarćelijskog GSH samo kod DA pacova, dok promene nisu zapažene kod AO pacova (Slika 15).



Slika 15. Efekat oralnog unosa kadmijuma na koncentraciju unutarćelijskog redukovanog glutationa (GSH) u MLČ. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost koncentracija GSH iz dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike:  $**P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.4.4. Efekat kadmijuma na urođeni imunski odgovor u MLČ

##### 4.4.4.1. Fenotipska karakterizacija ćelija urođene imunosti u MLČ

Analizom fenotipa ćelijskih populacija urođene imunosti u MLČ ukazano je na povećanu procentualnu zastupljenost CD68<sup>+</sup> (jedan od markera M1 makrofaga) i NKG2D<sup>+</sup> (marker NK ćelija) ćelija kod tretiranih DA pacova dok su kod AO pacova ove promene izostale (Tabela 7). Relativni broj NK ćelija kontrolnih i tretiranih AO pacova bio je viši u odnosu na kontrolne i tretirane DA pacove, redom. Relativni broj drugih ćelija urođene imunosti (granulociti, M2 makrofagi) ostao je nepromenjen kod oba soja pacova. Kako bi se ispitalo uticaj Cd na priliv ćelija urođene imunosti u MLČ, analizirana je procentualna zastupljenost ćelija koje na svojoj površini iskazuju CD11b molekul. Pokazano je da oralni tretman pacova Cd u trajanju od 30 dana, nije doveo do promena u zastupljenosti CD11b<sup>+</sup> ćelija u ukupnoj populaciji analiziranih ćelija MLČ, kod oba soja pacova.

**Tabela 7.** Zastupljenost populacija ćelija urođene imunosti u mezenteričnim limfnim čvorovima

Ćelije (%)	DA			AO		
	Doza kadmijuma (ppm)			Doza kadmijuma (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
HIS48	1.8 ± 0.4	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.5	1.9 ± 0.7	2.0 ± 0.4
NKG2D	2.2 ± 0.1	2.8 ± 0.2 <sup>***</sup>	3.0 ± 0.6 <sup>***</sup>	4.0 ± 0.8 <sup>sss</sup>	4.1 ± 0.8 <sup>sss</sup>	3.9 ± 0.8 <sup>ss</sup>
CD68	5.2 ± 0.3	7.2 ± 1.3 <sup>*</sup>	7.9 ± 1.2 <sup>*</sup>	7.6 ± 1.3 <sup>§</sup>	7.1 ± 0.5	6.9 ± 1.7
CD163	1.5 ± 0.9	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.6	0.6 ± 0.5 <sup>§</sup>
CD11b	8.8 ± 0.7	8.1 ± 1.6	8.9 ± 0.8	7.7 ± 1.5	7.0 ± 1.0	6.7 ± 0.9

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja zastupljenosti pojedinih populacija ćelija iz najmanje dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: <sup>\*</sup>P < 0.05, <sup>\*\*\*</sup>P < 0.001 u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>§</sup>P < 0.05, <sup>ss</sup>P < 0.01, <sup>sss</sup>P < 0.001 u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.4.4.2. Efekat kadmijuma na oksidativne aktivnosti ćelija MLČ

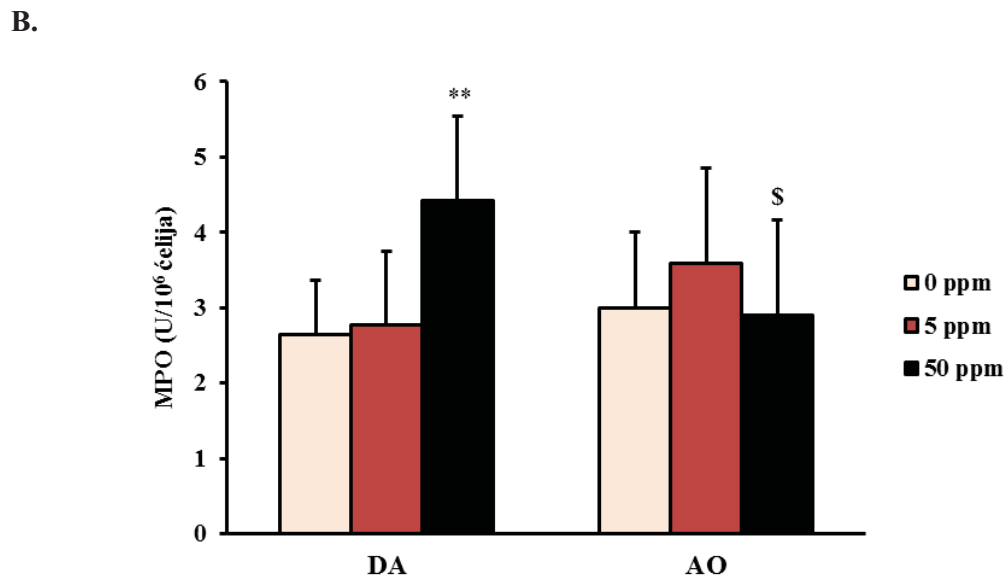
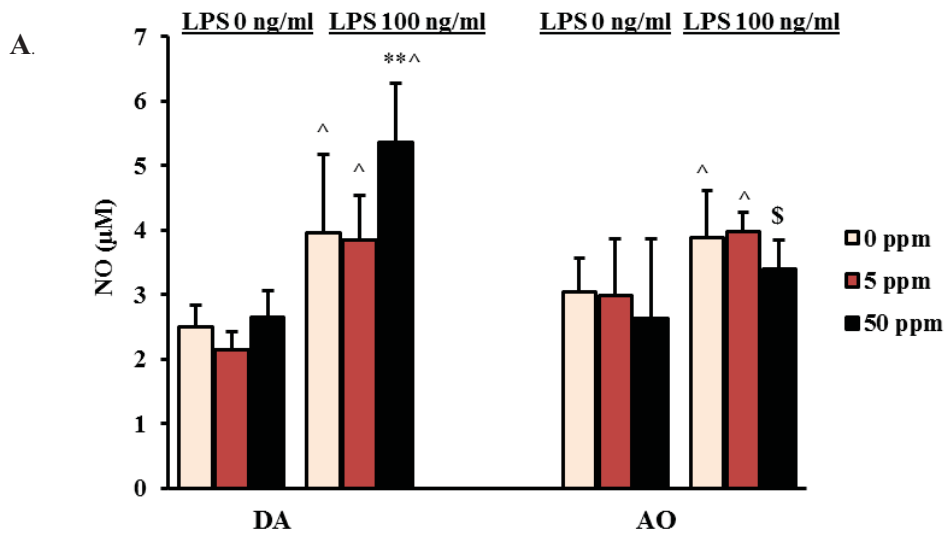
Oralni tretman pacova Cd je uticao na pojedine oksidativne funkcije ćelija MLČ kao što su produkcija NO, aktivnost unutarćelijske MPO, NBT redukcija i DHR oksidacija. Nivo produkovanog NO (Slika 16A), meren u kondicioniranom medijumu ćelija MLČ, bio je povećan samo kod DA pacova tretiranih sa 50 ppm Cd i to nakon stimulacije, dodavanjem LPS-a u medijum za kultivaciju ćelija. Tretman Cd nije uticao na nestimulisanu produkciju NO od strane ćelija MLČ AO pacova, dok je nakon stimulacije LPS-om zabeleženo samo numeričko smanjenje ( $P = 0.08$ ) produkcije kod AO pacova tretiranih sa 50 ppm Cd u odnosu na netretirane AO pacove. Kod oba soja pacova izmereni su viši nivoi produkovanog NO nakon LPS stimulacije, osim kod AO pacova tretiranih višom dozom Cd.

Aktivnost MPO u ćelijama MLČ (Slika 16B) bila je povećana samo kod DA pacova tretiranih višom dozom Cd i izmereni nivoi su bili viši u odnosu na nivo aktivnosti kod AO pacova tretiranih višom dozom Cd.

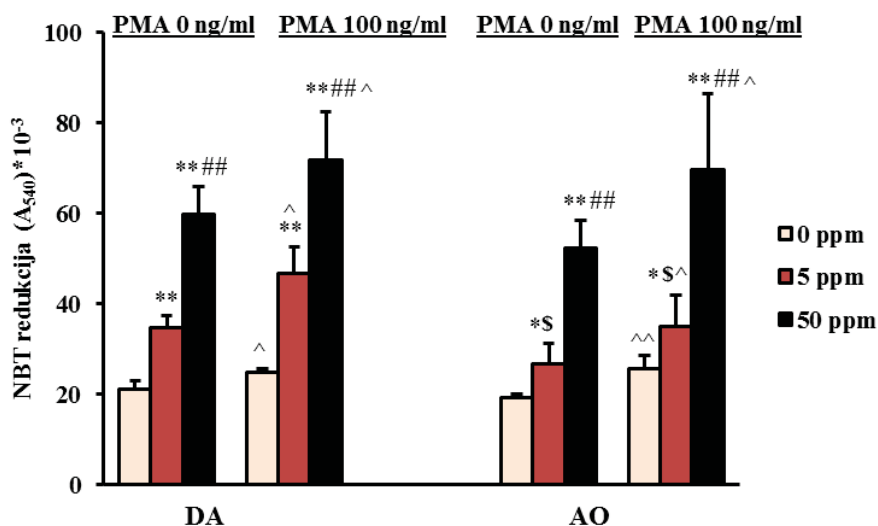
Dozno zavisno povećanje redukcije NBT-a do formazana (Slika 16C) kod oba soja pacova (u slučaju spontane i PMA stimulisane aktivnosti) ukazalo je da tretman Cd utiče na povećanu produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (ROS). PMA stimulisana NBT redukcija je bila višeg nivoa u odnosu na nestimulisanu redukciju kod kontrolnih i tretiranih pacova oba soja. Sojne razlike su zabeležene kod pacova tretiranih nižom dozom Cd (u slučaju nestimulisane i PMA stimulisane redukcije) u vidu viših nivoa kod DA u odnosu na AO pacove.



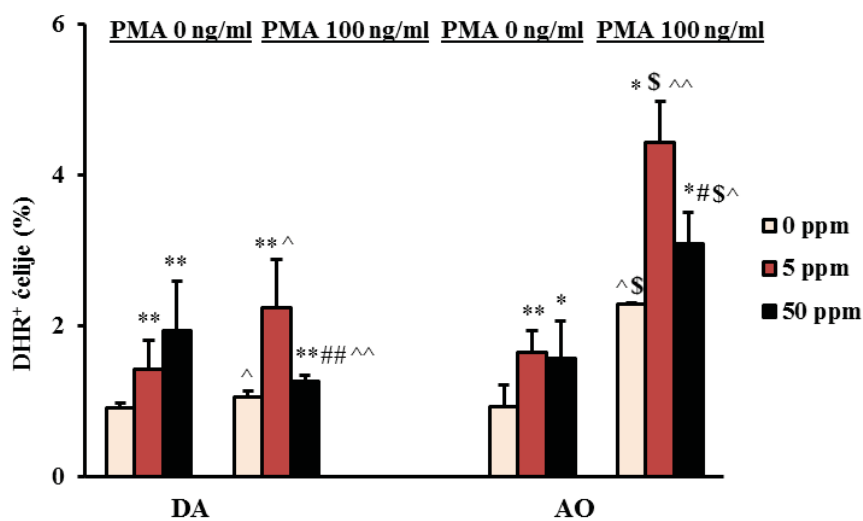
Povećana produkcija ROS kao posledica tretmana Cd, osim NBT testom, potvrđena je i analizom DHR<sup>+</sup> ćelija u MLC (Slika 16D). Relativni broj DHR<sup>+</sup> ćelija u MLC bio je povećan kod tretiranih pacova oba soja, na obe primenjene doze u odnosu na odgovarajuće kontrole, i to u slučaju nestimulisane i PMA stimulisane DHR oksidacije. PMA stimulisana DHR oksidacija je bila višeg nivoa u odnosu na nestimulisanu, kod oba soja pacova, osim kod DA pacova tretiranih sa 50 ppm Cd (niži relativni broj DHR<sup>+</sup> ćelija u slučaju PMA stimulisane oksidacije u odnosu na nestimulisanu). Odgovor na stimulaciju PMA je bio intenzivniji kod AO u odnosu na DA pacove.



C.



D.



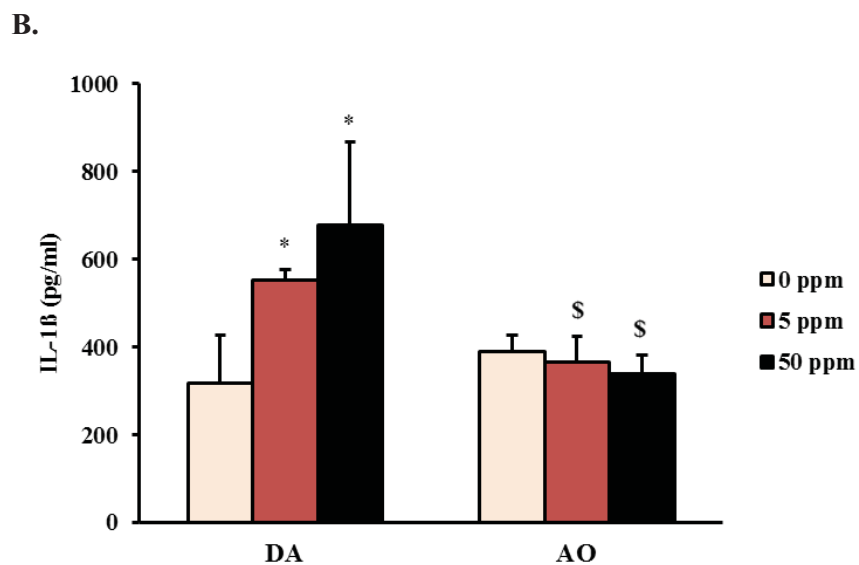
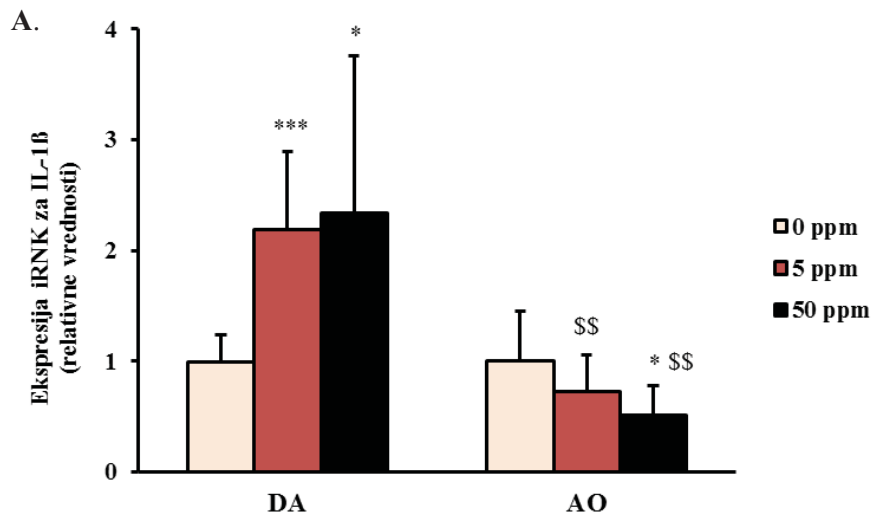
Slika 16. Uticaj kadmijuma na oksidativne aktivnosti ćelija MLČ: (A) Produkcija NO; (B) Aktivnost unutarćelijske MPO; (C) Redukcija NBT; (D) Oksidacija DHR. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  u odnosu na 50 ppm odgovarajućeg soja;  $S P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja; ^ $P < 0.05$ , ^^ $P < 0.01$  u odnosu na nestimulisana aktivnost.

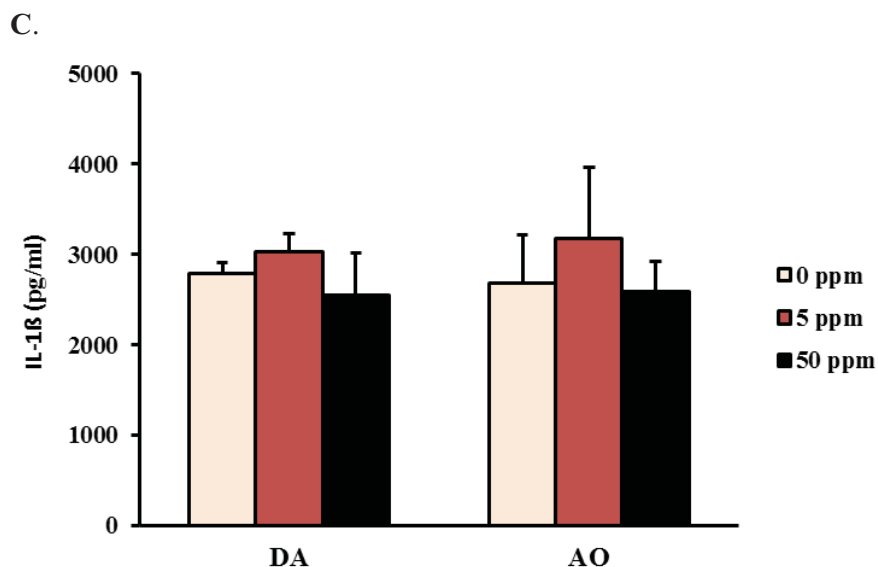
#### 4.4.5. Efekat kadmijuma na citokinski odgovor ćelija MLČ

##### 4.4.5.1. Ekspresija gena i produkcija IL-1 $\beta$

Ekspresija gena za IL-1 $\beta$  (Slika 17A) bila je povećana kod DA pacova tretiranih nižom i višom dozom Cd, dok je tretman višom dozom Cd doveo do smanjene koncentracije iRNK za ovaj citokin kod AO pacova. Nivoi genske ekspresije su bili viši kod tretiranih DA u odnosu na tretirane AO pacove. U saglasnosti sa ekspresijom gena za IL-1 $\beta$ , nestimulisana

produkcija ovog citokina (Slika 17B) u kondicioniranom medijumu ćelija MLČ bila je povećana kod DA pacova na obe doze Cd a numerički pad produkcije je zabeležen kod AO pacova tretiranih višom dozom Cd ( $P = 0.08$ ). Stimulacija ćelija sa ConA dovela je do povećanog nivoa produkcije IL-1 $\beta$  u odnosu na nestimulisanu produkciju, kod oba soja pacova, bez razlika u nivou produkovanog citokina između kontrolnih i tretiranih pacova unutar pojedinačnog soja, a razlike nije bilo ni poređenjem produkovanih nivoa između sojeva (Slika 17C).



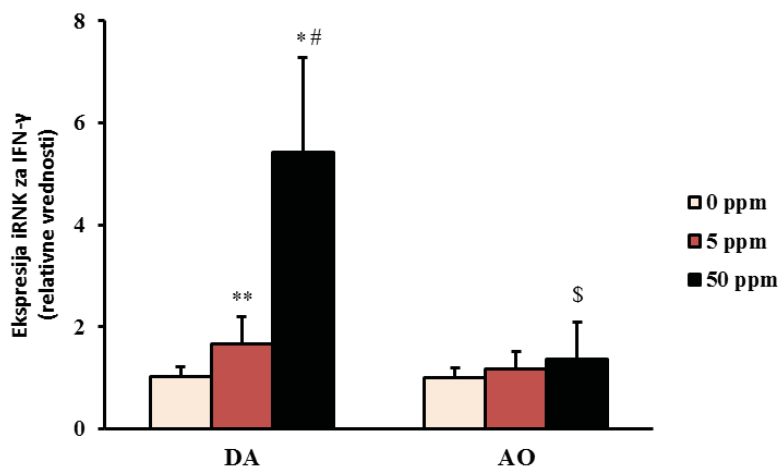


**Slika 17. Ekspresija gena za IL-1 $\beta$  i produkcija ovog citokina u MLČ:** (A) Ekspresija iRNK gena za IL-1 $\beta$ ; (B) Produkcija IL-1 $\beta$  bez stimulacije; (C) Produkcija stimulisana sa ConA. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>s</sup> $P < 0.05$ , <sup>ss</sup> $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

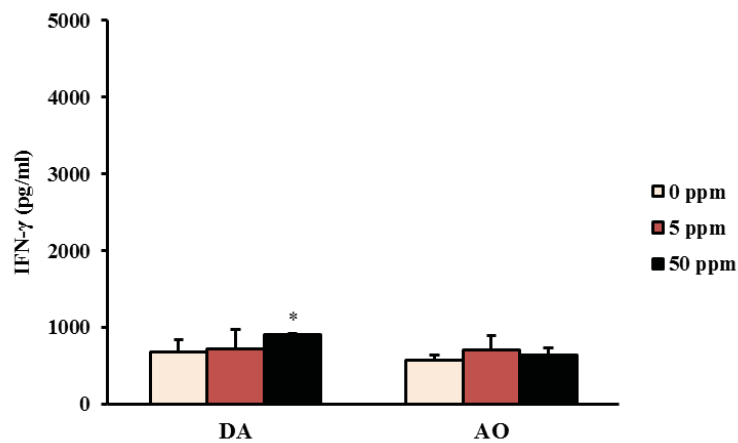
#### 4.4.5.2. Efekat kadmijuma na ekspresiju gena i produkciju citokina IFN- $\gamma$ i IL-17

Oralni unos Cd stimulisao je inflamatorni odgovor ćelija MLČ samo kod DA pacova i to u vidu povećane ekspresije gena za IFN- $\gamma$  (Slika 18A). Povećanje je bilo dozno zavisno i nivoi ekspresije gena su bili viši kod DA pacova tretiranih sa 50 ppm Cd u odnosu na AO pacove tretirane istom dozom metala. Nestimulisana (Slika 18B) kao i ConA stimulisana (Slika 18C) produkcija IFN- $\gamma$  u kondicioniranom medijumu ćelija MLČ bila je povećana samo kod DA pacova tretiranih višom dozom Cd. Nivoi produkovanog citokina bili su viši u slučaju produkcije ćelija stimulisanih sa ConA u poređenju sa nestimulisanom produkcijom kod oba soja pacova. Dodatno, zabeleženi su viši nivoi ConA stimulisanе produkcije kod kontrolnih AO u poređenju sa kontrolnim DA pacovima.

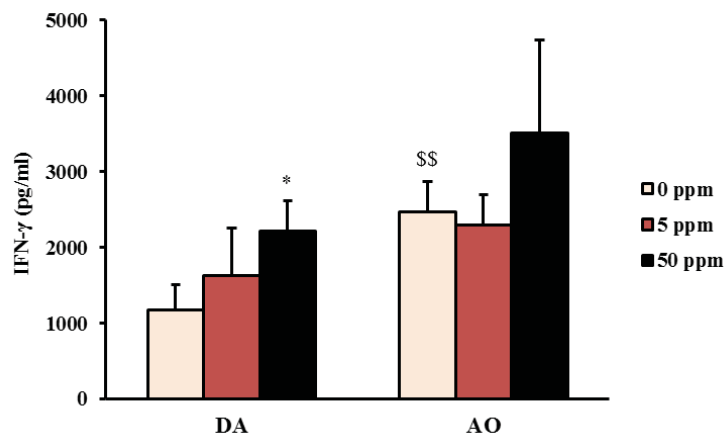
A.



B.

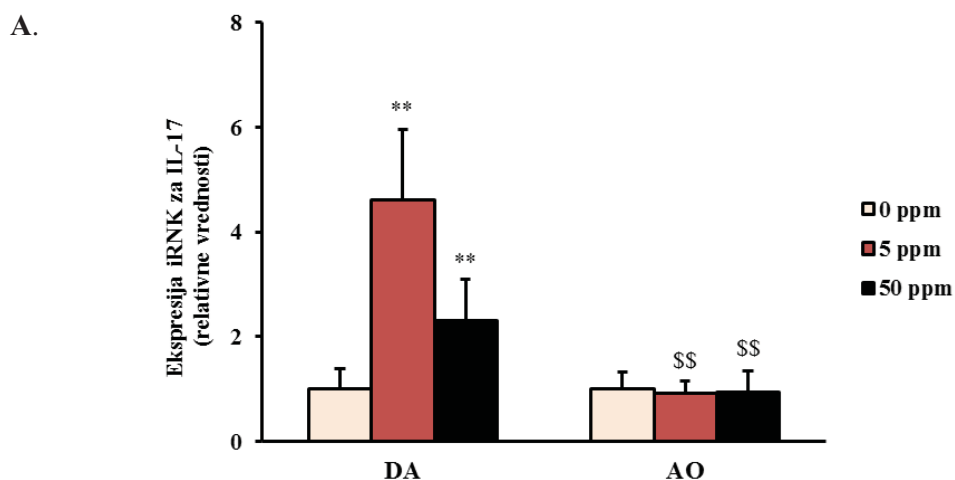


C.

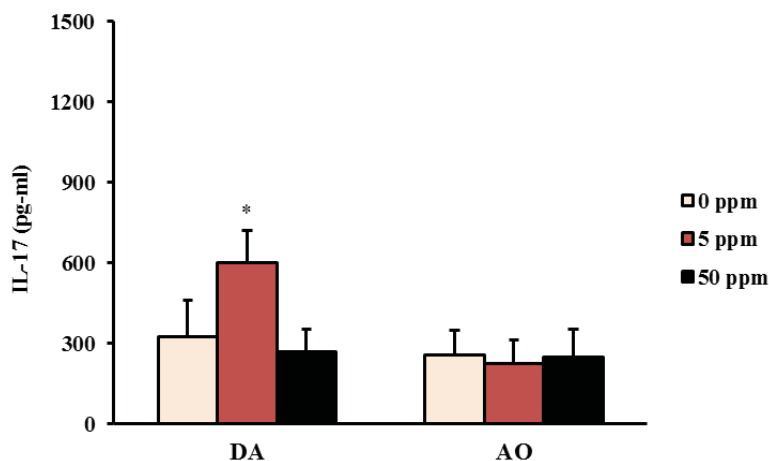


**Slika 18. Ekspresija gena za IFN- $\gamma$  i produkcija ovog citokina u MLČ:** (A) Ekspresija iRNA gena za IFN- $\gamma$ ; (B) Produkcija IFN- $\gamma$  bez stimulacije; (C) Produkcija IFN- $\gamma$  stimulisana sa ConA. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; # $P < 0.05$  u odnosu na 50 ppm odgovarajućeg soja; § $P < 0.05$ , §§ $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

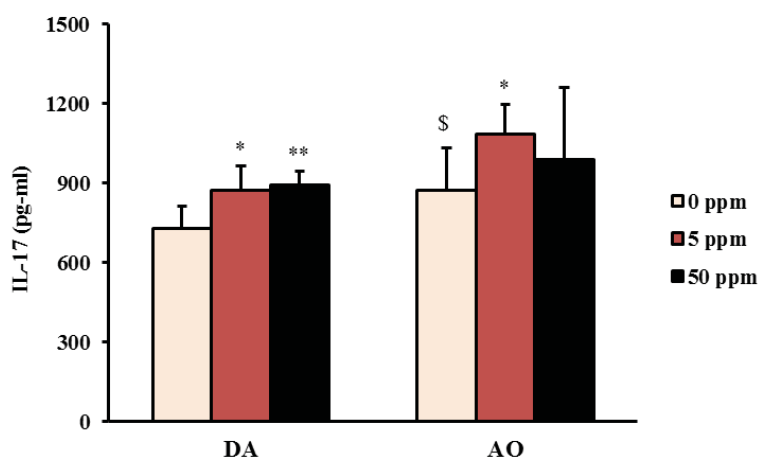
Proinflamatorna aktivnost ćelija MLČ AO pacova u odgovoru na tretman Cd je izostala i u slučaju ekspresije gena za IL-17, dok je povećan nivo iRNK za ovaj citokin zabeležen na obe primenjene doze (tendencija dozno zavisnog odgovora  $P = 0.06$ ) kod DA pacova (Slika 19A). Izmereni nivoi iRNK bili su viši kod tretiranih DA u odnosu na tretirane AO pacove. Nestimulisana produkcija IL-17 (Slika 19B) bila je povećana samo kod DA pacova na 5 ppm Cd, dok je kod tretiranih AO pacova ostala u nivou kontrolnih AO jedinki. Stimulacija ćelija MLČ sa ConA dovela je do povećane produkcije IL-17 (Slika 19C) kod DA pacova tretiranih sa 5 ppm i 50 ppm Cd u odnosu na netretirane DA pacove, dok je povećanje ConA stimulisane produkcije zabeleženo i kod AO pacova tretiranih sa 5 ppm Cd (u odnosu na netretirane AO pacove). Kao i u slučaju IFN- $\gamma$ , ConA stimulisana produkcija IL-17 od strane ćelija MLČ kontrolnih AO pacova bila je višeg nivoa u odnosu na ConA stimulisanu produkciju IL-17 od strane ćelija MLČ kontrolnih DA pacova. Nivoi produkovanog citokina bili su viši u slučaju ConA stimulisane u poređenju sa nestimulisanom produkcijom kod oba soja pacova.



B.

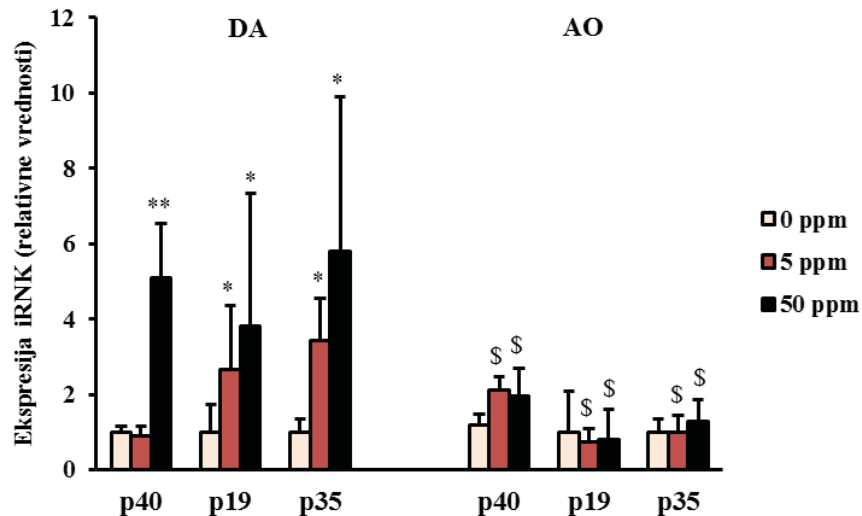


C.



**Slika 19. Ekspresija gena za IL-17 i produkcija ovog citokina u MLČ:** (A) Ekspresija iRNK gena za IL-17; (B) Produkcija IL-17 bez stimulacije; (C) Produkcija IL-17 stimulisana sa ConA. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja;  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{ss}P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja.

Ispitivanje ekspresije gena za IL-12 i IL-23 (Slika 20), osnovnih citokina koji su potrebni za diferencijaciju ćelija koje proizvode IFN- $\gamma$  i IL-17, redom (Iwakura i Ishigame, 2006; Langrish i drugi, 2004), ukazalo je na povećane nivoe ekspresije iRNK gena za p35 (subjedinica IL-12) i p19 (subjedinica IL-23) kod tretiranih DA pacova na obe doze Cd, kao i povećanje ekspresije zajedničke subjedinice ovih citokina (p40) kod DA pacova na 50 ppm Cd. Povećanje ekspresije gena za ispitivane citokine samo kod tretiranih DA pacova posledica je značajno većih nivoo iRNK kod tretiranih jedinki ovog soja u odnosu na jedinke AO soja, osim p40 čija je ekspresija viša kod AO pacova tretiranih nižom dozom Cd u odnosu na DA pacove.



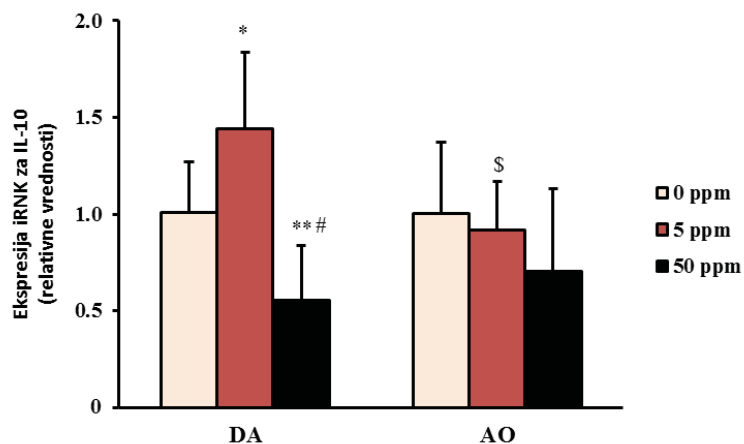
Slika 20. Ekspresija iRNAK gena za p40, p19 i p35 u MLČ. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; \$ $P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.4.5.3. Ekspresija gena i produkcija anti-inflamatornog citokina IL-10

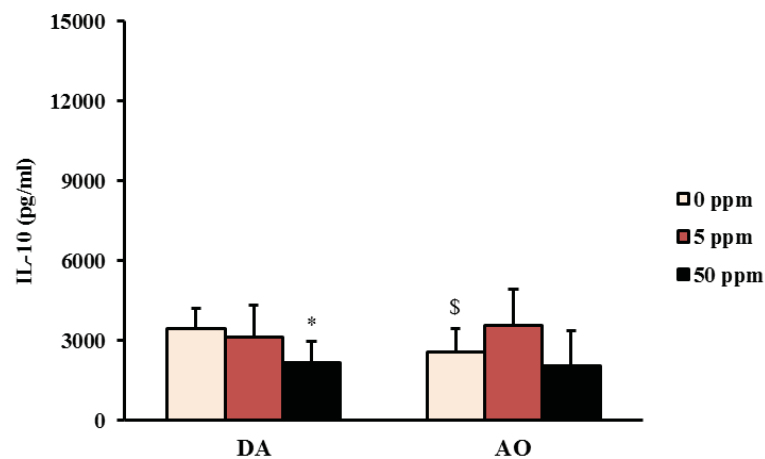
Usled zapaženih sojnih razlika u produkciji proinflamatornih citokina u odgovoru na oralni tretman Cd, dalje je ispitivan efekat ovog metala na anti-inflamatorni citokin IL-10, koji bi mogao da bude odgovoran za zapažene razlike. Efekat Cd na ekspresiju gena za anti-inflamatorni citokin IL-10 i njegovu produkciju, zavisio je od primenjene doze i soja pacova. Tako je kod DA pacova tretiranih nižom dozom Cd došlo do povećane ekspresije iRNAK za IL-10 (Slika 21A) dok je primena više doze dovela do smanjene ekspresije iRNAK za ovaj citokin. Tretman Cd nije uticao na ekspresiju iRNAK za IL-10 kod AO pacova. Nestimulisana produkcija IL-10 (Slika 21B) bila je smanjena kod DA pacova tretiranih višom dozom Cd u odnosu na netretirane DA pacove, dok je efekat Cd na produkciju IL-10 od strane ćelija MLČ AO pacova izostao. Sojne razlike su zapažene i na bazalnom nivou u vidu viših nivoa produkovanog citokina kod kontrolnih DA u odnosu na kontrolne AO pacove. U slučaju produkcije stimulisane sa ConA (Slika 21C), tretman Cd nije uticao na produkciju IL-10 kod DA pacova, dok je povećanje produkcije zapaženo kod AO pacova tretiranih višom dozom Cd u odnosu na netretirane AO pacove. Nivoi produkovanog citokina bili su viši u slučaju ConA stimulisane u poređenju sa nestimulisanom produkcijom kod oba soja pacova, sa višim vrednostima kod DA u odnosu na AO pacove na 0 ppm i 5 ppm Cd.



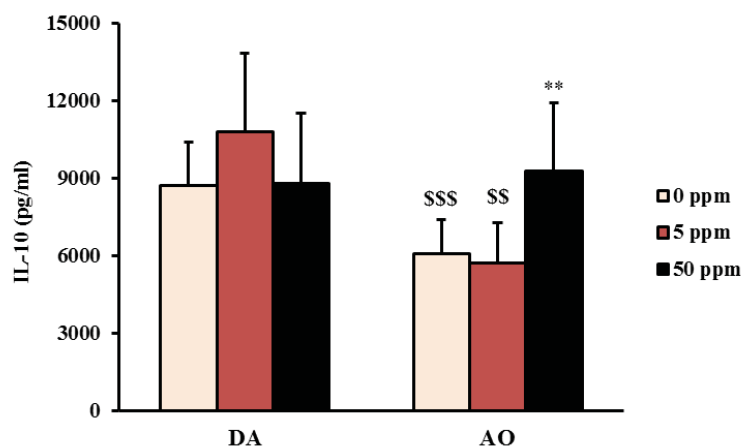
A.



B.



C.



Slika 21. Ekspresija gena za IL-10 i produkcija ovog citokina u MLC: (A) Ekspresija iRNK za IL-10; (B) Produkcija IL-10 bez stimulacije; (C) Produkcija IL-10 stimulisana sa ConA. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; # $P < 0.05$  u odnosu na 50 ppm odgovarajućeg soja; § $P < 0.05$ , §§ $P < 0.01$ , §§§ $P < 0.001$  u odnosu na životinje DA soja.

#### **4.5. Sistemski efekat oralno unetog kadmijuma**

Kako Cd, koji se apsorbuje iz lumena creva, prelazi u sistemsku cirkulaciju i distribuirana se do ostalih organa (Pinot i drugi, 2000), dalje su istraženi sistemski efekti oralnog unosa Cd ispitivanjem osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara kao i inflamatornih medijatora u perifernoj krvi, kao i osnovnih parametara imunske funkcije slezine.

##### **4.5.1. Efekat kadmijuma na leukocite periferne krvi**

###### **4.5.1.1. Ukupan broj i diferencijalni sastav leukocita periferne krvi**

Da bi se ispitao efekat Cd na ćelije periferne krvi, određeni su ukupan broj i diferencijalni sastav leukocita krvi automatizovanom metodom (Tabela 8). Dobijeni rezultati su pokazali numerički pad broja limfocita ( $P = 0.07$ ) i numeričko povećanje broja neutrofila ( $P = 0.08$ ) kod DA pacova tretiranih višom dozom Cd, kao i povećanje broja eozinofila kod tretiranih pacova ovog soja. Kod AO pacova, zabeleženo je jedino povećanje procentualne zastupljenosti eozinofila na 50 ppm Cd. Broj leukocita je bio viši kod kontrolnih DA u odnosu na kontrolne AO pacove a rezultati su pokazali i postojanje sojnih razlika u diferencijalnom sastavu leukocita periferne krvi (limfocita, neutrofilnih leukocita i eozinofilnih leukocita). Zastupljenost monocita je bila sličnog nivoa kod ispitivanih sojeva, osim na 50 ppm Cd gde su vrednosti bile više kod AO u poređenju sa DA pacovima. Zastupljenost bazofilnih leukocita je bila veća kod AO pacova tretiranih sa 5 ppm Cd u odnosu na DA pacove tretirane istom dozom, dok su slični nivoi ove populacije leukocita zabeleženi kod netretiranih DA i AO pacova kao i kod pacova tretiranih višom dozom Cd. Efekat oralnog unosa Cd na broj i diferencijalni sastav leukocita periferne krvi je dodatno potvrđen analizom uzoraka razmaza periferne krvi.

**Tabela 8.** Apsolutni broj leukocita i diferencijalni sastav ćelija periferne krvi.

Ćelije	DA			AO		
	Doza kadmijuma (ppm)			Doza kadmijuma (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
Leukociti ( $10^9/l$ )	9.2 ± 2.7	8.0 ± 1.4	7.8 ± 1.2	7.0 ± 2.3 <sup>S</sup>	6.3 ± 0.9 <sup>SS</sup>	5.7 ± 0.9 <sup>SS</sup>
Limfociti (%)	52.6 ± 9.1	47.4 ± 9.2	45.5 ± 7.3	61.3 ± 4.2 <sup>SS</sup>	60.3 ± 5.3 <sup>SS</sup>	59.1 ± 9.1 <sup>SS</sup>
Neutrofilni leukociti (%)	48.5 ± 12.1	49.8 ± 9.5	53.6 ± 9.1	35.1 ± 4.2 <sup>SSS</sup>	34.9 ± 5.6 <sup>SSS</sup>	36.7 ± 8.9 <sup>SSS</sup>
Monociti (%)	1.6 ± 0.9	1.6 ± 0.6	1.3 ± 0.3	2.2 ± 1.0	1.7 ± 0.7	1.9 ± 0.9 <sup>S</sup>
Eozinofilni leukociti (%)	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.2*	0.9 ± 0.2**	1.4 ± 0.6 <sup>SSS</sup>	1.6 ± 0.5 <sup>SSS</sup>	1.7 ± 0.4* <sup>SSS</sup>
Bazofilni leukociti (%)	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2 <sup>S</sup>	0.7 ± 0.2

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti broja leukocita i zastupljenosti pojedinih populacija ćelija iz najmanje dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>S</sup> $P < 0.05$ , <sup>SS</sup> $P < 0.01$ , <sup>SSS</sup> $P < 0.001$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.5.1.2. Hematološki parametri periferne krvi

Oralni unos Cd nije uticao na ukupan broj eritrocita, ukupni hemoglobin (Hg), hematokrit (engl., Hematocrit - HCT), unutarćelijski hemoglobin kao i broj trombocita (engl., Platelet - PLT) u perifernoj krvi DA i AO pacova (Tabela 9). Kod DA pacova je zabeleženo procentualno povećanje anizocitotskih ćelija na 5 ppm Cd i povećanje prosečne zapremine trombocita (engl., Mean Platelet Volume - MPV) na 50 ppm, u odnosu na 0 ppm Cd. Kod AO pacova, tretman nižom dozom Cd je doveo do povećanja prosečne zapremine eritrocita (engl., Mean Corpuscular Volume - MCV) a tretman višom dozom Cd je uticao na smanjenje vrednosti prosečne količine hemoglobina u eritrocitima (engl., Mean Corpuscular Hemoglobin - MCH) i prosečne koncentracije hemoglobina na litar eritrocita (engl., Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration - MCHC), u odnosu na kontrolne AO pacove. Diskretne ali statistički značajne sojne razlike su zapažene u pojedinim parametrima (Hg, MCV, MPV, MCH, MCHC, unutarćelijski Hg, anizocitoza i hipohromija) i to uglavnom na bazalnom nivou, poredeći vrednosti netretiranih DA i AO pacova.

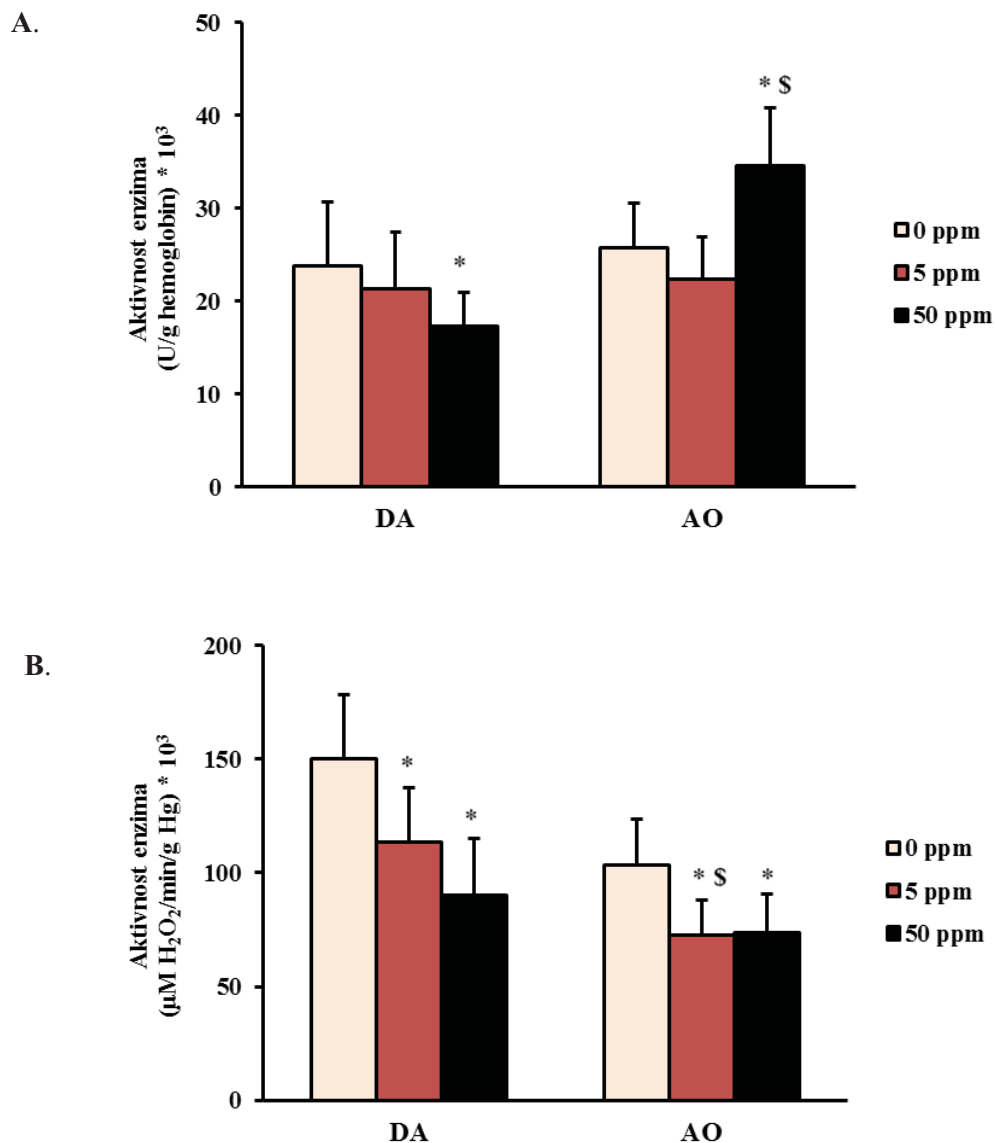
**Tabela 9.** Hematološki parametri

Parametar	DA			AO		
	Doza kadmijuma (ppm)			Doza kadmijuma (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
Eritrociti ( $10^{12}/l$ )	8.3 ± 0.4	8.2 ± 0.5	8.3 ± 0.4	8.2 ± 0.7	8.0 ± 0.6	8.3 ± 0.5
Hg g/l	138.4 ± 9.5	138.0 ± 11.0	138.0 ± 8.3	147.3 ± 11.4 <sup>S</sup>	145.8 ± 7.1	144.1 ± 10.2
HCT (%)	0.43 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.02	0.44 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.45 ± 0.02
MCV (fl)	51.4 ± 1.5	51.6 ± 0.9	52.0 ± 3.6	53.3 ± 2.0 <sup>S</sup>	54.8 ± 1.5 <sup>S</sup>	54.8 ± 3.4 <sup>S</sup>
PLT ( $10^9/l$ )	716.0 ± 133.8	772.1 ± 98.9	710.7 ± 75.8	705.1 ± 133.6	725.6 ± 91.2	682.6 ± 69.9
MPV	7.9 ± 0.8	8.0 ± 0.4	8.5 ± 0.5*	8.7 ± 0.8 <sup>S</sup>	8.4 ± 0.6	9.0 ± 0.6
MCH (pg)	16.6 ± 0.8	16.9 ± 0.5	16.4 ± 1.3	18.1 ± 1.0 <sup>S</sup>	18.1 ± 1.0 <sup>S</sup>	17.0 ± 0.8**
MCHC(g/l)	321.5 ± 19.1	323.3 ± 5.3	319.6 ± 8.1	336.5 ± 14.4 <sup>S</sup>	331.7 ± 12.6	316.5 ± 14.4**
Unutarćelijski Hg (g/l)	130.3 ± 7.9	131.5 ± 13.1	133.4 ± 8.3	147.7 ± 9.7 <sup>S</sup>	146.8 ± 6.1 <sup>S</sup>	139.8 ± 9.6
Anizocitoza (%)	1.4 ± 0.4	2.2 ± 1.3*	1.7 ± 0.6	1.8 ± 0.8	1.1 ± 0.6 <sup>S</sup>	1.5 ± 0.9
Hipohromija (%)	1.9 ± 1.4	3.3 ± 1.8	2.3 ± 1.4	3.3 ± 0.7 <sup>S</sup>	2.3 ± 1.4	3.2 ± 2.0

Skraćenice: Hg-hemoglobin; HCT-hematokrit(engl., Hematocrit); MCV-prosečna zapremina eritrocita (engl., Mean Corpuscular Volume); PLT-broj trombocita (engl., Platelet); MPV-prosečna zapremina trombocita (engl., Mean Platelet Volume); MCH-prosečna količina hemoglobina u eritrocitima (engl., Mean Corpuscular Hemoglobin); MCHC-prosečna koncentracija hemoglobina na litar eritrocita (engl., Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja zastupljenosti pojedinih populacija ćelija iz najmanje dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>S</sup> $P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.5.2. Aktivnost enzima antioksidativne odbrane (SOD i CAT) u eritrocitima

U cilju ispitivanja prisustva oksidativnog stresa na sistemskom nivou, merena je aktivnost SOD i CAT u eritrocitima periferne krvi kod DA i AO pacova. Kadmijum je ispoljio diferencijalni efekat na aktivnost SOD kod ova dva soja pacova tretirana višom dozom metala, u vidu smanjene aktivnosti kod DA i povećane aktivnosti kod AO pacova (uz više nivoe u odnosu na DA pacove na 50 ppm) u odnosu na kontrolne životinje (Slika 22A). Aktivnost CAT je bila smanjena nakon tretmana životinja sa 5 ppm i 50 ppm u odnosu na 0 ppm Cd i to kod oba soja pacova (Slika 22B).



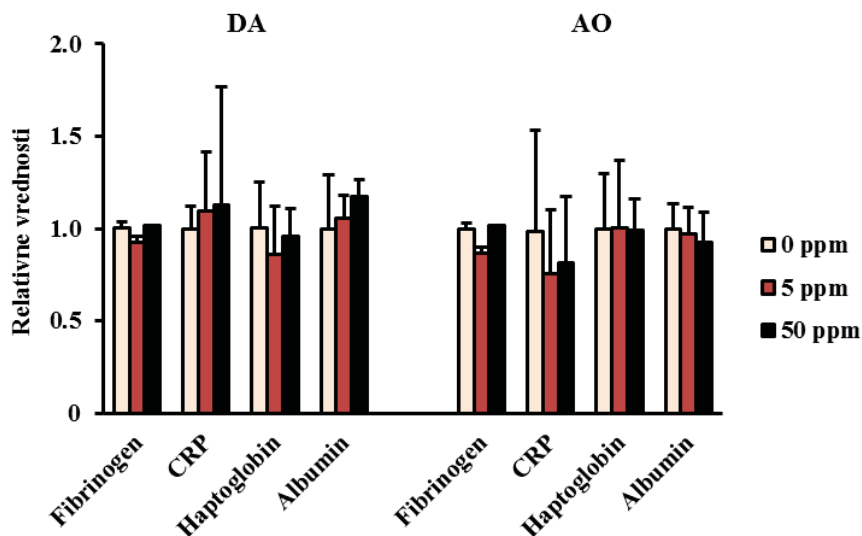
**Slika 22.** Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima periferne krvi (A) Superoksid dismutaza (SOD) i (B) Katalaza (CAT). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>S</sup> $P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.5.3. Efekat kadmijuma na humoralne činioce sistemske zapaljenske reakcije

Sistemske zapaljenske odgovore na tretman Cd dalje je ispitan na osnovu nivoa proteina akutne faze u plazmi (fibrinogen) i u serumu (haptoglobin, albumin i C reaktivni protein/CRP) i nivoa inflamatornih citokina (IL-6, TNF, IL-1 $\beta$ ) u plazmi kontrolnih i tretiranih pacova. Dodatno, u serumu je izmeren nivo HMGB1 molekula.

#### 4.5.3.1. Proteini akutne faze

Oralni unos Cd nije imao uticaja na nivo ispitivanih proteina akutne faze (fibrinogen, haptoglobin, CRP i albumin) kod oba soja pacova (Slika 23).



Slika 23. Koncentracije proteina akutne faze u perifernoj krvi pacova. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9).

#### 4.5.3.2. Efekat kadmijuma na koncentraciju TNF, IL-1 $\beta$ i IL-6 u plazmi pacova

Nivo TNF, IL-1 $\beta$  i IL-6 u svim uzorcima plazme kontrolnih i tretiranih životinja oba soja pacova bio je ispod donje granice detekcije komercijalnih ELISA kitova.

#### 4.5.3.3. Koncentracija HMGB1 molekula u serumu

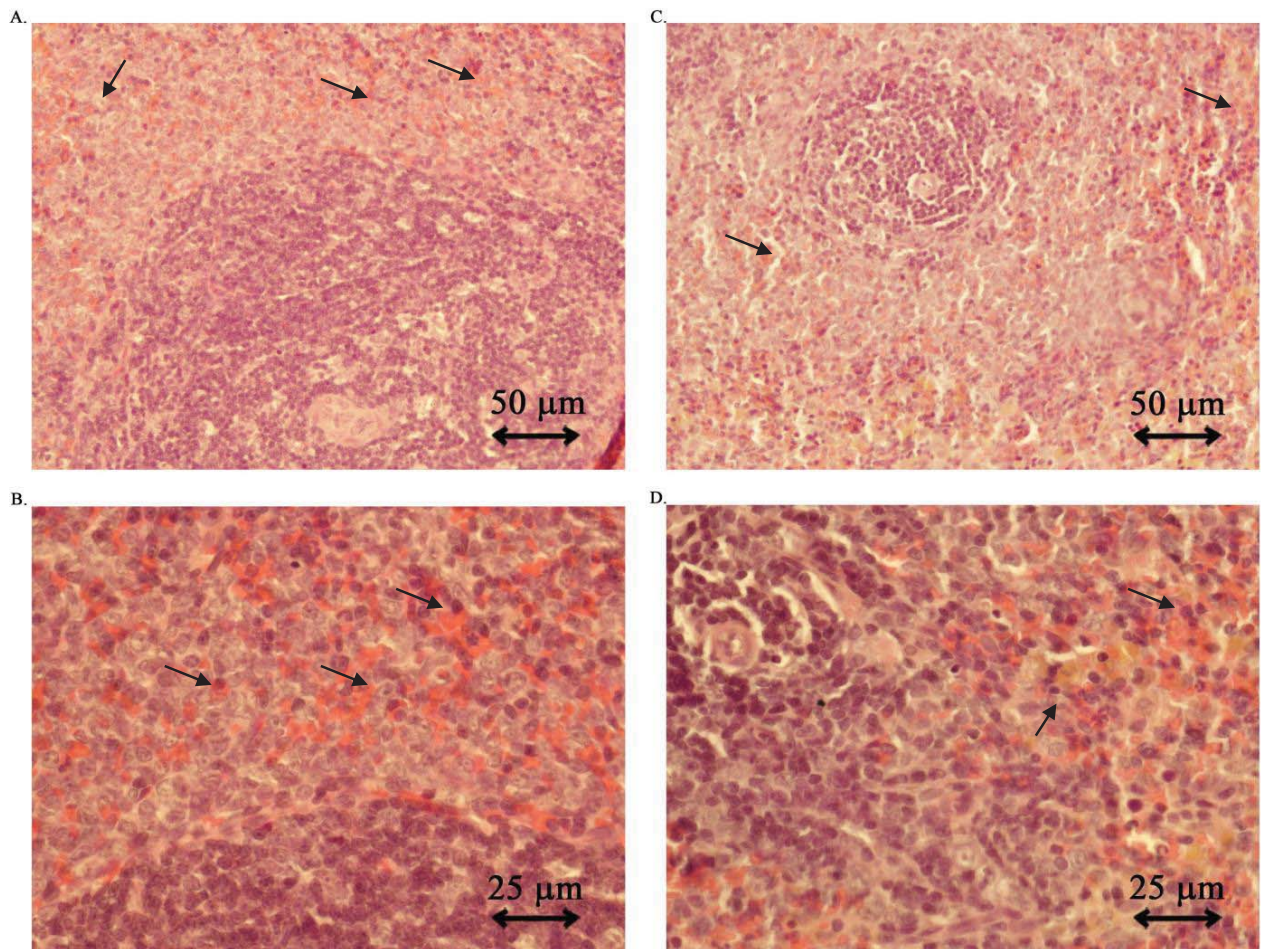
Nivo HMGB1 molekula bio je povećan u serumu DA pacova tretiranih nižom ( $1.24 \pm 0.07$ ) i višom ( $1.16 \pm 0.07$ ) dozom Cd u poređenju sa netretiranim DA pacovima ( $1.00 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ). Koncentracija HMGB1 nije bila promenjena kod tretiranih AO pacova ( $1.07 \pm 0.05$  i  $1.03 \pm 0.05$  na 5 ppm i 50 ppm Cd, redom, u poređenju sa  $1.00 \pm 0.05$  na 0 ppm Cd).

#### 4.6. Efekat oralnog tretmana kadmijumom na slezinu

Budući da Cd u slezinu dospeva putem krvi gde se deponuje u sličnoj koncentraciji kao i u MLC kod oba soja pacova, a u svetlu uloge slezine u odgovoru na antigene iz krvi, dalje su ispitani parametri aktivnosti ovog limfnog tkiva.

#### 4.6.1. Histopatološke promene u slezini

Histopatološka analiza tkiva slezine (Slika 24) ukazala je na regione krvarenja kod oba soja pacova tretiranih višom dozom Cd, a ova promena je bila izraženija kod DA u poređenju sa AO pacovima.



**Slika 24. Histopatološke promene u slezini na 50 ppm kadmijuma:**(A ) DA x 200, zone krvarenja (strelice); (B) DA x 400; (A ) AO x 200 zone krvarenja (strelice); (B) AO x 400.

#### 4.6.2. Diferencijalni sastav leukocita slezine

Analiza diferencijalnog sastava leukocita u preparatima otiska slezine nije ukazala na postojanje razlika u procentualnoj zastupljenosti osnovnih ćelijskih populacija (kao što su limfociti, granulociti i monociti) kod tretiranih u odnosu na kontrolne životinje oba soja pacova (Tabela 10).



**Tabela 10.** Diferencijalni sastav leukocita slezine

Ćelije	DA			AO		
	Doza kadmijuma (ppm)			Doza kadmijuma (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
Limfociti (%)	92.0 ± 1.0	90.7 ± 2.0	92.0 ± 1.8	90.9 ± 1.7	90.2 ± 0.2	90.2 ± 0.3
Granulociti (%)	5.01 ± 1.6	5.5 ± 1.2	4.1 ± 0.8	5.4 ± 0.9	5.8 ± 0.8	6.0 ± 0.7
Monociti (%)	2.3 ± 0.5	2.6 ± 0.5	2.5 ± 0.4	2.2 ± 0.4	2.6 ± 0.3	2.3 ± 0.3

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 5 - 9).

#### 4.6.3. Pregled opštih parametara slezine (masa, celularnost, osnovne subpopulacije T limfocita, vijabilnost i proliferativni odgovor)

Oralni unos Cd nije uticao na relativnu masu slezine kao ni na broj ćelija kod DA i AO pacova. Fenotipska analiza osnovnih populacija T ćelija slezine, CD4 i CD8, pokazala je odsustvo efekta Cd na njihovu zastupljenost kod oba soja pacova. Zabeležena je smanjena vijabilnost i povećan udeo apoptotskih ćelija i to samo kod DA pacova tretiranih sa 50 ppm Cd u odnosu na kontrolne DA pacove. Nestimulisana proliferativna aktivnost ćelija slezine bila je smanjena kod pacova oba soja tretiranih višom dozom Cd u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu dok je ConA-stimulisana proliferacija (iako višeg nivoa u odnosu na nestimulisanu proliferaciju odgovarajućih grupa tretmana) bila smanjena samo kod DA pacova tretiranih sa 5 ppm i 50 ppm Cd u odnosu na kontrolne pacove (Tabela 11).



**Tabela 11.** Efekat kadmijuma na relativnu masu slezine, celularnost, subpopulacije T limfocita, vijabilnost i proliferativni odgovor ćelija slezine

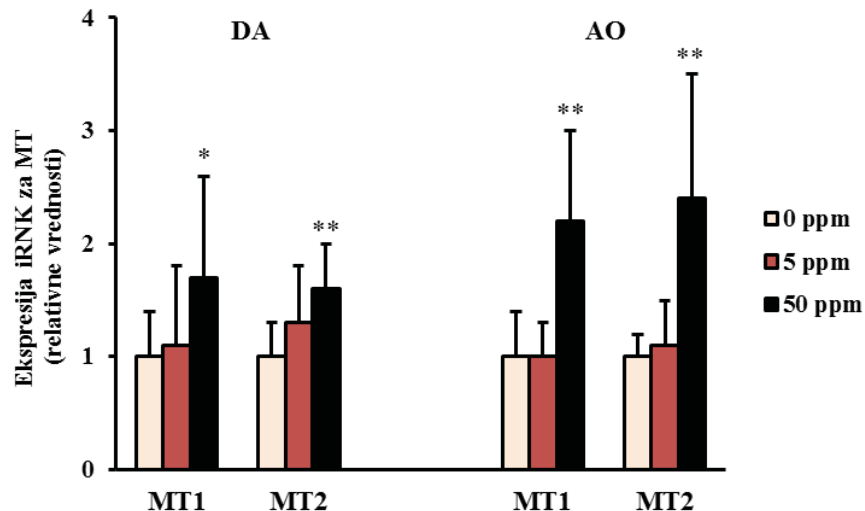
Parametar	DA			AO		
	Doza kadmijuma (ppm)			Doza kadmijuma (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
Relativna masa (%)	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Broj ćelija (×10 <sup>6</sup> )	285.2 ± 49.1	299.4 ± 47.3	281.0 ± 63.8	303.6 ± 50.5	282.6 ± 62.8	337.3 ± 51.6
CD4 (%)	18.9 ± 3.8	20.7 ± 3.5	21.7 ± 6.3	15.2 ± 1.6	13.8 ± 2.7 <sup>S</sup>	14.4 ± 1.2 <sup>SS</sup>
CD8 (%)	14.6 ± 1.7	15.6 ± 2.0	15.4 ± 1.2	13.5 ± 1.9	13.1 ± 3.2	13.9 ± 1.9
CD4/CD8	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.1 <sup>S</sup>
<b>Vijabilnost (%)</b>						
Žive	96.4 ± 0.9	95.9 ± 0.5	95.2 ± 1.2*	96.2 ± 0.5	95.6 ± 0.5	96.1 ± 0.7
Apoptične	3.4 ± 0.8	3.8 ± 0.5	4.6 ± 1.1*	3.7 ± 0.6	4.2 ± 0.5	3.6 ± 0.7
<b>Proliferativni odgovor (b.o.m × 10<sup>3</sup>)</b>						
Bez stimulacije	1.5 ± 0.4	1.9 ± 0.7	0.6 ± 0.4***	1.1 ± 0.4	1.5 ± 0.6	0.6 ± 0.2**
Stimulisan sa ConA	3.8 ± 1.0 <sup>^</sup>	2.3 ± 1.0 <sup>****^</sup>	2.0 ± 1.6 <sup>***^</sup>	3.1 ± 1.3 <sup>^</sup>	2.3 ± 0.8 <sup>^</sup>	3.6 ± 1.5 <sup>^</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednostimerenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>S</sup> $P < 0.05$ , <sup>SS</sup> $P < 0.01$  u odnosu na životinje DA soja; <sup>^</sup> $P < 0.05$  u odnosu na nestimulisanu proliferaciju.

#### 4.6.4. Odgovor ćelija slezine na stres indukovao oralnim unosom kadmijuma

##### 4.6.4.1. Efekat oralnog unosa kadmijuma na ekspresiju gena za metalotioneine 1 i 2 (MT1 i MT2) od strane ćelija slezine

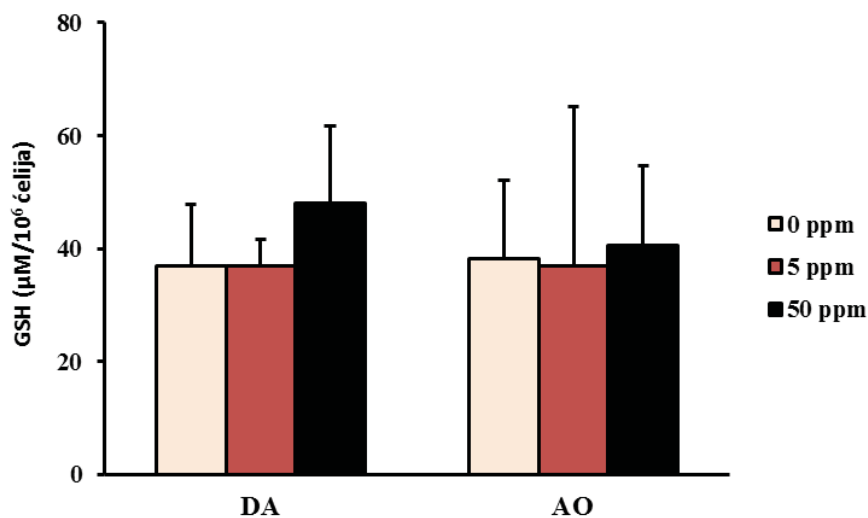
Kadmijum je u slezini indukovao ekspresiju iRNK za obe izoforme metalotioneina (MT1 i MT2) kod oba soja pacova tretiranih višom dozom Cd, u odnosu na odgovarajuće kontrolne životinje (Slika 25).



Slika 25. Ekspresija gena za metalotioneine-MT1 i MT2 u ćelijama slezine. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ekspresije iRNK gena za MT1 i MT2 iz dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.6.4.2. Efekat oralnog unosa kadmijuma na nivo unutarćelijskog redukovanog glutationa (GSH) u ćelijama slezine

Nivo unutarćelijskog glutationa je bio povećan samo numerički kod DA pacova tretiranih sa 50 ppm Cd ( $P = 0.12$ ) usled velikih devijacija unutar eksperimentalnih grupa, dok promene nisu zabeležene kod AO pacova (Slika 26).



Slika 26. Efekat oralnog unosa kadmijuma na koncentraciju unutarćelijskog redukovanog glutationa (GSH) u slezini. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9).

#### 4.6.5. Efekat kadmijuma na urođeni imunski odgovor u slezini

##### 4.6.5.1. Fenotipska karakterizacija ćelija urođene imunosti u slezini

Oralni unos Cd je uticao na povećanje procentualne zastupljenosti HIS48<sup>+</sup> ćelija samo kod DA pacova na 50 ppm u odnosu na 0 ppm Cd. Tretman pacova nije imao efekta na zastupljenost NKG2D<sup>+</sup> ćelija kao ni na zastupljenost CD11b<sup>+</sup> ćelija izolovanih iz slezina pacova oba soja (Tabela 12).

**Tabela 12.** Zastupljenost populacija ćelija urođene imunosti u slezini

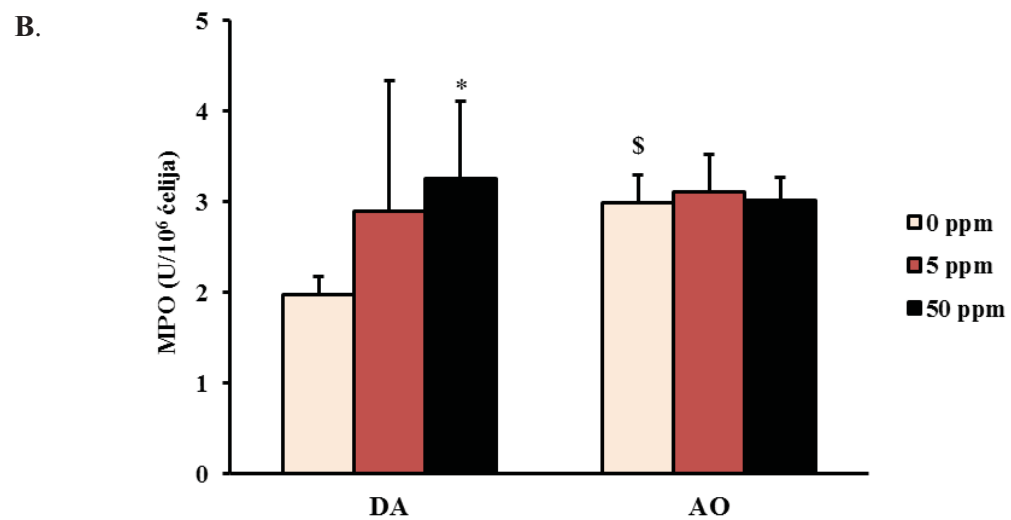
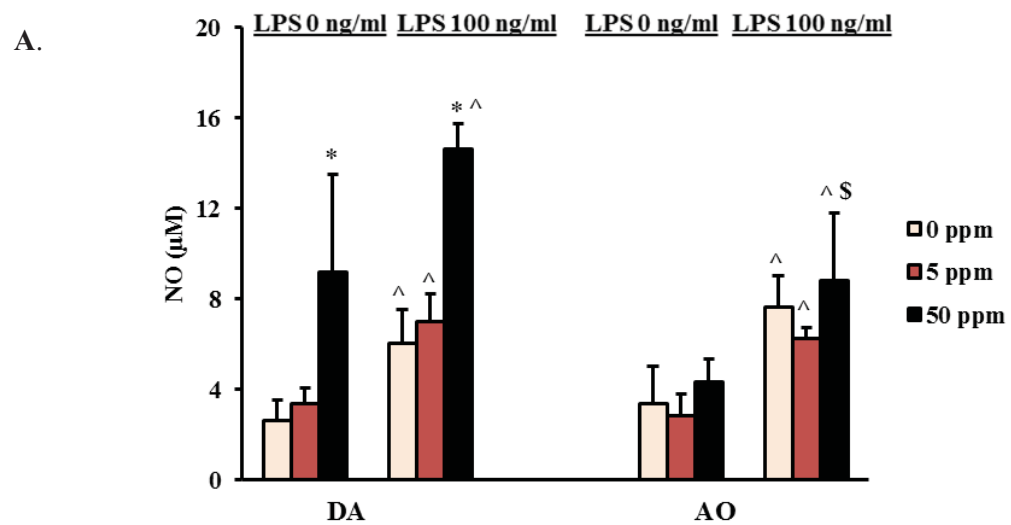
Ćelije (%)	DA			AO		
	Doza kadmijuma (ppm)			Doza kadmijuma (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
HIS48	12.8 ± 1.6	14.2 ± 2.5	15.4 ± 2.0*	11.5 ± 3.2	13.9 ± 2.1	12.4 ± 1.0
NKG2D	3.3 ± 0.7	2.8 ± 0.9	3.0 ± 0.7	4.2 ± 1.4	4.4 ± 2.1	4.7 ± 0.9 <sup>sss</sup>
CD11b	2.8 ± 0.8	3.2 ± 0.4	2.8 ± 0.7	3.4 ± 1.0	3.9 ± 0.5	3.4 ± 0.8

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>sss</sup> $P < 0.001$  u odnosu na životinje DA soja.

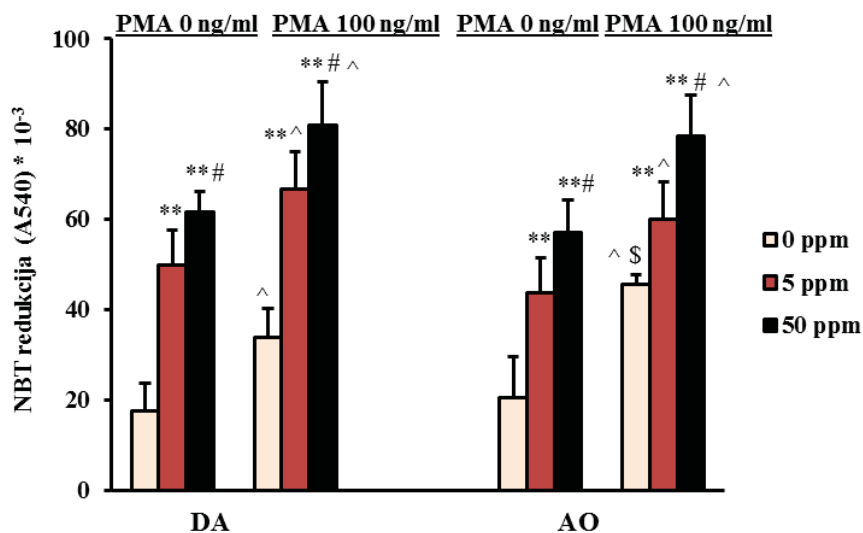
##### 4.6.5.2. Efekat kadmijuma na oksidativne aktivnosti ćelija urođene imunosti u slezini

Nestimulisana produkcija NO kao i produkcija stimulisana LPS-om bile su povećane samo kod DA pacova na 50 ppm Cd u odnosu na netretirane DA pacove (Slika 27A) i dodatno, kod DA pacova tretiranih višom dozom Cd, stimulacija LPS-om je dovela do viših nivoa NO u odnosu na AO pacove tretirane istom dozom Cd. Kod oba soja pacova u svim eksperimentalnim grupama, viši nivoi NO su bili prisutni u slučaju LPS-stimulisane produkcije u odnosu na nestimulisanu. Aktivnost MPO (Slika 27B) je takođe bila povećana samo kod DA pacova na 50 ppm Cd u odnosu na netretirane DA pacove a sojne razlike su zapažene u bazalnom nivou aktivnosti enzima (veća aktivnost kod kontrolnih AO u odnosu na DA pacove). Redukcija NBT je bila povećana, dozno zavisno (Slika 27C), kod oba soja pacova uz značajno više vrednosti redukcije nakon stimulacije ćelija sa PMA. Redukcija NBT u slučaju stimulacije sa PMA je bila većeg intenziteta kod kontrolnih AO u poređenju sa kontrolnim DA pacovima. Tretman Cd nije doveo do promene u zastupljenosti DHR<sup>+</sup> ćelija (Slika 27D) u slučaju nestimulisane i PMA-stimulisane DHR oksidacije, kod oba soja

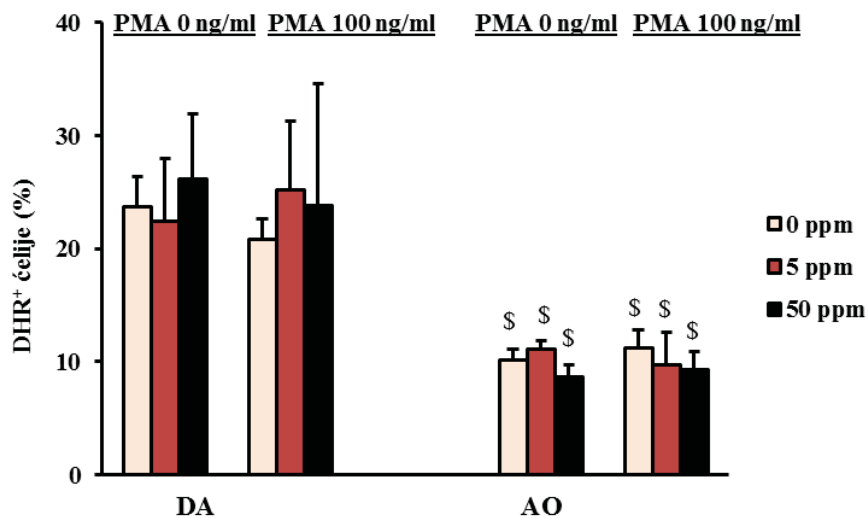
pacova. Kod DA pacova su DHR<sup>+</sup> ćelije bile zastupljenije u odnosu na AO pacove i to u svim eksperimentalnim grupama.



C.



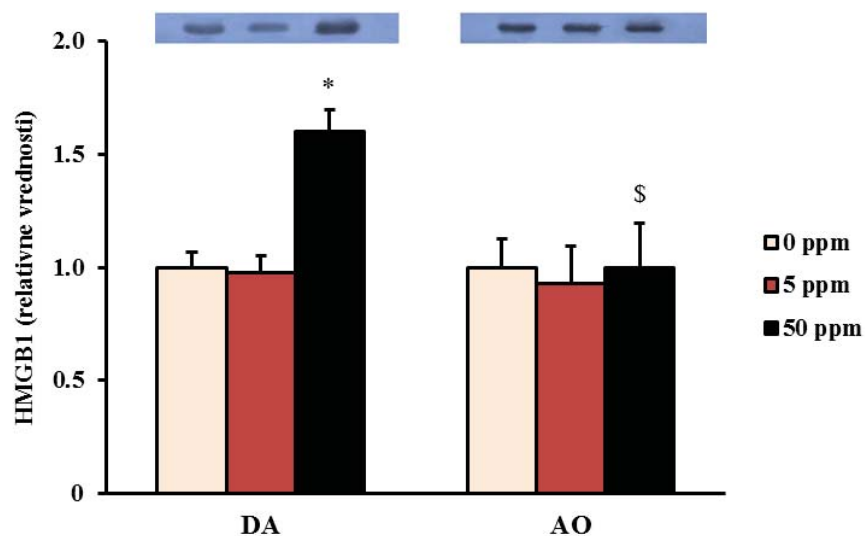
D.



Slika 27. Oksidativna aktivnost ćelija slezine: (A) Produkcija NO; (B) Aktivnost unutarćelijske MPO; (C) Redukcija NBT; (D) Oksidacija DHR. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; #*P* < 0.05 u odnosu na 50 ppm odgovarajućeg soja; \$*P* < 0.05 u odnosu na životinje DA soja; ^ *P* < 0.05 u odnosu na nestimulisanu aktivnost.

#### 4.6.5.3. Koncentracija HMGB1 molekula u slezini

Nivo HMGB1 molekula u homogenatu tkiva slezine (Slika 28) je kao i u slučaju seruma i homogenata creva, bio povišen samo kod DA pacova na 50 ppm u odnosu na 0 ppm Cd pa je koncentracija ovog molekula bila veća i u odnosu na AO pacove tretirane sa 50 ppm Cd.



**Slika 28. Koncentracija HMGB1 molekula u slezini.** Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja;  $^{\$}P < 0.05$  u odnosu na životinje DA soja.

#### 4.6.6. Efekat kadmijuma na citokinski odgovor ćelija slezine

##### 4.6.6.1. Produkcija IL-1 $\beta$

U daljem ispitivanju uticaja oralnog tretmana Cd na urođeni imunski odgovor u slezini, merena je koncentracija IL-1 $\beta$  u kondicioniranom medijumu ćelija slezine. Nestimulisana produkcija IL-1 $\beta$  je bila povećana samo kod DA pacova na 50 ppm Cd dok je ConA-stimulisana produkcija bila u nivou nestimulisanе produkcije i bila je nepromenjena kod tretiranih u odnosu na kontrolne pacove kod oba soja (Tabela 13).

**Tabela 13.** Produkcija IL-1 $\beta$  od strane ćelija slezine

IL-1 $\beta$ (pg/ml)	DA			AO		
	Doza kadmijuma (ppm)			Doza kadmijuma (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
Nestimulisana	1265.8 $\pm$ 63.0	1191.3 $\pm$ 165.6	1743.3 $\pm$ 301.9**	1260.2 $\pm$ 130.2	1264.3 $\pm$ 249.7	1318.6 $\pm$ 83.4
Stimulisana sa ConA	1256.6 $\pm$ 148.7	1326.3 $\pm$ 230.8	1260.1 $\pm$ 182.9	1228.3 $\pm$ 121.0	1475.3 $\pm$ 382.7	1138.9 $\pm$ 139.2

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracije citokina iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja.

#### 4.6.6.2. Produkcija IFN- $\gamma$ i IL-17

Da bi se dodatno okarakterisao imunski odgovor na oralni unos Cd u slezini, merene su koncentracije proinflammatoryh citokina IFN- $\gamma$  i IL-17 u kondicioniranom medijumu ćelija slezine (Tabela 14). Povećana produkcija IFN- $\gamma$  i IL-17 zabeležena je samo kod tretiranih DA u odnosu na netretirane DA pacove. U slučaju ConA-stimulisane produkcije zapažen je pad u produkciji IL-17 kod DA pacova na 50 ppm u odnosu na 0 ppm Cd. Bazalni nivo (produkcija citokina kod netretiranih životinja) nestimulisane produkcije IFN- $\gamma$  je bio viši kod AO u odnosu na DA pacove. Kod oba soja pacova, ConA -stimulisana produkcija je imala više vrednosti u odnosu na nestimulisanu produkciju.

**Tabela 14.** Efekat oralnog unosa kadmijuma na produkciju IFN- $\gamma$  i IL-17 od strane ćelija slezine

Citokin (pg/ml)	DA			AO		
	Doza kadmijuma (ppm)					
	0	5	50	0	5	50
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>						
Bez stimulacije	682.7 $\pm$ 211.0	922.0 $\pm$ 200.0*	975.3 $\pm$ 326.8*	1630.6 $\pm$ 563.0 <sup>sss</sup>	1497.5 $\pm$ 627.7	1461.5 $\pm$ 746.2
Stimulacija sa ConA	2029.5 $\pm$ 286.2 <sup>^</sup>	2227.4 $\pm$ 889.9 <sup>^</sup>	2236.4 $\pm$ 552.6 <sup>^</sup>	2327.4 $\pm$ 454.1 <sup>^</sup>	2120.8 $\pm$ 330.6 <sup>^</sup>	2110.2 $\pm$ 405.5 <sup>^</sup>
<b>IL-17</b>						
Bez stimulacije	493.3 $\pm$ 141.2	829.5 $\pm$ 218.6*	807.1 $\pm$ 351.0*	555.5 $\pm$ 163.7	538.0 $\pm$ 185.9	439.3 $\pm$ 121.9
Stimulacija sa ConA	1340.9 $\pm$ 184.3 <sup>^</sup>	1230.1 $\pm$ 176.4 <sup>^</sup>	971.1 $\pm$ 229.7**	1286.2 $\pm$ 133.2 <sup>^</sup>	1311.7 $\pm$ 92.6 <sup>^</sup>	1317.9 $\pm$ 176.9 <sup>S^</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti koncentracije citokina iz najmanje dva nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>S</sup> $P < 0.05$ , <sup>sss</sup> $P < 0.001$  u odnosu na životinje DA soja; <sup>^</sup> $P < 0.05$  u odnosu na nestimulisanu produkciju.

#### 4.6.6.3. Efekat oralnog unosa kadmijuma na produkciju anti-inflamatornog citokina IL-10 u kondicioniranom medijumu ćelija slezine

Nestimulisanu produkciju anti-inflamatornog citokina IL-10 nije bila promenjena kod tretiranih pacova oba soja, osim kod AO pacova na 5 ppm Cd gde je zabeležen povećan nivo ovog citokina u odnosu na netretirane AO pacove. Tretman Cd nije uticao na ConA-stimulisanu produkciju IL-10 kod oba soja pacova (Tabela 15), a odgovor na stimulaciju je zabeležen samo kod kontrolnih AO pacova. Nivoi produkovanog IL-10 su bili viši kod DA u odnosu na AO pacove u svim eksperimentalnim grupama.

**Tabela 15.** Efekat oralnog unosa kadmijuma na produkciju IL-10 u slezini

IL-10 (pg/ml)	DA			AO		
	Doza kadmijuma (ppm)			Doza kadmijuma (ppm)		
	0	5	50	0	5	50
Bez stimulacije	983.3 ± 215.1	812.5 ± 145.0	893.7 ± 46.4	263.7 ± 37.1 <sup>\$</sup>	440.0 ± 50.7 <sup>** \$</sup>	340.0 ± 105.9 <sup>\$\$</sup>
Stimulacija sa ConA	1111.2 ± 251.5	1322.5 ± 583.4	1011.2 ± 109.2	426.2 ± 34.2 <sup>\$ ^^</sup>	443.3 ± 127.1 <sup>\$</sup>	386.7 ± 20.8 <sup>\$</sup>

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja iz najmanje dva nezavisna eksperimenta ± S.D. (N = 5 - 9). Statistički značajne razlike: <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01 u odnosu na 0 ppm odgovarajućeg soja; <sup>\$</sup>*P* < 0.05, <sup>\$\$</sup>*P* < 0.01 u odnosu na životinje DA soja; <sup>^^</sup>*P* < 0.01 u odnosu na nestimulisano produkciju.

## 5. DISKUSIJA

U ovom radu je ispitana lokalna (u crevu i drenirajućim mezenteričnim limfnim čvorovima) i sistemska (u perifernoj krvi i slezini) imunotoksičnost kadmijuma koji u organizam dospeva oralnim putem (u vodi za piće, tokom 30 dana). Iako je poznato da genetska podloga utiče na razlike u podložnosti toksičnim efektima (u testisima, jetri, bubrezima, slezini, plućima) Cd u režimu akutne parenteralne primene ovog metala kod miševa (Dalton i drugi, 2005; King i drugi, 1998; Liu i drugi, 2001; Nolan i Shaikh, 1986; Shaikh i drugi, 1993) i pacova (Demenesku i drugi, 2016; Harstad i Klaassen, 2002; Kuester i drugi, 2002; Shimada i drugi, 2008), nedostaju podaci o sojnim razlikama toksičnih efekata oralne produžene primene Cd. Zato je u radu ispitivan uticaj genetske podloge na toksičnost Cd u režimu subhronične oralne primene ovog metala kod dva soja pacova, DA i AO, za koje je poznato da se razlikuju u osetljivosti na različite agense što je pokazano u tkivima i organima kao što su nervno tkivo (Lukic i drugi, 2001), pluća (Mirkov i drugi, 2015), koža (Popov Aleksandrov i drugi, 2015), crevo i zglobovi (Kovacevic-Jovanovic i drugi, 2015). Sojne razlike u podložnosti oralnom subhroničnom tretmanu Cd su analizirane na osnovu prisustva i/ili odsustva razlika kod odgovarajućeg soja (poređenjem netretiranih i tretiranih životinja odgovarajućeg soja) i na osnovu intenziteta promena (poredeći DA i AO pacove odgovarajućih eksperimentalnih grupa).

Korišćene koncentracije Cd bile su 5 ppm (5 mg/l, niža doza) i 50 ppm (50 mg/l, viša doza), i ove doze su u nivou koncentracija Cd koje su prisutne u životnoj sredini (Blanusa i



drugi, 2002; Damek-Poprawa i Sawicka-Kapusta, 2004; Lukacinova i drugi, 2011). Primenjene doze su takođe od značaja za izloženost ljudi. Tako, doza od 5 ppm Cd odgovara dozi Cd kojoj su bile izložene žene obolele od *Itai-Itai* bolesti (Bhattacharyya i drugi, 1988), dok doza od 50 ppm Cd odgovara dozi kojoj su izloženi ljudi koji naseljavaju veoma zagađena područja ili su izloženi Cd na radnom mestu (Wang i drugi, 2003).

U slučaju oralnog unosa ksenobiotika, crevo je prvi organ koji podleže direktnom štetnom delovanju unetih supstanci (Fazeli i drugi, 2011) a duodenum najosetljiviji region creva kada je u pitanju oralni unos Cd. Podložnost duodenuma štetnim efektima Cd je pokazana na modelu oralnog tretmana eksperimentalnih glodara Cd, gde je pokazan visok nivo deponovanja ovog metala u tkivu duodenuma (u odnosu na ostale regione creva) i to verovatno zbog veće luminalne površine u odnosu na ostale regione creva, prisustva najveće gustine transportera divalentnih metala i pogodnog pH za precipitaciju metala (Breton i drugi, 2013a; Park i drugi, 2002; Reeves i Chaney, 2008; Zhao i drugi, 2006). Iako postoje podaci o efektu Cd na parametre imunske reaktivnosti intestinuma (Andersen i drugi, 1988b; Breton i drugi, 2013a; Hyun i drugi, 2007; Liu i drugi, 2014; Zhao i drugi, 2006) podaci o efektu Cd na imunski odgovor u MLČ nisu poznati.

### **5.1. Osnovni parametri toksičnosti oralne primene Cd kod pacova**

Pri razmatranju toksičnosti neke supstance, promena telesne mase kao i promena unosa hrane i vode (Ajani i drugi, 1990) posmatraju se kao osnovni parametri toksičnog efekta. Oralni unos 5 ppm i 50 ppm Cd u trajanju od 30 dana nije uticao na promenu telesne mase kao ni na unos vode i hrane kod tretiranih pacova oba soja. Izostanak uticaja unosa Cd na promenu telesne mase je u saglasnosti sa studijama u kojima su mužjaci pacova bili oralno izloženi ovom metalu u dozama 5 i 50 ppm Cd (Brzoska i drugi, 2003b), odnosno 1, 3, 10 i 30 ppm Cd (Loeser i Lorke, 1977) u trajanju od 12 nedelja. Odsustvo promene mase tela, unosa vode, hrane kao i mase fecesa kod tretiranih u odnosu na kontrolne pacove oba soja ukazuje na izostanak efekta Cd na osnovne metaboličke parametre kod tretiranih pacova. Dodatno, nepromenjena masa fecesa kod tretiranih pacova posredno može ukazati na izostanak uticaja oralno unetog Cd na kontraktilnost glatke muskulature creva. Premda je pokazano da toksičnost oralne primene Cd može biti povećana usled sposobnosti Cd da inhibira kontraktilnost muskulature creva (čime se produžava period izloženosti gastrointestinalnog epitela Cd) u slučaju akutne oralne primene Cd (Andersen i drugi, 1988b; Zhai i drugi, 2013),

moguće je da je efekat na kontraktilnost creva izostao u ovom radu usled produžene izloženosti metalu.

## 5.2. Deponovanje kadmijuma

Oralni unos Cd je doveo do povećanja akumulacije metala u krvi, plućima, slezini, MLČ, crevu, jetri i bubrezima DA i AO pacova, koje je bilo dozno zavisno u svim tkivima osim u krvi. Viši nivo Cd na 50 ppm u odnosu na 5 ppm mogao bi se objasniti dozno zavisnom apsorpcijom Cd koja je pokazana u režimu oralne primene za doze >10 mg/ kg (> 10 ppm) kod pacova (Goon i Klaassen, 1989). Izostanak razlika u koncentraciji Cd na nižoj i višoj dozi u slučaju krvi je zapažen najverovatnije zbog visoke devijacije unutar eksperimentalnih grupa. Koncentracija Cd u ispitivanim organima je bila sličnog nivoa kod tretiranih DA i AO pacova, osim u slučaju pluća. Razlike u nivou deponovanog Cd u plućima DA i AO pacova su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim ispitivanjem akutne *i.p.* primene Cd, gde su razlike u koncentracijama Cd u plućima tretiranih DA i AO pacova objašnjene različitim nivoima ekspresije MT, koji vezuju Cd, u tkivu pluća ova dva soja pacova (Demenesku i drugi, 2016).

## 5.3. Efekti oralnog unosa kadmijuma na jetru i bubrege

Poznato je da su jetra i bubrezi ciljni organi toksičnosti Cd (Nordberg, 2009) i najviši nivoi deponovanog Cd, u odnosu na ostale ispitivane organe, su nađeni u jetri i bubrezima DA i AO pacova. Povećani nivoi markera oštećenja jetre, transaminaza - ALT i AST, kod pacova oba soja tretiranih višom dozom Cd ukazuju na oštećenje ćelija jetre pošto je ALT enzim specifičan za ovaj organ i pretežno se nalazi u citosolu hepatocita a koncentracija AST je najviša u jetri u odnosu na druga tkiva (Kew, 2000). Povećanje nivoa ovih transaminaza u serumu tretiranih pacova u saglasnosti je sa rezultatima akutnog (Kuestar i drugi, 2001) i produženog (2 nedelje) *i.p.* tretmana Cd (El-Maraghy i drugi, 2001) kao i oralnog hroničnog tretmana pacova ovim metalom (Brzoska i drugi, 2003a). Sa druge strane, oralni tretman Cd nije uticao na strukturu ovog organa kod DA i AO pacova, sudeći po normalnoj histološkoj slici. Izostanak nefrotoksičnog efekta Cd je u saglasnosti sa rezultatima akutne (Demenesku i drugi, 2016) i produžene (2 nedelje) (El-Maraghy i drugi, 2001) *i.p.* administracije Cd kao i oralnog hroničnog tretmana pacova (Brzoska i drugi, 2003a). Činjenica da tretman Cd dovodi do oštećenja jetre bez efekta na bubrege u ovom radu i navedenim studijama, objašnjena je

prvenstvenim oštećenjem tkiva jetre od strane Cd, do koga dolazi pre oštećenja tkiva bubrega (Dudley i drugi, 1985). Tokom dužeg vremenskog perioda izloženosti Cd, kompleks Cd-MT se iz jetre transportuje do bubrega (Chan i drugi, 1993) gde ostvaruje nefrotoksičan efekat (Dudley i drugi, 1985). Brzoska i drugi (2003b) ukazali su na pojavu oštećenja epitelnih ćelija tubula bubrega pacova tek nakon 12 nedelja oralnog tretmana sa 5 ppm Cd dok je tretman dozom od 50 ppm ispoljio nefrotoksične efekte u vidu oštećenja epitela tubula i fragmentacije ćelija nakon 6 nedelja tretmana.

Povećanje nivoa ketona u urinu tretiranih pacova oba soja ukazuje na metaboličke poremećaje kao što je dijabetes (Laffel, 1999) što je u saglasnosti sa pretpostavkom da je Cd faktor rizika koji doprinosi razvoju dijabetesa kod izloženih ljudi i životinja (Edwards i Prozialeck, 2009). Moguće je da bi u osnovi metaboličkog poremećaja bio efekat Cd na redukciju raspoloživih rezervi ugljenih hidrata kod tretiranih DA i AO pacova što, kao i u slučaju gladovanja, dovodi do nekompletne oksidacije masnih kiselina u mitohondrijama i produkcije ketonskih tela koja se koriste kao alternativni izvor energije (Gilbert i drugi, 2000).

#### **5.4. Efekat oralnog unosa kadmijuma na crevo**

Unos obe doze Cd doveo je do značajnog deponovanja metala u crevu (duodenum) koji je doveo do oštećenja tkiva creva i inflamacije kod oba soja pacova. Naime, dozno-zavisno oštećenje tkiva creva je pokazano histopatološki kod tretiranih DA i AO pacova i u saglasnosti je sa podacima dobijenim ispitivanjem efekata akutnog oralnog tretmana Cd na crevo kod miševa gde su opisani skraćeni i zadebljali vilusi, apoptoza i nekroza ćelija vilusa (pretežno u apikalnom regionu) kao najčešći histopatološki nalaz (Andersen i drugi, 1988a,b; Valberg i drugi 1977; Zhao i drugi, 2006). Deponovanjem Cd u enterocitima se smanjuje količina Cd koja bi dospela u sistemska cirkulaciju i ostale organe ali u trenutku kada se prevaziđe kapacitet enterocita da skladište Cd dolazi do njihove nekroze i oslobađanja unutarćelijskog sadržaja sa Cd koji oštećuje susedne ćelije i/ili ulazi u cirkulaciju (Zalups i Ahmad, 2003). Poznato je da Cd može da indukuje nekrozu, bilo direktno (Lopez i drugi, 2003) ili indirektno, remećenjem kadherinskih veza između epitelnih ćelija interakcijom sa vezujućim mestima za kalcijum na molekulima kadherina čime dovodi do remećenja njihove konformacije, raskidanja međućelijskih veza i razdvajanja ćelija (Prozialeck, 2000). Iako nije bilo razlika u deponovanju Cd u crevima tretiranih DA i AO pacova, histopatološka analiza je ukazala na izraženija oštećenja tkiva kod DA u odnosu na AO pacove, kao i na intenzivniji

infiltrat mononuklearnih leukocita u *lamina propria*-u kod tretiranih DA pacova, čije bi agresivne efektorske aktivnosti mogle biti odgovorne za izraženije oštećenje tkiva kod ovog soja (Sherwood i Toliver-Kinsky, 2004). Osim histopatološkog nalaza, na odsustvo promena u infiltraciji neutrofilnih leukocita u crevu tretiranih pacova oba soja ukazuje i nepromenjena aktivnost MPO u homogenatima creva, koja je marker infiltracije neutrofilnih granulocita u tkiva (Werner i Szelenyi, 1992) što je u saglasnosti sa izostankom efekta oralnog hroničnog tretmana Cd na aktivnost MPO u crevu miševa (Breton i drugi, 2013a). Neutrofili su među prvim ćelijama imunskog sistema koje odgovaraju na inflamaciju i regrutuju se na mestu povrede/infekcije (Martin i Leibovich, 2005) pa je u slučaju akutne oralne izloženosti Cd ćelijski infiltrat bogat neutrofilnim granulocitima čest nalaz (Zhao i drugi, 2006) dok bi infiltrati bogati mononuklearnim leukocitima mogli biti karakteristični za hronični režim izloženosti Cd što je pokazano i u tkivu jetre i bubrega pacova koji su bili oralno tretirani Cd 12 nedelja (Brzoska i drugi, 2003a). Povećan broj vakuola nalik peharastim ćelijama i prisustvo plazma ćelija u infiltratima leukocita u crevu DA pacova tretiranih višom dozom Cd, može predstavljati pokušaj domaćina da povрати narušenu homeostazu usled oštećenja crevne barijere, koja je neophodna za održavanje imunske homeostaze u crevu (Artis, 2008).

Oralni tretman kadmijumom doveo je do oksidativnog stresa u crevu pacova, u vidu diferencijalnog efekta na aktivnost SOD i CAT, osnovne enzime antioksidativne odbrane, kao i promene koncentracije MDA. Kadmijum koji je deponovan u enterocitama postepeno oštećuje ćelijske organele, prevashodno mitohondrije i cisterne endoplazmatskog retikuluma i zajedno sa Cd koji je prisutan u vanćelijskoj sredini dovodi do oksidativnog stresa (Cigankova i drugi, 2010) koji može dovesti do oštećenje tkiva creva. Po jednom od predloženih mehanizama kojim Cd dovodi do oštećenja tkiva, produkcija ROS u odgovoru na Cd dovodi do aktivacije signalnih puteva kao što su MAP (engl., Mitogen-Activated Protein) kinaze i mTOR (engl., mammalian Target Of Rapamycin) koji imaju bitnu ulogu u indukciji ćelijske smrti (Chen i drugi, 2008; Xu i drugi, 2015). Promena aktivnosti i SOD i CAT u crevu DA pacova (u poređenju sa AO pacovima kod kojih je samo SOD aktivnost promenjena) može biti u vezi sa naglašenijim pokušajem tkiva ovog soja da ukloni ROS i ograniči tkivno oštećenje. Pad u aktivnosti SOD (što se najčešće smatra potrošnjom enzima) kod DA u poređenju sa povećanom aktivnošću kod AO pacova podržava ovo zapažanje. Takođe, inhibicija SOD kod tretiranih DA pacova može biti posledica interakcije između Cd i bioelemenata kao što su cink (Zn), bakar (Cu) i mangan (Mn) koji su prisutni u aktivnom centru SOD, kao i direktnog delovanja Cd na konformaciju ovih izoformi proteina (Matović i drugi, 2012). Niži bazalni nivoi SOD i CAT kod AO u poređenju sa DA pacovima su možda

uticali na diferencijalni odgovor enzima na Cd. Iako Cd može da dovede do povećane aktivnosti i SOD i CAT u eritrocitima (Kostic i drugi, 1993) i srcu (Zikic i drugi, 1998) kao što je pokazano kod pacova tretiranih oralno Cd u trajanju od 30 dana, diferencijalni efekat Cd na enzime antioksidativne odbrane pokazan je i u slučaju akutne primene Cd kada je zabeležena inhibicija ekspresije gena za SOD i CAT u jetri miševa (Liu i drugi, 2002) a inhibitorski efekti Cd na aktivnost ovih enzima pokazani su i u jetri, bubrezima, testisima i mozgu pacova tretiranih *i.p.* tokom 30 (Hussain i drugi, 1987) odnosno 45 dana (Shukla i drugi, 1989).

Pored promena u aktivnosti enzima CAT i SOD, kod oba soja su zapažene i promene u nivou MDA, jednog od produkata lipidne peroksidacije. Povećan nivo SOD i nepromenjen nivo CAT kod tretiranih AO pacova, uz povećane nivoe MDA je u saglasnosti sa studijama koje su prijavile visoke nivoe lipidnih peroksida, povećanu aktivnost SOD (Zikic i drugi, 1998) i nepromenjenju aktivnost CAT (Sarkar i drugi, 1994) u tkivima pacova tretiranih Cd. Smanjeni nivo MDA u homogenatima duodenuma tretiranih DA pacova je u saglasnosti sa studijama na miševima oralno tretiranih Cd 7 i 14 dana (Djukic-Cosic i drugi, 2008) i pacovima *i.p.* tretiranih Cd 10 dana (Boujelben i drugi, 2006) gde je pad nivoa MDA u jetri najverovatnije rezultat aktivacije mehanizama antioksidativne zaštite premda je akutni tretman Cd u obe studije doveo do porasta nivoa MDA u jetri tretiranih životinja. Smatra se da povećan nivo ROS dovodi do peroksidacije lipida u membrani ćelija (Hussain i drugi, 1987; Shukla i drugi, 1989; El-Boshy i drugi, 2015). Lipidna peroksidacija dovodi do narušavanja strukture i funkcije ćelijskih membrana i dodatno, lipidni peroksidi mogu oštetiti susedne ćelije. MDA koji interaguje sa amino grupama proteina, čime se menjaju njihove biološke osobine i formiraju se imunogeni, MDA-modifikovani proteinski adukti (Dalle-Donne i drugi, 2006).

Oralni tretman Cd je uticao na aktivnost još jednog enzima antioksidativne odbrane, GST, koji ima ulogu u vezivanju elektrofilnih ksenobiotika za GSH. Povećana aktivnost GST i smanjena koncentracija GSH u homogenatu duodenuma AO pacova tretiranih višom dozom Cd kao i DA pacova tretiranih nižom i višom dozom, ukazuje na pokušaj da se vezivanjem Cd za GSH umanjí štetni efekat jona Cd, koji bi zatim mogli da se eliminišu u vidu Cd-GSH kompleksa iz ćelija pomoću membranskih pumpi (Stajin i drugi, 1997; Veal i drugi, 2002). Smanjenje nivoa GSH u homogenatima duodenuma AO pacova tretiranih višom dozom Cd kao i DA pacova tretiranih sa obe doze Cd u saglasnosti je sa rezultatima dobijenim *i.p.* tretmanom pacova Cd u trajanju od 3 meseca, gde su takođe zabeleženi smanjeni nivoi GSH u tkivu jetre i bubrega (Nigam i drugi, 1999). Oprečni podaci su zabeleženi u slučaju *i.p.*

tretmana Cd tokom 2 nedelje, kada su izmereni povećani nivoi GSH u jetri i bubrezima pacova (El-Maraghy i drugi, 2001). Ova razlika u promeni nivoa GSH se može objasniti ispitivanjem efekata Cd u dva različita tkiva (jetra i crevo), razlikom u putu administracije Cd (*i.p.* i oralna primena) ili u trajanju izloženosti metalu (2 nedelje i 30 dana) (Matović i drugi, 2011). Povećana aktivnost GST i smanjen nivo GSH u odgovoru na tretman nižom dozom Cd kod DA pacova možda ukazuje na povećanu osetljivost ovog soja na metal, pošto je promena zabeležena samo u slučaju tretmana višom dozom Cd kod AO pacova. Dodatno, generalno viši nivoi GST i niži nivoi GSH kod DA u odnosu na AO pacove mogu biti u osnovi zabeleženih sojnih razlika u aktivnosti ovog antioksidativnog sistema nakon tretmana Cd. Naime, efekti Cd na nivo GSH u tkivu zavise i od korišćene životinjske vrste / soja (Matović i drugi, 2011).

Povećanje nivoa HMGB1, inflamatornog medijatora, verovatno je posledica izražene nekroze u crevu DA pacova tretiranih višom dozom Cd (Chen i drugi, 2004; Scaffidi i drugi, 2002) jer se ovaj molekul pasivno oslobađa iz ćelija u slučaju njihove nekroze (Scaffidi i drugi, 2002). Izraženiji infiltrat ćelija u tkivo creva kod DA soja takođe može doprineti povećanom nivou ovog molekula, s obzirom da HMGB1 takođe sekretuju aktivisane imunske ćelije kao što su monociti, makrofagi, DC (Wang i drugi, 1999a; Lotze i Tracey, 2005) i T limfociti (Zhang i drugi, 2016). Nepromenjen nivo HMGB1 molekula u homogenatima duodenuma AO pacova bi se mogao objasniti manje intenzivnim nekrotskim promenama tkiva creva kao i manje izraženom infiltracijom mononuklearnih ćelija (koje bi produkovale HMGB1) u *lamina propria*-u kod ovog soja pacova u odnosu na DA pacove.

Povećana koncentracija proinflamatornog citokina TNF u homogenatima duodenuma tretiranih DA i AO pacova u saglasnosti je sa rezultatima dobijenim na miševima tretiranih sa 20 ppm i 100 ppm CdCl<sub>2</sub> u toku 3 nedelje (Liu i drugi, 2014). Povećana koncentracija TNF u crevu DA i AO pacova može biti posledica direktnog delovanja Cd na epitelne ćelije jer je pokazano da direktno izlaganje humane linije epitelnih ćelija karcinoma pluća (A549) dovodi do produkcije ovog citokina (Kundu i drugi, 2011). Osim TNF, kod DA pacova je prisutno i povećanje nivoa IL-1 $\beta$  čime je jasno oslikan urođeni proinflamatorni citokinski odgovor na unos Cd kod ovog soja. Nekroza epitelnih ćelija može biti odgovorna za povećanje nivoa IL-1 $\beta$  i TNF jer se ovi citokini sintetišu tokom inflamatornog odgovora na molekulske obrasce oštećenja (DAMPs) koji se oslobađaju prilikom nekroze ćelija (Chen i Nunez, 2010). Pošto su aktivisani makrofagi primarni izvor TNF i IL-1 $\beta$  (Jovanovic i drugi, 1998), a pokazano je da izlaganje makrofaga HMGB1 dovodi do produkcije ovih i drugih proinflamatornih citokina (Andersson i drugi, 2000) moguće je da je povećan nivo HMGB1 molekula kod DA



pacova na 50 ppm u vezi sa povećanom koncentracijom TNF i IL-1 $\beta$ , a povećanje ovih citokina bi dalje moglo da stimuliše makrofage da produkuju HMGB1 i takva pozitivna kontrola bi vodila intenzivnijem inflamatornom odgovoru kod ovog soja pacova (Wang i drugi, 1999a; 1999b). Niži nivo produkcije IL-1 $\beta$  na 50 ppm Cd može biti u vezi sa supresivnim efektima viših koncentracija Cd na produkciju citokina na koje je ukazano u *in vitro* studijama (Theocharis i drugi, 1994; Marth i drugi, 2001). Povećan nivo proinflamatornih citokina IFN- $\gamma$  i IL-17 u homogenatima duodenima DA pacova takođe ukazuje na inflamaciju (Mowat, 2003; Sarra i drugi, 2010; Yen i drugi, 2006) što je u saglasnosti sa poznatom ulogom ovih citokina u patologiji inflamatornih bolesti creva (engl., Inflammatory Bowel Diseases/IBD) (Strober i Fuss, 2011). Moguće je da infiltrirani leukociti, zapaženi u *lamina propria*-i DA pacova, produkuju IFN- $\gamma$  i IL-17 koji bi zatim mogli da indukuju brojne aktivnosti leukocita, epitelnih i endotelnih ćelija (kao što su produkcija proinflamatornih citokina, hemokina i metaloproteinaza) čime bi se uvećavao inflamatorni proces i oštećenje tkiva (Jovanovic i drugi, 1998; Weaver i drugi, 2007). Tako, u crevu DA pacova, povećane koncentracije IL-17 mogle bi da imaju pozitivan efekat na produkciju TNF i IL-1  $\beta$  pošto je pokazano da IL-17 stimuliše produkciju ovih citokina (Jovanovic i drugi, 1998). Dodatno, poznato je da oksidativni stres kao i stimulacija makrofaga (Jiang i Pisetsky, 2006; Rendon-Mitchell i drugi, 2003; Tang i drugi, 2007) i enterocita (Sappington i drugi, 2002) sa IFN- $\gamma$ , TNF i IL-1 $\beta$  dovodi do povećane sekrecije HMGB1 molekula čime se naglašava veza između ovog inflamatornog medijatora i proinflamatornih citokina u crevu DA pacova. Izostanak doзно zavisnog proinflamatornog citokinskog odgovora kod DA pacova dalje upućuje na supresivni efekat više doze Cd.

Povećana koncentracija anti-inflamatornog citokina IL-10 u homogenatu duodenuma tretiranih AO pacova može biti odgovorna za odsustvo inflamatornog odgovora, izuzev TNF, kod ovog soja pacova jer je poznato da IL-10 igra bitnu ulogu u regulaciji mukozne imunosti (Berg i drugi, 1996; Kuhn i drugi, 1993) i inhibira produkciju proinflamatornih citokina (D'andrea i drugi, 1993; Fiorentino i drugi, 1991). Izostanak inhibitornog efekta IL-10 na koncentraciju TNF kod AO pacova je u saglasnosti sa ispitivanjem pacijenata obolelih od IBD u kome je povećani nivo IL-10 bio nedovoljan za inhibiciju produkcije proinflamatornih citokina, TNF, IL-6 i IL-8, od strane makrofaga (Szkaradkiewicz i drugi, 2009). Viši bazalni nivo TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17 i IL-10 u homogenatima creva DA u poređenju sa AO pacovima je u saglasnosti sa podacima koji su ukazali na razlike između ova dva soja pacova u odgovoru koji je posredovan citokinima nakon primene različitih imunskih stimulusa (Markovic i drugi,

2009; Miljkovic i drugi, 2006) i možda doprinosi izraženijem odgovoru na Cd kod DA pacova.

Imunska homeostaza u crevu se odžava u velikoj meri aktivnošću komensalnih mikroba koji su pod direktnim uticajem Cd nakon njegovog oralnog unosa (Fazeli i drugi, 2011). Poznato je da je rod *Lactobacillus*, jedan od osnovnih grupa komensalnih bakterija u crevu glodara (Kawai i Suegara, 1977; Molin i drugi 1992) i čoveka (Molin i drugi 1993), odgovoran za imunsku homeostazu u crevu (Bron i drugi, 2012; Mane i drugi, 2009). Za smanjenje zastupljenosti laktobacila koje je zabeleženo kod DA pacova nakon primene više doze Cd, može biti delimično odgovorna i infiltracija leukocita kod tretiranih DA pacova. Dodatno, intestinalna disbioza laktobacila kod DA pacova bi mogla dovesti do proinflatornog citokinskog odgovora što je u saglasnosti sa redukcijom probiotskih bakterija i povećanim nivoom TNF u homogenatu tkiva debelog creva miševa koji su oralno tretirani Cd 3 nedelje (Liu i drugi, 2014). Relativno očuvanje diverziteta laktobacila kod AO pacova, uz značajan porast zastupljenosti *L. johnsonii*, soja koji je u vezi sa obnovom oštećene crevne barijere (Chiva i drugi, 2002; Valladares i drugi, 2010), kao i povećane zastupljenosti *L. murinus*, soja koji (slično kao *L. johnsonii*) ima anti-toksični bakterijski potencijal (Perelmuter i drugi, 2008), možda su doprineli izostanku lokalnog inflamatornog citokinskog odgovora kod ovog soja pacova. Stanisavljevic i drugi (2016) su potvrdili povećanu zastupljenost *L. johnsonii* u fiziološkim uslovima kod AO u odnosu na DA pacove i ukazali na prisustvo bakterija roda *Turicibacter*, za koje se pretpostavlja da imaju anti-inflamatornu funkciju, isključivo kod AO pacova.

### **5.5. Efekti oralnog unosa kadmijuma na mezenterične limfne čvorove**

Oralni unos Cd je doveo do deponovanja sličnih nivoa metala i do diferencijalne indukcije imunskih odgovora u MLČ DA i AO pacova. Do akumulacije Cd u MLČ može doći njegovim kretanjem iz lumena creva preko mezenterične venske cirkulacije (Goon i Klaassen, 1989). Povećanje relativne mase i celularnosti MLČ, kod oba soja pacova, može biti rezultat dopremanja ćelija putem limfe i / ili migracije ćelija u MLČ (Mowat, 2003). Povećanje mase MLČ je u suprotnosti sa studijom u kojoj Cd nije imao efekta na MLČ (Yamada i drugi, 1981), verovatno zbog akutne (jednokratna *i.p.* doza) primene Cd u toj studiji. Veći stepen povećanja mase MLČ kod tretiranih DA, u poređenju sa tretiranim AO pacovima, ukazuje na veću podložnost DA pacova efektima Cd. Povećana zastupljenost CD8<sup>+</sup> ćelija kod oba soja pacova, u saglasnosti je sa studijom koja je pokazala pozitivan



efekat oralnog hroničnog tretmana (30 dana) Cd na broj CD8<sup>+</sup> ćelija u slezini pacova (Lafuente i drugi, 2003a), i moguće je da doprinosi (bar na 50 ppm Cd) povećanju celularnosti MLČ.

Tretman Cd nije uticao na vijabilnost ćelija MLČ kod DA i AO pacova što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim ispitivanjem *in vitro* efekta Cd (5, 10 i 20  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>, 72 i 96 h) na vijabilnost trofoblasta izolovanih iz humane placente (Jolibois i drugi, 1999). U drugim studijama je ukazano na negativni efekat Cd na vijabilnost ćelija, *in vitro*, na primarnoj kulturi hepatocita izolovanih iz jetre netretiranih pacova (Bell i drugi, 1991) i na ćelijskoj liniji humanih T limfocita CEM-C12 (El Azzouzi i drugi, 1994) i *in vivo* (akutni, *i.p.* tretman) u jetri miševa (Habeebu i drugi, 1998) i testisima pacova (Xu i drugi, 1996). Razlike u efektu Cd na vijabilnost ćelija mogu se objasniti zavisnošću od primenjene doze Cd, perioda izloženosti i vrste ispitivanog tkiva (Hamada i drugi, 1997).

Povećan proliferativni odgovor ćelija MLČ na oralni tretman Cd kod DA pacova može takođe biti uzrok povećanog broja ćelija u MLČ ovog soja. Povećanje celularnosti i nestimulisane proliferativne aktivnosti ćelija MLČ DA pacova mogu biti posledica stimulacije ćelija MLČ ćelijskim ostacima oštećenog tkiva creva i luminalnim antigenima koji su dospeli u region MLČ aferentnom limfom (Mowat i Agace, 2014), a manji stepen oštećenja tkiva creva kod AO pacova bi mogao objasniti nepromenjenu proliferativnu aktivnost ćelija MLČ ovog soja. Izostanak efekta Cd na proliferativni odgovor ćelija MLČ kod AO pacova, u poređenju sa stimulacijom proliferacije ćelija MLČ DA pacova, upućuje na postojanje sojnih razlika u ovom aspektu imunskog odgovora na metal, što je u saglasnosti sa razlikama u proliferativnom odgovoru ćelija izolovanih iz slezine C3H/He, BALB/c i DBA/2 miševa tretiranih *s.c.* kadmijumom 5 dana (Ohsawa i drugi, 1986).

Povećanje unutarćelijskog GSH i iRNK za obe forme metalotioneina u ćelijama MLČ tretiranih DA pacova odražava odgovor na stres izazvan Cd. Povećanje ekspresije iRNK za metalotioneine (MT) bi moglo biti u vezi sa zadržavanjem Cd u tkivu (Klaassen i drugi, 2009) jer je poznato da oni efikasno vezuju unutarćelijski Cd i tako doprinose procesu detoksikacije ćelije (Nordberg i Nordberg, 2000) dok se ne prevaziđe kapacitet vezivanja metala od strane MT, što rezultuje porastom koncentracija slobodnih jona Cd u ćeliji (Zalups i Ahmad, 2003). Sa ciljem uspostavljanja ponovne homeostaze u imunskom odgovoru na Cd u MLČ i crevu, povećani nivoi MT kod DA pacova mogu biti u vezi i sa imunoregulatornom funkcijom ovih proteina, za koje je pokazano da indukuju diferencijaciju regulatornih T limfocita u slučaju inflamatornih bolesti creva (Waeytens i drugi, 2009). Odsustvo promena u

ekspresiji iRNK za MT kod tretiranih AO pacova je u saglasnosti sa slabijom podložnošću ovih pacova na indukciju odgovora MT u jetri tokom imunske stimulacije emulzijom homogenata mozga govečeta u kompletnom Freund-ovom adjuvansu, u poređenju sa DA pacovima (Grubic-Kezele i drugi, 2013). Međutim koncentracija MT nije odlučujući faktor u podložnosti toksičnim efektima Cd na šta ukazuje i podatak da kod miševa sa povećanom ekspresijom gena za MT (MT transgen) nije uočena povećana otpornost prema testikularnoj toksičnosti kadmijuma, uprkos povećanoj koncentraciji MT u tkivu (Dalton i drugi, 1996). Dodatno, kod miševa C57 soja, koji su rezistentni na testikularnu toksičnost Cd zabeleženi su niski nivoi MT, niži u poređenju sa miševima soja osetljivog na testikularnu toksičnost kadmijuma (Liu i drugi, 2001).

Povećana koncentracija GSH u ćelijama MLC kod DA pacova je u saglasnosti sa podacima koji su ukazali da hronična izloženost pacova kadmijumu vodi povećanju nivoa GSH u jetri i bubrezima (Mendieta-Wejebe i drugi, 2013; Shaikh i drugi, 1999) gde GSH (Rana i Verma, 1996) ili njegov prekursor N-acetil cistein (Kaplan i drugi, 2008; Wang i drugi, 2009) verovatno imaju zaštitnu ulogu. Povećani nivoi GSH kod DA pacova mogu imati ulogu u regulaciji odgovora ćelija imunskog sistema, kao što je pokazano u slučaju inflamacije pluća gde povećana koncentracija unutarćelijskog GSH ograničava aktivaciju transkripcionog faktora NF-kB (Rahman i MacNee, 2000) koji je odgovoran za ekspresiju mnogih proinflamatornih gena među kojima su TNF i IL-1 $\beta$  (Rahman i MacNee, 1998). Izostanak efekta Cd na nivo GSH u ćelijama MLC AO pacova dodatno ukazuje na slabiju osetljivost ćelija MLC ovog soja prema toksičnosti kadmijuma.

Nepromenjen broj granulocita (HIS48<sup>+</sup> ćelije) u MLC kod oba ispitivana soja pacova, nakon 30 dana oralnog tretmana Cd (subhronični režim), može se objasniti činjenicom da su granulociti prevashodno ćelije akutnog inflamatornog odgovora (Sherwood i Toliver-Kinsky, 2004). Dalja fenotipska analiza ćelija urođene imunosti u MLC ukazala je na povećanu zastupljenost klasično aktivisanih makrofaga (CD68<sup>+</sup> ćelija) koji mogu biti odgovorni za razvoj inflamatornog odgovora kod tretiranih DA pacova. Na inflamatorni potencijal ovih ćelija upućuju studije u kojima je pronađen povećan broj CD68<sup>+</sup> ćelija u MLC pacijenata obolelih od malignog limfoma (Bjerke i drugi, 1993) i u uzorcima tkiva perivaskularne mukoze pacijenata obolelih od inflamatornih bolesti creva (Rutgveit i drugi, 1994). Dodatno, kod miševa je pokazan potencijal CD68<sup>+</sup> ćelija da indukuju Th1 odgovor (Mills i drugi, 2000). Zastupljenost alternativno aktivisanih makrofaga (CD 163<sup>+</sup> ćelija), koji imaju bitnu ulogu u završnoj fazi inflamacije kao i tokom procesa zarastanja rana (Gordon, 2003; Verschure i drugi, 1989), nije promenjena u MLC tretiranih DA i AO pacova što je u

saglasnosti sa odsustvom razlike u broju ovih ćelija u debelom crevu zdravih volontera i obolelih od inflamatornih bolesti creva (Braak i drugi, 2012). Povećanje broja NK ćelija u MLČ DA pacova ukazuje na moguću ulogu ovih ćelija u urođenom imunskom odgovoru na antigene poreklom od nekrotskih ćelija (Green i drugi, 2009) i na antigene mikroba (Bancroft, 1993) u slučaju oralne izloženosti kadmijumu. Tretman ovim metalom nije uticao na zastupljenost leukocita (makrofaga, granulocita i limfocita), u MLČ kod oba ispitivana soja pacova, koji eksprimiraju CD11b molekul ( $\beta 2$  integrin) koji ima ulogu u infiltraciji ovih ćelija iz cirkulacije u tkiva i stimulaciji njihovih fagocitnih funkcija (Abbas i drugi, 2014g; Babior, 2000; Fantone i Ward, 1982). Prvi korak u infiltraciji leukocita koji se vrši pomoću selektina, je njihovo "kotrljanje" duž vaskularnog endotela. Nakon uspostavljanja slabih veza između ćelija endotela i leukocita, dolazi do čvrste adhezije ovih ćelija koja je posredovana integrinima (Mousa, 2004). Moguće je da efekat Cd na ekspresiju CD11b molekula zavisi od perioda izloženosti metalu pošto je pokazano da *in vitro* tretman ćelijske linije humanog limfoma U-937 kadmijumom dovodi do indukcije ekspresije CD11b molekula tokom 48h, čemu sledi pad ekspresije ovog integrina (Vilaboa i drugi, 1997).

Iako promena broja granulocita nije zapažena, njihova aktivnost je povećana kod DA pacova tretiranih višom dozom Cd na šta ukazuje povećana aktivnost enzima karakterističnog za ove leukocite, MPO, koji osim mikrobicidne uloge doprinosi i odlaganju apoptoze neutrofila i time doprinosi produženom trajanju inflamacije (El Kebir i drugi, 2008). Povećana oksidativna aktivnost ćelija MLČ DA pacova tretiranih višom dozom Cd, u vidu produkcije NO u odgovoru na LPS, može se pripisati CD68<sup>+</sup> ćelijama koje su osnovni nosioci ove aktivnosti, a čiji broj je povećan kod DA soja (Mills i drugi, 2000). Takođe, pokazano je da NO posreduje u oslobađanju Cd *in vitro* i *in vivo* tako što interaguje sa tiolnim grupama MT čime se Cd koji je vezan za MT oslobađa iz MT-Cd kompleksa i dovodi do oštećenja ćelija (Katakai i drugi, 2001; Misra i drugi, 1996) pa bi i ovaj mehanizam mogao da doprinese povećanoj osetljivosti DA pacova na tretman Cd. Uzrok povećane aktivnosti MPO i produkcije NO kod DA pacova tretiranih višom dozom Cd može biti veći stepen oštećenja creva, u odnosu na tretirane AO pacove (kod kojih tretman Cd nije uticao na aktivnost MPO i produkciju NO) i stimulacija produktima nekrotskog tkiva iz creva kao i stimulacije antigenima mikrobijalne flore kojoj je omogućen prelaz preko oštećene epitelne barijere do MLČ koji su mesta indukcije imunskog odgovora (Mowat, 2003).

Povećanje oksidacije DHR i redukcije NBT od strane ćelija MLČ tretiranih pacova oba soja, ukazuje na povećanu produkciju ROS u ovim ćelijama. Prisustvo superoksidnog anjona u ćelijama se primarno detektuje NBT testom dok se za detekciju vodonik peroksida unutar

ćelija prevashodno koristi DHR test (Roos i Boer, 2014). Povećane efektorske aktivnosti ćelija urođene imunosti, kao što je produkcija ROS, mogu biti posledica delovanja samog metala na ove ćelije jer je poznat pozitivan efekat Cd na fagocite koje imaju najveći kapacitet produkcije ROS u odnosu na druge ćelije urođene imunosti (Amoruso i drugi, 1982; Hernandez i Macia, 1996; Zhong i drugi, 1990). Sa druge strane, osim profesionalnih fagocita, i druge ćelije među kojima su ćelije pankreasa, ćelije mukoze pluća, ćelije epitela creva (Wu i drugi, 2013) i limfociti (Remans i drugi, 2005) mogu da proizvode ROS u odgovoru na proinflamatorne stimuluse. Povećana produkcija ROS od strane ćelija MLC<sup>+</sup> tretiranih pacova oba soja (povećana zastupljenost DHR<sup>+</sup> ćelija i povećana NBT redukcija) u saglasnosti je sa poznatim efektom Cd na remećenje funkcija mitohondrija koje dovodi do povećane produkcije ROS od strane ovih organela (Gobe i Crane, 2010). Veća zastupljenost DHR<sup>+</sup> ćelija MLC<sup>+</sup> kod kontrolnih AO pacova nakon stimulacije sa PMA u odnosu na DHR<sup>+</sup> ćelije kod kontrolnih DA pacova je najverovatniji uzrok povećane DHR oksidacije kod tretiranih AO u odnosu na tretirane DA pacove.

Tretman Cd doveo je do diferencijalnog citokinskog odgovora ćelija MLC<sup>+</sup> DA pacova u vidu povećane produkcije i ekspresije proinflamatornih citokina IFN- $\gamma$ , IL-17 i IL-1 $\beta$ , i smanjene / nepromenjene produkcije i ekspresije anti-inflamatornog citokina IL-10 dok je kod AO pacova, generalno, izostao citokinski odgovor na oralnu administraciju Cd.

Povećana produkcija proinflamatornog citokina IL-1 $\beta$  od strane ćelija MLC<sup>+</sup> tretiranih DA pacova ukazuje na aktivnost inflamazoma NLRP3 (engl., NOD-like receptor protein 3) što je u saglasnosti sa *in vitro* studijom u kojoj je ukazano na potencijal Cd da aktivira ovaj multimolekulski kompleks koji ima bitnu ulogu u aktivaciji kaspaze-1 i sintezi zrelih formi IL-1 $\beta$  i IL-18 (Chen i drugi, 2016). Dodatno, osim samog Cd, ulogu u aktivaciji NLRP3 inflamazoma ima i oksidativni stres kao i produkti oštećenog tkiva i ćelija (DAMPs) (Biswas, 2016). Povećani nivoi iRNK za ovaj citokin je u skladu sa podacima o efektu kadmijuma na povećanje ekspresije gena za IL-1 $\beta$  kod HepG2 ćelija tretiranih Cd (Souza i drugi, 2004). Sa druge strane, akutni oralni tretman Cd nije uticao na ekspresiju gena za IL-1 $\beta$  u crevu miševa (Zhao i drugi, 2006). Pošto se makrofagi smatraju glavnim producentima IL-1 $\beta$  (Laskin i drugi, 2011), povećana ekspresija i produkcija ovog citokina može biti posledica povećane zastupljenosti CD68<sup>+</sup> makrofaga kod tretiranih DA pacova. Povećana produkcija ovog citokina zabeležena je nakon *in vitro* tretmana Cd alveolarnih makrofaga pluća pacova (Lag i drugi, 2010). Povećanje produkcije IL-1 $\beta$  pod delovanjem kadmijuma je od značaja za ekspresiju intestinalne inflamacije kod DA pacova. Osim osnovnih proinflamatornih funkcija u stimulaciji ekspresije adhezivnih molekula, produkciji hemokina

i citokina, IL-1 $\beta$  stimuliše i produkciju NO (Lichten i drugi, 2009) kao i ekspresiju MT (Kondo i drugi, 1994) *in vitro*. Moguće je da je povećana produkcija IL-1 $\beta$  dopinela povećanoj produkciji NO kao i ekspresiji MT kod tretiranih DA pacova. Manji stepen oštećenja tkiva creva kod AO pacova verovatno ograničava prolaz antigena / DAMPs iz lumena creva ka MLC $\checkmark$  gde bi mogli da aktiviraju inflamazom i produkciju IL-1 $\beta$ . Dodatno, izostanak povećanja broja CD68<sup>+</sup> makrofaga zajedno sa efektom samog Cd verovatno utiču na ekspresiju i produkciju (numerički pad produkcije) IL-1 $\beta$  od strane ćelija MLC $\checkmark$  AO pacova tretiranih višom dozom metala. Supresivni efekat Cd na gensku ekspresiju i produkciju IL-1 $\beta$  je pokazan na primarnoj kulturi ćelija pluća pacova i mononukleara periferne krvi čoveka (Lag i drugi, 2010; Theocharis i drugi, 1994). Ovaj supresivni efekat Cd na IL-1 $\beta$  je izostao u MLC $\checkmark$  DA pacova verovatno zbog inflamatorne sredine (možda usled većeg oštećenja creva) i veće osetljivosti ovog soja pacova na metal. Dodatno, kod AO pacova tretiranih sa 50 ppm Cd, inhibicija IL-1 $\beta$  možda leži u osnovi smanjene produkcije NO u odgovoru na LPS stimulaciju.

U fiziološkim uslovima, u MLC $\checkmark$  preovladava tolerogena sredina pošto je jedna od njihovih osnovnih funkcija uspostavljanje zaštitnog „zida” između ovog limfoidnog tkiva i ostatka imunskog sistema (MacPherson i Smith, 2006). Stoga, povećana produkcija IFN- $\gamma$  i IL-17 uz smanjenje IL-10 ukazuju na narušavanje homeostaze uspostavljanjem proinflamatorne, umesto imunski tolerogene sredine u MLC $\checkmark$  tretiranih DA pacova. Takođe, u saglasnosti sa podacima studije u kojoj je pokazano da do indukcije efektorskih T ćelija (koje proizvode IFN- $\gamma$  i IL-17) u Kronovoj bolesti dolazi u MLC $\checkmark$  (Sakuraba i drugi, 2009), ovo limfoidno tkivo se može posmatrati kao mesto nastanka efektorskih ćelija koje bi se zatim infiltrirale u crevo pacova koji su konzumirali Cd. Izostanak povećanja nestimulisane produkcije IL-17 na 50 ppm Cd i IL-10 na 5 ppm Cd kod DA pacova uprkos *ex vivo* povećanom nivou iRNK za IL-17 (na obe doze Cd) i IL-10 (na nižoj dozi) može biti posledica negativnog efekta Cd na stabilnost iRNK za citokine, kao što je pokazano ispitivanjem efekata Cd *in vitro* (Marth i drugi, 2001). Na značaj IFN- $\gamma$  i IL-17 u obrazovanju intestinalnog odgovora na oralni unos Cd kod DA pacova je ukazano i povećanim nivoima iRNK za subjediničice citokina IL-12 i IL-23, koji su potrebni za diferencijaciju ćelija koje proizvode IFN- $\gamma$  i IL-17, redom (Iwakura i Ishigame, 2006; Langrish i drugi, 2004). Tretman Cd nije imao uticaj na gensku ekspresiju i nestimulisanu produkciju IFN- $\gamma$ , IL-17 i IL-10 u MLC $\checkmark$  tretiranih AO pacova što ukazuje na sojne razlike u ovom tipu odgovora ćelija MLC $\checkmark$  na oralni unos Cd. Izostanak promena u produkciji IFN- $\gamma$  i IL-17 od strane ćelija MLC $\checkmark$  tretiranih

AO pacova može biti posledica odsustva efekta Cd na ekspresiju IL-12 i IL-23 kod ovog soja pacova, i samim tim diferencijaciju T limfocita Th/Tip1 i Th/Tip 17 koji proizvode IFN- $\gamma$  i IL-17, redom. Intenzivniji proinflammatory citokinski odgovor u MLČ na oralni tretman Cd kod DA pacova potvrđuje rezultate koji su pokazali više nivoa IFN- $\gamma$  i IL-17 u odgovoru na različite stimulanse kod ovog soja pacova (Markovic i drugi, 2009; Mirkov i drugi, 2015). Promene u MLČ DA pacova ukazuju da Cd remeti tolerogenu imunsku sredinu u crevu indukcijom i urođenog i stečenog imunskog odgovora za koje je pokazano da su neophodni i da se međusobno dopunjuju u održavanju imunske homeostaze creva (Slack i drugi, 2009). Veći stepen oštećenja i nekroze epitela creva kod tretiranih DA (u odnosu na AO pacove) mogu biti u osnovi stimulacije proinflammatory citokinskog odgovora u MLČ. Nekroza ćelija, takozvana imunološka ćelijska smrt, odlikuje se oslobađanjem produkata umirućih ćelija među kojima je HMGB1 jedan od najviše ispitivanih markera imunološke smrti ćelija (Green i drugi, 2009), i čije oslobađanje je povećano u crevu DA pacova. Produkti nekrotskih ćelija funkcionišu kao signali opasnosti (DAMPs) i stimulišu inflamatorni imunski odgovor (Green i drugi, 2009; Rock i Kono, 2008). Pokazano je da stimulacija T ćelija sa HMGB1 stimuliše produkciju citokina, proliferaciju, preživljavanje i Th1 polarizaciju ovih ćelija (Messmer i drugi, 2004).

Povećana procentualna zastupljenost inflamatornih ćelija kao i povećani nivoi aktivnosti unutarćelijske MPO, povećana produkcija NO zajedno sa povećanom produkcijom proinflammatory citokina, ukazuju na veću reakciju ćelija MLČ pacova DA soja, u odnosu na AO pacove, na oralni tretman Cd.

## **5.6. Sistemski efekti oralnog unosa kadmijuma**

Promene u broju i procentualnoj zastupljenosti leukocita, hematoloških parametara i aktivnosti enzima u perifernoj krvi mogu biti pouzdani pokazatelji toksičnosti neke supstance / tretmana (Guilhermino i drugi, 1998). Numeričko smanjenje broja limfocita i povećanje broja neutrofila kod DA pacova tretiranih višom dozom Cd u saglasnosti je sa drugim studijama u kojima je pokazano da akutni *i.p.* (Djokic i drugi, 2014) i oralni subhronični (El-Boshy i drugi, 2015) tretman Cd dovodi do smanjenog broja limfocita i povećanog broja neutrofila u perifernoj krvi pacova. Osim efekta na promenu broja limfocita i neutrofila, povećana koncentracija Cd u krvi (nakon apsorpcije iz creva) pacova tretiranih višom dozom metala, uticala je na povećanu zastupljenost eozinofila. Povećana procentualna zastupljenost eozinofila je u saglasnosti sa povećanom zastupljenošću ovih ćelija u slučajevima trovanja



teškim metalima kod ljudi (Fournier i drugi, 1988). Kako je poznata uloga pojedinih divalentnih jona metala (nikl, kobalt, bakar) u reakcijama preosetljivosti (Budinger i Hertl, 2000) u kojima su jedne od osnovnih efektorskih ćelija upravo eozinofili (Abbas i drugi, 2014h) moguće je da povećana zastupljenost eozinofila u perifernoj krvi tretiranih pacova upućuje na ulogu Cd u alergijskim reakcijama. Povećan broj eozinofila je uočen u perifernoj krvi pacijenata obolelih od IBD i doveden je u vezu sa atopijom kod ovih pacijenata (Lied, 2007). Tretman Cd nije uticao na promenu većine hematoloških parametara (RBC, Hg, HCT, unutarćelijski Hg i PLT) kod tretiranih pacova oba soja. Nepromenjene vrednosti za MCV, MCH i MCHC kod DA pacova su u saglasnosti sa drugim studijama (El-Boshy i drugi, 2015; El-Demerdash i drugi, 2004) dok smanjenje vrednosti MCH i MCHC kod AO pacova tretiranih višom dozom Cd (u odnosu na netretirane AO pacove) kao i anizocitoza kod DA pacova tretiranih nižom dozom Cd (u odnosu na netretirane DA pacove) možda predstavljaju rane pokazatelje anemije koja je jedna od karakterističnih posledica toksičnog dejstva Cd (El-Boshy i drugi, 2015; El-Demerdash i drugi, 2004; Kostic i drugi, 1993). Za razliku od navedenih studija, tretman Cd nije doveo do anemije kod tretiranih DA i AO pacova, najverovatnije zbog primene viših doza Cd u tim studijama kao i razlika u soju pacova korišćenih u ovim ispitivanjima (El-Boshy i drugi, 2015; El-Demerdash i drugi, 2004; Kostic i drugi, 1993). Povećanje MPV bez promena broja PLT kod DA soja mogu biti posledica povećane potrošnje ovih ćelija i pokušaja da se ravnoteža održi povećanjem njihove zapremine jer su veći trombociti metabolički i enzimski aktivniji od manjih trombocita (Corash i drugi, 1977). Diferencijalni efekat Cd na pojedine hematološke parametre kod DA i AO pacova upućuje na pretpostavku da efekat Cd zavisi i od ispitivanih parametara koji su različito pogođeni kod ova dva soja pacova.

U krvi Cd stimuliše produkciju ROS koji oštećuju eritrocite čime se gubi funkcija njihove ćelijske membrane (Sarkar i drugi, 1998). Smanjena aktivnost SOD kod DA pacova na 50 ppm Cd povećava osetljivost eritrocita prema oksidativnom stresu (Bartoli i drugi, 1992) i ukazuje na potrošnju enzima koja prevazilazi mogućnost njegove sinteze, što je u saglasnosti sa drugim studijama (Alghasham i drugi, 2013; El-Boshy i drugi, 2015). Povećana aktivnost SOD kod AO pacova na 50 ppm u saglasnosti je sa povećanom aktivnošću ovog enzima u eritrocitima pacova akutno tretiranih Cd (Ognjanovic i drugi, 2003) i ukazuje na veći antioksidativni potencijal kod ovog soja pacova. Smanjena aktivnost CAT kod tretiranih pacova oba soja u saglasnosti je sa drugim studijama oralne hronične primene Cd (Alghasham i drugi, 2013; El-Boshy i drugi, 2015) i verovatno predstavlja iscrpljivanje dostupnih količina funkcionalnog enzima koji ima glavnu funkciju u zaštiti

hemoglobina od peroksidacije (Halliwell i drugi, 2000). Pošto se u aktivnom mestu CAT nalazi Fe (Putnam i drugi, 2000), još jedan od mehanizma kojim bi se mogao objasniti inhibitorski efekat produžene izloženosti Cd na CAT je kompeticija Cd sa Fe za aktivno mesto ovog enzima (Waisberg i drugi, 2003). Oksidativnom stresu u vidu uticaja na aktivnosti enzima antioksidativne odbrane, SOD i CAT, u perifernoj krvi verovatno doprinose i eozinofili za koje je poznato da proizvode ROS u odgovoru na različite stimule (Sedgwick i drugi, 1988).

Infekcija, trauma tkiva, opekotine i inflamacija spadaju među patološka stanja u kojima dolazi do promena u koncentraciji proteina akutne faze u plazmi (Gabay i Kushner, 1999). Oralni tretman Cd nije uticao na nivo proteina akutne faze u perifernoj krvi tretiranih DA i AO pacova verovatno zbog izostanka efekta Cd na nivo proinflamatornih citokina u perifernoj krvi tretiranih životinja (TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ ) koji su potrebni za indukciju odgovora proteina akutne faze (Gabay i Kushner, 1999). Proteini akutne faze su definisani kao proteini čija se koncentracija u plazmi povećava (pozitivni proteini akutne faze) ili smanjuje (negativni proteini akutne faze) tokom inflamacije za najmanje 25 % u odnosu na referentne vrednosti zdravog organizma (Gabay i Kushner, 1999). Citokini koji učestvuju u inflamatornom odgovoru (kao što su TNF, IL-1 $\beta$  i IL-6) imaju bitnu ulogu u stimulaciji produkcije proteina akutne faze (Gabay i Kushner, 1999). Naime, nivoi proinflamatornih citokina TNF, IL-1 $\beta$  i IL-6 u plazmi kontrolnih i tretiranih životinja bili su ispod donjeg nivoa detekcije metode što može biti posledica nedovoljne osetljivosti metode ili nestabilnosti i protelize citokina. Takođe, moguće je i da TNF, IL-1 $\beta$  i IL-6 nisu prisutni u plazmi u merljivim koncentracijama u fiziološkom stanju. Nedetektibilni nivo ovih citokina je zapažen i u slučaju ispitivanja efekta fizičkog vežbanja na koncentraciju citokina u plazmi ljudi (Ullum i drugi, 1994). Dodatno, izostanak efekta povećanih koncentracija Cd u krvi na nivo TNF i supresivni efekat na IL-1 $\beta$  su pokazani u serumu radnika koji su bili hronično profesionalno izloženi Cd (Yucesoy i drugi, 1997).

Moguće je da su oštećenje tkiva jetre zajedno sa većim stepenom oštećenja tkiva creva i intestinalnom inflamacijom doprineli povećanoj koncentraciji HMGB1 molekula u serumu tretiranih DA pacova. Kao što je pokazano u slučaju oštećenja tkiva mozga (Liesz i drugi, 2015), moguće je da HMGB1 oslobođen iz nekroetskog tkiva prvenstveno aktivira periferne monocite i dendritične ćelije (DĆ) koje onda proizvode proinflamatorne citokine, što se dešava u akutnom režimu administracije Cd. Vremenom, ova aktivacija imunskog sistema dovodi do iscrpljivanja zrelih, funkcionalnih monocita i regrutacije nezrelih ćelija. Supresivni signali poreklom od nezrelih monocita (smanjena ekspresija MHC i kostimulatornih



molekula, smanjena produkcija proinflamatornih citokina) dovode do apoptoze neadekvatno aktivisanih limfocita (Liesz i drugi, 2015). Hiporesponsivnost monocita i makrofaga na endotoksine ili produkte bakterija je opisana nakon jakih inflamatornih reakcija kao što su sepsa ili sterilni inflamatorni odgovor (Randow i drugi, 1995; Haupt i drugi, 1998; Cavaillon i drugi, 2005). Moguće je da u slučaju oralne hronične primene Cd, kod tretiranih DA pacova, povećana koncentracija HMGB1 molekula u krvi utiče na nepromenjeni citokinski odgovor (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6) dok izostanak inflamatornog odgovora u plazmi AO pacova ukazuje na veću otpornost na tretman Cd i na sistemskom nivou kod ovog soja pacova.

### **5.7. Efekti oralnog unosa kadmijuma na slezinu**

Kadmijum je nakon apsorpcije iz creva transportovan i do slezine, perifernog limfnog organa koji je često ispitan u različitim aspektima imunotoksičnosti Cd (Dan i drugi, 2000; Demenesku i drugi, 2014, 2016; Pathak i Khandelwal, 2007; Ohsawa i drugi, 1986). Histopatološka analiza je ukazala na zone krvarenja u tkivu slezine pacova oba soja tretiranih višom dozom metala (izraženije kod DA pacova) što je u saglasnosti sa poznatim efektom Cd na remećenje integriteta endotelne barijere i posledičnog edema i krvarenja u različitim tkivima (Prozialeck i drugi, 2008). Fokalne zone krvarenja su zabeležene i u slezini zamorčeta tretiranih oralno kadmijumom tokom 9 nedelja (Randa i drugi, 2012). Odsustvo povećanja mase i celularnosti slezine kod tretiranih pacova oba soja mogu biti posledica efekta Cd na supresiju proliferacije ćelija slezine, a dodatno u slučaju DA pacova, i padu vijabilnosti ćelija, što su poznati efekti akutnog tretmana Cd na ćelije slezine (DeGagné i drugi, 2006; Feng i drugi, 2001; Pathak i Khandelwal, 2007; Demenesku i drugi, 2014). Veći procenat apoptotskih ćelija kod tretiranih DA pacova u saglasnosti je sa podacima koji su ukazali na podložnost ćelija slezine ovog soja apoptozi u režimu akutne primene Cd (Demenesku i drugi, 2014) i može predstavljati zaštitni mehanizam kojim organizam pokušava da sačuva integritet tkiva uklanjanjem oštećenih ćelija pre nastanka nekrotskih promena u tkivu (Habeebu i drugi, 1998). Oralni tretman DA pacova Cd nije uticao na apoptozu u MLC što ukazuje da indukcija apoptoze koja je posredovana Cd zavisi i od ispitanog tkiva i u saglasnosti je sa indukcijom apoptoze u testisima ali ne i u prostati pacova akutno tretiranih Cd (Xu i drugi, 1999). I pored smanjenog proliferativnog odgovora i apoptoze, oralni tretman Cd nije uticao na procentualnu zastupljenost osnovnih populacija ćelija (limfocita, granulocita i monocita) kod tretiranih pacova a tretman nije imao efekta ni na subpopulacije ovih ćelija kao što je zastupljenost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija, što je suprotno

inhibitornom i stimulatornom efektu oralnog tretmana (30 dana) 5, 10, 25, 50 ppm Cd na ove subpopulacije limfocita koji je pokazan u drugoj studiji. Uzrok ovih razlika u efektu na osnovne subpopulacije T limfocita za sad nije jasan, a moguće je da su razlike u korišćenim sojevima doprinele ovakvim rezultatima (Lafuente i drugi, 2003a).

Uprkos sličnom nivou deponovanog metala u MLC<sup>+</sup> i slezini, oralni tretman kadmijumom je u slezini indukovao ekspresiju iRNK za obe forme MT kod oba soja pacova, dok je u MLC<sup>+</sup> zabeležena ekspresija iRNK za MT samo kod tretiranih DA pacova, čime je ukazano da sojne razlike u indukciji MT zavise i od samog tkiva. U tom smislu, razlike u ekspresiji gena za MT vezane za tkivo, zabeležene su i kod miševa i pacova izloženih Cd (Bhave i drugi, 1988; Choudhuri i drugi, 1993). Sa druge strane, kao i u MLC<sup>+</sup>, povećanje koncentracije zaštitnog antioksidativnog molekula GSH (iako samo numeričko) koji ima bitnu ulogu u zaštiti ćelija od toksičnih efekata Cd (Sarkar i drugi, 2013), je zabeleženo samo kod DA pacova i ukazuje na veću osetljivost ovog soja na toksičnost Cd i u tkivu slezine. Povećana zastupljenost neutrofila (HIS48<sup>+</sup> ćelije) u slezini DA pacova, uprkos nepromenjenoj ekspresiji CD11b molekula kao markera aktivacije i infiltracije ovih ćelija u tkiva (Arnaout, 1990), u saglasnosti je sa akumulacijom neutrofila u slezini pacova u akutnom režimu administracije Cd (Demenesku i drugi, 2014). Subhronični oralni tretman Cd (30 dana) nije uticao ni na zastupljenost NK ćelija u slezini DA i AO pacova. Ipak, poznati su inhibitorni (do 30 dana tretmana) i stimulatorni (nakon 30 dana tretmana) efekti oralne primene Cd na zastupljenost i citotoksičnost NK ćelija u perifernoj krvi i slezini pacova (Cifone i drugi, 1989), kao i inhibitorni efekti na zastupljenost NK<sup>+</sup> ćelija u slezini pacova akutno tretiranih Cd (Demenesku i drugi, 2014) što ukazuje na značaj perioda izloženosti uticaju Cd na ovu subpopulaciju ćelija.

Slično kao i u MLC<sup>+</sup>, povećana oksidativna aktivnost ćelija slezine (MPO, NO) i povećana produkcija proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17) zapaženi su samo kod DA pacova dok je tretman Cd kod oba soja doveo do povećane redukcije NBT. Povećana zastupljenost neutrofila verovatno doprinosi povećanim vrednostima aktivnosti unutarćelijske MPO u slezini tretiranih DA pacova. Dodatno, neutrofilu učestvuju i u uklanjanju vezikula apoptotskih ćelija i delova kadmijumom oštećenog tkiva čime ostvaruju i zaštitnu funkciju (Tarasub i drugi, 2010). Kako je kod DA pacova povećana produkcija NO i IFN- $\gamma$  na 50 ppm Cd, moguće je da su ovi molekuli doprineli supresivnom efektu Cd na proliferaciju limfocita u slezini. Naime, moguće je da u osnovi supresije proliferacije u slezini kod DA pacova leži i mehanizam kojim se pretpostavlja da IFN- $\gamma$  poreklom od aktivisanih T limfocita stimuliše

sintezu NO od strane makrofaga a produkovani NO zatim inhibira proliferaciju limfocita u slezini (Albina i drugi, 1991). Oralni tretman Cd je stimulisao produkciju ROS kod oba soja pacova, što je zaključeno na osnovu povećane sposobnosti redukcije NBT. Ipak, nepromenjena zastupljenost DHR<sup>+</sup> ćelija nije potvrdila ovaj nalaz što verovatno ukazuje na intenzivniju produkciju superoksidnog anjona (koji se primarno detektuje NBT testom) u odnosu na produkciju vodonik peroksida (koji se primarno detektuje DHR testom) od strane aktivisanih ćelija (Roos i Boer, 2014). Oksidativne aktivnosti ćelija slezine mogu biti posledica direktnog delovanja samog Cd (Zhong i drugi, 1990). Takođe, povećana produkcija proinflamatornih citokina kod DA pacova može biti posledica direktnog efekta Cd u subhroničnom režimu primene, iako je poznato da Cd inhibira produkciju ovih citokina u slučaju akutnog tretmana (Demenesku i drugi, 2014). Ipak, pad produkcije IL-17 u odgovoru na ConA stimulaciju ukazuje i na supresivne efekte subhroničnog tretmana Cd u slezini. Za indukciju citokinskog odgovora u slezini je predložen uticaj molekula koje slezina drenira iz krvi, kao što je, na primer, HMGB1 molekul za koji je pokazano da stimuliše produkciju proinflamatornih citokina (TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8) od strane mononuklearnih ćelija periferne krvi čoveka dok nema efekta na produkciju anti-inflamatornog citokina IL-10 (Andersson i drugi, 2000) čija je produkcija povećana samo kod AO pacova tretiranih nižom dozom Cd.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti:

1. Oralni unos Cd doveo je do akumulacije metala u krvi, plućima, slezini, mezenteričnim limfnim čvorovima, crevu, jetri i bubrezima kod DA i AO pacova. Deponovanje metala je bilo dozno zavisno u svim navedenim organima osim u krvi a koncentracija Cd u ispitivanim organima je bila sličnog nivoa kod tretiranih DA i AO pacova, osim u slučaju pluća, što sugeriše manji uticaj odabira soja na apsorpciju i deponovanje oralno unetog Cd. Najviše koncentracije deponovanog metala su nađene u jetri i bubrezima tretiranih pacova. Iako su ovo ciljni organi toksičnosti Cd, jetra je prva pogođena štetnim

efektima metala dok je za ispoljavanje nefrotoksičnosti Cd potreban duži vremenski period oralne izloženosti.

2. Uprkos sličnim nivoima deponovanog Cd u crevu DA i AO pacova, oštećenje ovog tkiva je izraženije kod DA u odnosu na AO pacove. Kadmijum dovodi do nekroze tkiva, indukcije sinteze i otpuštanja proinflammatoryh molekula (HMGB1, citokina), infiltracije mononuklearnih leukocita u *lamina propria*-u kao i oksidativnog stresa, što zajedno sa poremećajem ravnoteže komensalne mikroflore utiče na poremećaj funkcije epitelne barijere creva. Kod AO pacova su navedene promene manje izražene u odnosu na DA pacove, verovatno zbog indukcije anti-inflamatornog citokinskog odgovora (IL-10), efikasnije antioksidativne zaštite (SOD) kao i prisustva specifične mikrobijalne flore za koju se zna da doprinosi očuvanju celovitosti barijere creva (*L. johnsonii* i *L. murinus*).
3. Intenzivniji stepen oštećenja tkiva i proinflammatory odgovor u crevu tretiranih DA pacova doveo je do izraženog proinflammatory odgovora na oralni unos Cd u MLČ kod DA u odnosu na odgovor u MLČ kod AO pacova. Kako je osnovni mehanizam štetnog delovanja Cd oksidativni stres, ovaj metal je u MLČ oba soja pacova doveo do produkcije ROS. Ipak, samo u MLČ DA pacova pokrenut je intenzivni zaštitni odgovor na stres izazvan metalom u vidu povećane ekspresije metalotioneina 1 i 2 kao i povećanja nivoa GSH unutar ćelija. Oksidativni stres zajedno sa HMGB1 molekulom i drugim markerima oštećenja doveli su do produkcije proinflammatory citokina u MLČ DA pacova. Obrazovanju inflamatorne sredine u MLČ DA pacova doprinela je i smanjena ekspresija i produkcija anti-inflamatornog citokina IL-10.
4. Iako oralni tretman pacova Cd generalno nije uticao na zastupljenost ćelija periferne krvi, efekat na zastupljenost eozinofila upućuje na moguću ulogu Cd u alergijskim reakcijama koja je malo ispitivana. Diskretne promene hematoloških parametara kod tretiranih pacova oba soja su rani markeri koji ukazuju na nastupanje predstojeće anemije. Promene aktivnosti enzima antioksidativne odbrane predstavljaju pokušaj domaćina da povрати narušenu ravnotežu u cirkulaciji i tako spreči sistemske efekte metala. Primena viših doza metala ili duži period izloženosti su potrebni za nastupanje proinflammatory sistemskog efekta oralno unešenog Cd kod oba soja pacova. Ipak, povećani nivoi HMGB1 molekula u perifernoj krvi DA pacova govore kako o oštećenju tako i o inflamaciji tkiva kod ovog soja, za razliku od AO soja pacova kod kojih nema promena u koncentraciji ovog nekrotskog i inflamatornog markera.

5. Promene u aktivnosti ćelija slezine tretiranih DA u poređenju sa AO pacovima, ukazuju na uticaj genetičke osnove na sistemske efekte oralnog tretmana Cd. Isti nivoi Cd koji su doveli do stimulacije proinflamatornog odgovora u MLC, u tkivu slezine su doveli do supresije pojedinih aspekata inflamatornog odgovora (kao što je redukcija pojedinih ćelijskih aktivnosti koje su bile povećane u MLC) što naglašava doprinos sredine ispitivanog tkiva sojnim razlikama u podložnosti toksičnim efektima oralno unetog Cd.

Gledano u celini, iako je deponovanje metala bilo sličnog nivoa u crevu, MLC i slezini kod DA i AO pacova, sojne razlike su zabeležene u brojnim aspektima imunskog odgovora u ovim tkivima i to najčešće u vidu izostanka odgovora ili u vidu manjeg intenziteta promene aktivnosti ćelija kod tretiranih AO u odnosu na tretirane DA pacove, što ukazuje na veću osetljivost ovog soja pacova na oralni unos kadmijuma. Predstavljeni rezultati po prvi put ukazuju na značaj genetske osnove u toksičnim efektima oralne izloženosti Cd. Opisani efekti Cd se ne smeju zanemariti pri proceni oralne izloženosti ovom metalu kao faktora zdravstvenog rizika ljudi i životinja.

## 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., 2014d. Differentiation and functions of CD4+ effector T cells, in: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 213-230.
3. Abbas A.K, Lichtman A.H, Pillai S., 2014e. Lymphocyte development and antigen receptor gene rearrangement, in: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 171-198.
4. Abbas A.K, Lichtman A.H, Pillai S., 2014f. Specialized immunity at epithelial barriers and in immune privileged tissues, in: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 289-311.
5. Abbas A.K, Lichtman A.H, Pillai S., 2014h. Allergy, in: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 417-434.
6. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S., 2014b. Properties and overview of immune responses, in: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 2-12.
7. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S., 2014c. Innate immunity, in: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 51-86.
8. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S., 2014g. Leukocyte circulation and migration into tissues, in: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 35-49.
9. Ajani J.A., Welch S.R., Raber M.N., Fields W.S., Krakoff I.H. Comprehensive criteria for assessing therapy-induced toxicity. *Cancer Investigation*, 1990; 8: 147-159.
10. Åkesson A., Lundh T., Vahter M., Bjellerup P., Lidfeldt J., Nerbrand C., Samsioe G., Strömberg U., Skerfving S. Tubular and glomerular kidney effects in Swedish women with low environmental cadmium exposure. *Environmental Health Perspectives*, 2005; 11: 1627-1631.

11. Åkesson A., Berglund M., Schütz A., Bjellerup P., Bremme K., Vahter M. Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status. *American Journal of Public Health*, 2002; 92: 284-287.
12. Albina J.E., Abate J.A., Henry W.L. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *The Journal of Immunology*, 1991; 147: 144-148.
13. Alghasham A., Salem T.A., Meki A.R. Effect of cadmium-polluted water on plasma levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and oxidative status biomarkers in rats: protective effect of curcumin. *Food and Chemical Toxicology*, 2013; 59: 160-164.
14. Amoruso M.A., Witz G., Goldstein B.D. Enhancement of rat and human phagocyte superoxide anion radical production by cadmium in vitro. *Toxicology Letters*, 1982; 10: 133-138.
15. Andersen O., Nielsen J.B., Sorensen J.A., Scherrebeck L. Experimental localization of intestinal uptake sites for metals (Cd, Hg, Zn, Se) in vivo in mice. *Environmental Health Perspectives*, 1994; 102: 199-206.
16. Andersen O., Nielsen J.B., Svendsen P. Oral cadmium chloride intoxication in mice: effects of chelation. *Toxicology*, 1988a; 52: 65-79.
17. Andersen O., Nielsen J.B., Svendsen P. Oral cadmium chloride intoxication in mice: effects of dose on tissue damage, intestinal absorption and relative organ distribution. *Toxicology*, 1988b; 48: 225-236.
18. Anderson M.E, 1986. The DTNB-GSSG reductase recycling assay for total glutathione (GSH + 1/2 GSSG), in: *Tissue glutathione*. Greenwald RA, Florida, CRC Press, pp. 319-323.
19. 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. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000; 192: 565-570.
20. Arnaut M.A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, 1990; 75: 1037-1050.
21. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews Immunology*, 2008; 8: 411-420.

22. Asar M., Kayisli Ü.A., İzgüt-Uysal V.N., Öner G., Kaya M., Polat S. Cadmium-induced changes in epithelial cells of the rat stomach. *Biological Trace Element Research*, 2000; 77: 65-81.
23. ATSDR. Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, U.S.A. 2012.
24. Babior B.M. Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 2000; 109: 33-44.
25. Bancroft G.J. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Current Opinion in Immunology*, 1993; 5: 503-510.
26. Barbee Jr. J.Y., Prince T.S. Acute respiratory distress syndrome in a welder exposed to metal fumes. *Southern Medical Journal*, 1999; 92: 510-512.
27. Bartoli G.M., Palozza P., Piccioni E. Enhanced sensitivity to oxidative stress in Cu, ZnSOD depleted rat erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1992; 1123: 291-295.
28. Bell R.R., Nonavinakere V.K., Soliman M.R., Early J.L. Effect of in vitro treatment of rat hepatocytes with selenium, and/or cadmium on cell viability, glucose output, and cellular glutathione. *Toxicology*, 1991; 69: 111-119.
29. Berg D.J., Davidson N., Kühn R., Muller W., Menon S., Holland G., Thompson-Snipes L., Leach M.W., Rennick D. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4 (+) TH1-like responses. *Journal of Clinical Investigation*, 1996; 98: 1010-1020.
30. Beton D.C., Andrews G.S., Davies H.J., Howells L., Smith G.F. Acute cadmium fume poisoning: five cases with one death from renal necrosis. *British Journal of Industrial Medicine*, 1966; 23: 292-301.
31. Beutler E., 1982. Catalase. In: Beutler, E. (Ed.), *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Stratton, New York, pp. 105–106.
32. Bhattacharyya M.H., Whelton B.D., Peterson D.P., Carnes B.A., Moretti E.S., Toomey J.M., Williams L.L. Skeletal changes in multiparous mice fed a nutrient-sufficient diet containing cadmium. *Toxicology*, 1988; 50:193-204.
33. Bhave M.R., Wilson M.J., Waalkes M.P. Methylation status and organization of the metallothionein-I gene in livers and testes of strains of mice resistant and susceptible to cadmium. *Toxicology*, 1988; 50: 231-245.



34. Biswas S.K. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016; 2016: 5698931.
35. Bjerke K., Halstensen T.S., Jahnsen F., Pulford K., Brandtzaeg P. Distribution of macrophages and granulocytes expressing L1 protein (calprotectin) in human Peyer's patches compared with normal ileal lamina propria and mesenteric lymph nodes. *Gut*, 1993; 34: 1357-1363.
36. Blanus M., Mrković-Milić R., Durbešić P. Lead and cadmium in soil and isopoda woodlice in Croatia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002; 52: 198-202.
37. Boujelben M., Ghorbel F., Vincent C., Makni-Ayadi F., Guermazi F., Croute F., El-Feki A. Lipid peroxidation and HSP72/73 expression in rat following cadmium chloride administration: interactions of magnesium supplementation. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2006; 57: 437-443.
38. Bozeman P.M., Learn D.B., Thomas E.L. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Journal of Immunological Methods*, 1990; 126: 125-133.
39. Braak B., Klooker T.K., Wouters M.M., Welting O., Van Der Loos C.M., Stanisor O.I., Van Diest S., Van Den Wijngaard R.M., Boeckxstaens G.E. Mucosal immune cell numbers and visceral sensitivity in patients with irritable bowel syndrome: is there any relationship & quest. *The American Journal of Gastroenterology*, 2012; 107: 715-726.
40. Breton J., Le Clere K., Daniel C., Sauty M., Nakab L., Chassat T., Dewulf J., Penet S., Carnoy C., Thomas P., Pot B. Chronic ingestion of cadmium and lead alters the bioavailability of essential and heavy metals, gene expression pathways and genotoxicity in mouse intestine. *Archives of Toxicology*. 2013a; 87: 1787-1795.
41. Breton J., Massart S., Vandamme P., De Brandt E., Pot B., Folligné B. Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 2013b; 14: 62.
42. Bron P.A., van Baarlen P., Kleerebezem M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*, 2012; 10: 66-78.
43. Brown E.M., Sadarangani M., Finlay B.B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature Immunology*, 2013; 14: 660-667.

44. Brzoska M.M., Kamiński M., Supernak-Bobko D., Zwierz K., Moniuszko-Jakoniuk J. Changes in the structure and function of the kidney of rats chronically exposed to cadmium. I. Biochemical and histopathological studies. *Archives of Toxicology*, 2003b; 77: 344-352.
45. Brzoska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J., Piłat-Marcinkiewicz B., Sawicki B. Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol and Alcoholism*, 2003a; 38: 2-10.
46. Brzoska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J. Low-level exposure to cadmium during the lifetime increases the risk of osteoporosis and fractures of the lumbar spine in the elderly: studies on a rat model of human environmental exposure. *Toxicological Sciences*, 2004; 82: 468-477.
47. Brzoska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J. The influence of calcium content in diet on cumulation and toxicity of cadmium in the organism. *Archives of Toxicology*, 1998; 72: 63-73.
48. Buchet J.P., Lauwerys R., Roels H., Bernard A., Bruaux P., Claeys F., Ducoffre G., De Plaen P., Staessen J., Amery A., Lijnen P. Renal effects of cadmium body burden of the general population. *The Lancet*, 1990; 336: 699-702.
49. Budinger L., Hertl M. Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy*, 2000; 55: 108-115.
50. Carageorgiou H., Katramadou M., 2012. Aspects of cadmium neurotoxicity, in: *Metal Ion in Stroke*. Springer, New York, USA, pp. 703-749.
51. Cavaillon J.M., Adrie C., Fitting C., Adib-Conquy M. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *Journal of Endotoxin Research*, 2005; 11: 311-320.
52. Cesta M.F. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicologic Pathology*, 2006; 34: 599-608.
53. Chan H.M., Zhu L.F., Zhong R., Grant D., Goyer R.A., Cherian M.G. Nephrotoxicity in rats following liver transplantation from cadmium-exposed rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1993; 123: 89-96.
54. Chang Y.F., Wen J.F., Cai J.F., Xiao-Ying W., Yang L., Guo Y.D. An investigation and pathological analysis of two fatal cases of cadmium poisoning. *Forensic Science International*, 2012; 220: e5-e8.
55. Chatterjee S., Kundu S., Bhattacharyya A. Mechanism of cadmium induced apoptosis in the immunocyte. *Toxicology Letters*, 2008; 177: 83-89.

56. Chen G., Ward M.F., Sama A.E., Wang H. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2004; 24: 329-333.
57. Chen G.Y., Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, 2010; 10: 826-837.
58. Chen H., Lu Y., Cao Z., Ma Q., Pi H., Fang Y., Yu Z., Hu H., Zhou Z. Cadmium induces NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in vascular endothelial cells. *Toxicology Letters*, 2016; 246 :7-16.
59. Chen L., Liu L., Huang S. Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008; 45: 1035-1044.
60. Chen T.B., Wong J.W., Zhou H.Y., Wong M.H. Assessment of trace metal distribution and contamination in surface soils of Hong Kong. *Environmental Pollution*, 1997; 96: 61-68.
61. Cherian M.G., Goyer R.A., Valberg L.S. Gastrointestinal absorption and organ distribution of oral cadmium chloride and cadmium-metallothionein in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1978; 4: 861-868.
62. Chertok R.J., Sasser L.B., Callahan M.F., Jarboe G.E. Influence of cadmium on the intestinal uptake and absorption of calcium in the rat. *The Journal of Nutrition*, 1981; 111: 631-638.
63. Chiva M., Soriano G., Rochat I., Peralta C., Rochat F., Llovet T., Mirelis B., Schiffrin E.J., Guarner C., Balanzó J. Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 2002; 37: 456-462.
64. Choi H.S., Kim J.W., Cha YN, Kim C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2006; 27: 31-44.
65. Choudhuri S.U., McKim J.M., Klaassen C.D. Differential expression of the metallothionein gene in liver and brain of mice and rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1993; 119: 1-10.
66. Ciarrocca M., Rosati M.V., Tomei F., Pacchiarotti A., Corbosiero P., Di Pastena C., Scala B., Capozzella A., Tomei G., Caciari T., Sacco C. Correlation between cadmium and blood counts in workers exposed to urban stressor. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 2015; 70: 70-76.

67. Cifone M.G., Alesse E., Di Eugenio R., Napolitano T., Morrone S., Paolini R., Santoni G., Santoni A. In vivo cadmium treatment alters natural killer activity and large granular lymphocyte number in the rat. *Immunopharmacology*, 1989; 18: 149-156.
68. Cigankova V., Almašiova V., Holovska K. Morphological changes in duodenal epithelium of Japanese quail after chronic cadmium exposure. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2010; 19: 275-282.
69. Cikrt M., Tichy M. Excretion of cadmium through bile and intestinal wall in rats. *British Journal of Industrial Medicine*, 1974; 31: 134-139.
70. Corash L., Tan H., Gralnick H.R. Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. I. Relationship between buoyant density, cell volume, and ultrastructure. *Blood*, 1977; 49: 71-87.
71. Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 2006; 52: 601-623.
72. Dalton T., Fu K., Enders G.C., Palmiter R.D., Andrews G.K. Analysis of the effects of overexpression of metallothionein-I in transgenic mice on the reproductive toxicology of cadmium. *Environmental Health Perspectives*, 1996; 104: 68-76.
73. Dalton T.P., He L., Wang B., Miller M.L., Jin L., Stringer K.F., Chang X., Baxter C.S., Nebert D.W. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005; 102: 3401-3406.
74. Damek-Poprawa M., Sawicka-Kapusta K. Histopathological changes in the liver, kidneys, and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland. *Environmental Research*, 2004; 96: 72-78.
75. Dan G., Lall S.B., Rao D.N. Humoral and cell mediated immune response to cadmium in mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 2000; 23: 349-360.
76. D'andrea A., Aste-Amezaga M., Valiante N.M., Ma X., Kubin M., Trinchieri G. 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*, 1993; 178: 1041-1048.
77. Davison A.G., Taylor A.N., Darbyshire J., Chettle D.R., Guthrie C.J., O'Malley D., Mason H.T., Fayers P.M., Venables K.M., Pickering C.A., Franklin D. Cadmium fume inhalation and emphysema. *The Lancet*, 1988; 331: 663-667.

78. DeGagné J., Fortier M., Chevalier G., Fournier M. Cellular response of mouse splenocytes to heavy metals exposure. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 2006; 88: 235-258.
79. Demenesku J., Mirkov I., Ninkov M., Popov Aleksandrov A., Zolotarevski L., Kataranovski D., Kataranovski M. Acute cadmium administration to rats exerts both immunosuppressive and proinflammatory effects in spleen. *Toxicology*, 2014; 326: 96-108.
80. Demenesku J., Popov Aleksandrov A., Mirkov I., Ninkov M., Zolotarevski L., Kataranovski D., Brceski I., Kataranovski M. Strain differences of cadmium-induced toxicity in rats: Insight from spleen and lung immune responses. *Toxicology Letters*, 2016; 256: 33-43.
81. Djokic J., Ninkov M., Mirkov I., Popov Aleksandrov A., Zolotarevski L., Kataranovski D., Kataranovski M. Differential effects of cadmium administration on peripheral blood granulocytes in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014; 37: 210-219.
82. Djukic-Cosic D., Jovanovic M.C., Bulat Z.P., Ninkovic M., Malicevic Z., Matovic V. Relation between lipid peroxidation and iron concentration in mouse liver after acute and subacute cadmium intoxication. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2008; 22: 66-72.
83. Dudley R.E., Gammal L.M., Klaassen C.D. Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1985; 77: 414-426.
84. Edwards J.R., Prozialeck W.C. Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009; 238: 289-293.
85. El Aidy S., Van Baarlen P., Derrien M., Lindenbergh-Kortleve D.J., Hooiveld G., Levenez F., Doré J., Dekker J., Samsom J.N., Nieuwenhuis E.E., Kleerebezem M. Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. *Mucosal Immunology*, 2012; 5: 567-579.
86. El Azzouzi B., Tsangaris G.T., Pellegrini O., Manuel Y., Benveniste J., Thomas Y. Cadmium induced apoptosis in a human T cell line. *Toxicology*, 1994; 88: 127-139.
87. El Kebir D., Jozsef L., Pan W., Filep J.G. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circulation Research*, 2008; 103: 352-359.

88. El-Boshy M.E., Risha E.F., Abdelhamid F.M., Mubarak M.S., Hadda T.B. Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2015; 29: 104-110:
89. El-Demerdash F.M., Yousef M.I., Kedwany F.S., Baghdadi H.H. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and  $\beta$ -carotene. *Food and Chemical Toxicology*, 2004; 42: 1563-1571.
90. Elinder C.G., Kjellström T., Hogstedt C., Andersson K., Spang G. Cancer mortality of cadmium workers. *British Journal of Industrial Medicine*, 1985; 42: 651-655.
91. Ellis K.J., Morgan W.D., Zanzi I., Yasumura S., Vartsky D., Cohn S.H. Critical concentrations of cadmium in human renal cortex: Dose-effect studies in cadmium smelter workers. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 1981; 7: 691-703.
92. El-Maraghy S.A., Gad M.Z., Fahim A.T., Hamdy M.A. Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2001; 15: 207-214.
93. Fantone J.C., Ward P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *The American Journal of Pathology*, 1982; 107: 395-418.
94. Fazeli M., Hassanzadeh P., Alaei S. Cadmium chloride exhibits a profound toxic effect on bacterial microflora of the mice gastrointestinal tract. *Human and Experimental Toxicology*, 2011; 30: 152-159.
95. Feng F., Xue B., Zhang X. The relationship between cadmium-induced inhibition of splenic lymphocyte function and cell apoptosis. *Chinese Journal of Preventive Medicine*. 2001; 35: 44-47.
96. Fernandez M.A., Sanz P., Palomar M., Serra J., Gadea E. Fatal chemical pneumonitis due to cadmium fumes. *Occupational Medicine*, 1996; 46: 372-374.
97. Fiorentino D.F., Zlotnik A., Mosmann T.R., Howard M., O'garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *The Journal of Immunology*, 1991; 147: 3815-3822.
98. Fournier L., Thomas G., Garnier R., Buisine A., Houze P., Pradier F., Dally S. 2, 3-Dimercaptosuccinic acid treatment of heavy metal poisoning in humans. *Medical Toxicology and Adverse Drug Experience*, 1988; 3: 499-504.

99. Friberg L. Cadmium and the kidney. *Environmental Health Perspectives*, 1984; 54:1-11.
100. Gabay C., Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine*, 1999; 340: 448-454.
101. Galal-Gorchev H. Dietary intake of pesticide residues: cadmium, mercury, and lead. *Food Additives and Contaminants*, 1991; 8: 793-806.
102. Gilbert D.L., Pyzik P.L., Freeman J.M. The ketogenic diet: seizure control correlates better with serum  $\beta$ -hydroxybutyrate than with urine ketones. *Journal of Child Neurology*, 2000; 15: 787-790.
103. Girotti M.J., Khan N., McLellan B.A. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 1991; 31: 32-35.
104. Gobe G., Crane D. Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. *Toxicology Letters*, 2010; 198: 49-55.
105. Gochfeld M. Factors influencing susceptibility to metals. *Environmental Health Perspectives*, 1997; 105: 817-822.
106. Godt J., Scheidig F., Grosse-Siestrup C., Esche V., Brandenburg P., Reich A., Groneberg D.A. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2006; 1:1-6.
107. Goon D., Klaassen C.D. Dosage-dependent absorption of cadmium in the rat intestine measured in situ. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1989; 100: 41-50.
108. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 2003; 3: 23-35.
109. Green D.R., Ferguson T., Zitvogel L., Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature Reviews Immunology*, 2009; 9: 353-363.
110. Groten J.P., van Bladeren P.J. Cadmium bioavailability and health risk in food. *Trends in Food Science and Technology*, 1994; 5: 50-55.
111. Grubic-Kezele T., Blagojevic Zagorac G., Jakovac H., Domitrovic R., Milin C., Radosevic-Stasic B. 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; 2013: 750406.



112. Guilhermino L., Soares A.M., Carvalho A.P., Lopes M.C. Effects of cadmium and parathion exposure on hematology and blood biochemistry of adult male rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1998; 60: 52-59.
113. Habeebu S.S., Liu J., Klaassen C.D. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1998; 149: 203-209.
114. Halliwell B., Clement M.V., Long L.H. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 2000; 486: 10-13.
115. Hamada T., Tanimoto A., Sasaguri Y. Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis*, 1997; 2: 359-367.
116. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 1983; 166: 557-580.
117. Haq F., Mahoney M., Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2003; 533: 211-226.
118. Harstad E.B., Klaassen C.D. Analysis of strain difference in sensitivity to cadmium-induced hepatotoxicity in Fischer 344 and Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 2002; 67: 329-340.
119. Hart B.A., Lee C.H., Shukla G.S., Shukla A., Osier M., Eneman J.D., Chiu J.F. Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology*, 1999; 133: 43-58.
120. Haupt W., Riese J., Mehler C., Weber K., Zowe M., Hohenberger W. Monocyte function before and after surgical trauma. *Digestive Surgery*, 1998; 15: 102-104.
121. Heilig H.G., Zoetendal E.G., Vaughan E.E., Marteau P., Akkermans A.D., de Vos W.M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002; 68: 114-123.
122. Hernandez M., Macia M. 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*, 1996; 30: 437-443.
123. Hibbs J.B., Taintor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988; 157: 87-94.



124. Hildebrand C.E., Cram L.S. Distribution of cadmium in human blood cultured in low levels of CdCl<sub>2</sub>: accumulation of Cd in lymphocytes and preferential binding to metallothionein. *Experimental Biology and Medicine*, 1979; 161: 438-443.
125. Ho I.C. m(en)TOR(ing) differentiating T helper cells. *Immunity*, 2009; 30: 759-761.
126. Hooper L.V., Littman D.R., MacPherson A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 2012; 336: 1268-1273.
127. Horiguchi H., Harada A., Oguma E., Sato M., Homma Y., Kayama F., Fukushima M., Matsushima K. Cadmium-induced acute hepatic injury is exacerbated in human interleukin-8 transgenic mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000; 163: 231-239.
128. Hussain T., Shukla G.S., Chandra S.V. Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: in vivo and in vitro studies. *Pharmacology and Toxicology*, 1987; 60: 355-358.
129. Hyun J.S., Satsu H., Shimizu M. Cadmium induces Interleukin-8 production via NF- $\kappa$ B activation in the human intestinal epithelial cell, Caco-2. *Cytokine*, 2007; 37: 26-34.
130. IARC (International Agency for Research on Cancer), 1993. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Humans* 58, 119–237.
131. Ivanov I.I., Honda K. Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell Host and Microbe*, 2012; 12: 496-508.
132. Iwakura Y., Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006; 116: 1218-1222.
133. Jarup L., Berglund M., Elinder C.G., Nordberg G., Vanter M. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 1998; 1: 1-51.
134. Jarup L., Hellstrom L., Alfvén T., Carlsson M.D., Grubb A., Persson B., Pettersson C., Spang G., Schutz A., Elinder C.G. Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. *Occupational and Environmental Medicine*, 2000; 57: 668-672.
135. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 2003; 68:167-182.

136. Jelovcan S., Gutsch A., Kleinhapfl B., Sedlmayr P., Barth S., Marth E. Effects of low concentrations of cadmium on immunoglobulin E production by human B lymphocytes in vitro. *Toxicology*, 2003; 188: 35-48.
137. Jiang W., Pisetsky D.S. The role of IFN- $\alpha$  and nitric oxide in the release of HMGB1 by RAW 264.7 cells stimulated with polyinosinic-polycytidylic acid or lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 2006; 177: 3337-3343.
138. Jihen E.H., Imed M., Fatima H., Abdelhamid K. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: histology and Cd accumulation. *Food and Chemical Toxicology*, 2008; 46: 3522-3527.
139. Jolibois L.S., Burow M.E., Swan K.F., George W.J., Anderson M.B., Henson M.C. Effects of cadmium on cell viability, trophoblastic development, and expression of low density lipoprotein receptor transcripts in cultured human placental cells. *Reproductive Toxicology*, 1999; 13: 473-480.
140. Jovanovic D.V., Di Battista J.A., Martel-Pelletier J., Jolicoeur F.C., He Y., Zhang M., Mineau F., Pelletier J.P. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- $\beta$  and TNF- $\alpha$ , by human macrophages. *The Journal of Immunology*, 1998; 160: 3513-3521.
141. Kacew S., Ruben Z., McConnell R.F. Review Article: Strain as a determinant factor in the differential responsiveness of rats to chemicals. *Toxicologic Pathology*, 1995; 23: 701-714.
142. Kaplan M., Atakan I.H., Aydogdu N., Aktoz T., Ozpuyan F., Seren G., Tokuc B., Inci O. Influence of N-acetylcysteine on renal toxicity of cadmium in rats. *Pediatric Nephrology*, 2008; 23: 233-241.
143. Karlsson F.A., Wibell L., Evrin P.E. beta 2-Microglobulin in clinical medicine. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum*, 1979; 154: 27-37.
144. Katakai K., Liu J., Nakajima K., Keefer L.K., Waalkes M.P. Nitric oxide induces metallothionein (MT) gene expression apparently by displacing zinc bound to MT. *Toxicology Letters*, 2001; 119: 103-108.
145. Kataranovski M., Jankovic S., Kataranovski D., Stosic J., Bogojevic D. Gender differences in acute cadmium-induced systemi inflammation in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2009; 22: 1-7.

146. Kataranovski M., Kataranovski D., Savic D., Jovcic G., Bogdanovic Z., Jovanovic T. Granulocyte and plasma cytokine activity in acute cadmium intoxication in rats. *Physiological Research*, 1998; 47: 453-462.
147. Kawai Y., Suegara N. Specific adhesion of lactobacilli to keratinized epithelial cells of the rat stomach in vitro. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1977; 30: 1777-1780.
148. Kayama F., Yoshida T., Elwell M.R., Luster M.I. Cadmium-induced renal damage and proinflammatory cytokines: possible role of IL-6 in tubular epithelial cell regeneration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1995b; 134: 26-34.
149. Kayama F., Yoshida T., Elwell M.R., Luster M.I. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1995a; 13: 224-234.
150. Kello D., Kostial K. Influence of age and milk diet on cadmium absorption from the gut. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1977; 40: 277-282.
151. Kew M.C. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *The Lancet*, 2000; 355: 591-592.
152. King L.M., Anderson M.B., Sikka S.C., George W.J. Murine strain differences and the effects of zinc on cadmium concentrations in tissues after acute cadmium exposure. *Archives of Toxicology*, 1998; 72: 650-655.
153. Kippler M., Goessler W., Nermell B., Ekstrom E.C., Lonnerdal B., El Arifeen S., Vahter M. Factors influencing intestinal cadmium uptake in pregnant Bangladeshi women - a prospective cohort study. *Environmental Research*, 2009; 109: 914-921.
154. Klaassen C.D., Liu J., Diwan B.A. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009; 238: 215-220.
155. Kondo Y., Kuo S.M., Lazo J.S. Interleukin-1 beta-mediated metallothionein induction and cytoprotection against cadmium and cis-diamminedichloroplatinum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1994; 270: 1313-1318.
156. Kostic M.M., Ognjanovic B., Dimitrijevic S., Zikic R.V., Stajn A., Rosic G.L., Zivkovic R.V. Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects. *European Journal of Haematology*, 1993; 51: 86-92.
157. Kovacevic-Jovanovic V., Miletic T., Stanojevic S., Mitic K., Dimitrijevic M. Immune response to gut *Escherichia coli* and susceptibility to adjuvant arthritis in the rats. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2015; 62: 1-9.

158. Krueger W.S., Wade T.J. Elevated blood lead and cadmium levels associated with chronic infections among non-smokers in a cross-sectional analysis of NHANES data. *Environmental Health*, 2016; 15:16.
159. Kuester R.K., Waalkes M.P., Goering P.L., Fisher B.L., McCuskey R.S., Sipes I.G. Differential hepatotoxicity induced by cadmium in Fischer 344 and Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 2002; 65: 151-159.
160. Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 1993; 75: 263-274.
161. Kundu S., Sengupta S., Bhattacharyya A. EGFR upregulates inflammatory and proliferative responses in human lung adenocarcinoma cell line (A549), induced by lower dose of cadmium chloride. *Inhalation Toxicology*, 2011; 23: 339-348.
162. Kundu S., Sengupta S., Chatterjee S., Mitra S., Bhattacharyya A. Cadmium induces lung inflammation independent of lung cell proliferation: a molecular approach. *Journal of Inflammation*, 2009; 6:19.
163. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680-685.
164. Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes / Metabolism Research and Reviews*, 1999; 15: 412-426.
165. Lafuente A., Cano P., Esquifino A.I. Are cadmium effects on plasma gonadotropins, prolactin, ACTH, GH and TSH levels, dose-dependent?. *Biometals*, 2003b; 16: 243-250.
166. Lafuente A., Gonzalez-Carracedo A., Esquifino A.I. Differential effects of cadmium on blood lymphocyte subsets. *Biometals*, 2004; 17: 451-456.
167. Lafuente A., Gonzalez-Carracedo A., Romero A., Esquifino A.I. Effect of cadmium on lymphocyte subsets distribution in thymus and spleen. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2003a; 59: 43-48.
168. Lag M., Rodionov D., Ovrevik J., Bakke O., Schwarze P.E., Refsnes M. Cadmium-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: Expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages. *Toxicology Letters*, 2010; 193: 252-260.
169. Lalor G.C. Review of cadmium transfers from soil to humans and its health effects in the Jamaican environment. *Science of the Total Environment*, 2008; 400:162-172.

170. Lane T.W., Morel F.M. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000; 97: 4627-4631.
171. Langrish C.L., McKenzie B.S., Wilson N.J., de Waal Malefyt R., Kastelein R.A., Cua D.J. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 2004; 202: 96-105.
172. Laskin D.L., Sunil V.R., Gardner C.R., Laskin J.D. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction?. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2011; 51: 267-288.
173. Leduc D., De Francquen P., Jacobovitz D., Vandeweyer R., Lauwerys R., De Vuyst P. Association of cadmium exposure with rapidly progressive emphysema in a smoker. *Thorax*, 1993; 48: 570-571.
174. Lee C.S., Li X., Shi W., Cheung S.C., Thornton I. Metal contamination in urban, suburban, and country park soils of Hong Kong: a study based on GIS and multivariate statistics. *Science of the Total Environment*, 2006; 356: 45-61.
175. Lee K.F., Lin P.Y., Cheung Y.C. Leiomyomatosis of mesenteric lymph nodes associated with duodenal adenocarcinoma. *Chang Gung Medical Journal*, 2002; 25: 271-274.
176. Leffel E.K., Wolf C., Poklis A., White K.L. Drinking water exposure to cadmium, an environmental contaminant, results in the exacerbation of autoimmune disease in the murine model. *Toxicology*, 2003; 188: 233-250.
177. Lichten L.A., Liuzzi J.P., Cousins R.J. 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*, 2009; 296: G860-G867.
178. Lied G.A. Gastrointestinal food hypersensitivity: Symptoms, diagnosis and provocation tests. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 2007; 18: 5-13.
179. Liesz A., Dalpke A., Mracsko E., Antoine D.J., Roth S., Zhou W., Yang H., Na S.Y., Akhisaroglu M., Fleming T., Eigenbrod T. DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury. *The Journal of Neuroscience*, 2015; 35: 583-598.
180. Liu J., Corton C., Dix D.J., Liu Y., Waalkes M.P., Klaassen C.D. Genetic background but not metallothionein phenotype dictates sensitivity to cadmium-induced testicular injury in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2001; 176: 1-9.

181. Liu J., Kadiiska M.B., Corton J.C., Qu W., Waalkes M.P., Mason R.P., Liu Y., Klaassen C.D. Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II-null mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002; 32: 525-535.
182. Liu L., Tao R., Huang J., He X., Qu L., Jin Y., Zhang S., Fu Z. Hepatic oxidative stress and inflammatory responses with cadmium exposure in male mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015; 39: 229-236.
183. Liu Y., Li Y., Liu K., Shen J. Exposing to cadmium stress cause profound toxic effect on microbiota of the mice intestinal tract. *PloS one*, 2014; 9: e85323.
184. Loeser E., Lorke D. Semichronic oral toxicity of cadmium: 1. Studies on rats. *Toxicology*, 1977; 7: 215-224.
185. Lopez E., Figueroa S., Oset-Gasque M.J., Gonzalez M.P. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *British Journal of Pharmacology*, 2003; 138: 901-911.
186. Lotze M.T., Tracey K.J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature Reviews Immunology*, 2005; 5: 331-342.
187. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951; 193: 265-275.
188. Luckheeram R.V., Zhou R., Verma A.D., Xia B. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012; 2012:925135.
189. Lukacinova A., Racz O., Lovasova E., Nistiar F. Effect of lifetime low dose exposure to heavy metals on selected serum proteins of Wistar rats during three subsequent generations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011; 74: 1747-1755.
190. Lukic J., Strahinic I., Milenkovic M., Golic N., Kojic M., Topisirovic L., Begovic J. Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013; 79: 5735-5744.
191. Lukic M.L., Mensah-Brown E., Galadari S., Shahin A. Lack of apoptosis of infiltrating cells as the mechanism of high susceptibility to EAE in DA rats. *Clinical and Developmental Immunology*, 2001; 8: 193-200.
192. Lynes M.A., Zaffuto K., Unfricht D.W., Marusov G., Samson J.S., Yin X. The physiological roles of extracellular metallothionein. *Experimental Biology and Medicine*, 2006; 231: 1548-1554.

193. MacPherson A.J., Smith K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *The Journal of Experimental Medicine*, 2006; 203: 497-500.
194. Mahiya S., Lofrano G., Sharma S.K. Heavy metals in water, their adverse health effects and biosorptive removal: A review. *International Journal of Chemistry*, 2014; 3:132-149.
195. Malave I., de Ruffino D.T. Altered immune response during cadmium administration in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1984; 74: 46-56.
196. Mane J., Loren V., Pedrosa E., Ojanguren I., Xaus J., Cabre E., Domenech E., Gassull M.A. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 prevents and reverts intestinal damage on TNBS-induced colitis in mice. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2009; 15: 1155-1163.
197. Markovic M., Miljkovic D., Momcilovic M., Popadic D., Miljkovic Z., Savic E., Ramic Z., Stojkovic M.M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with TH 1 and TH 17-inducing cytokine profiles. *Molecular Immunology*, 2009; 47: 141-146.
198. Marth E.G., Jelovcan S.A., Kleinhappl B.A., Gutschi A.N., Barth S.O. The effect of heavy metals on the immune system at low concentrations. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 2001; 14: 375-386.
199. Martin P., Leibovich S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, 2005; 15: 599-607.
200. Martin P., Poggi M.C., Chambard J.C., Boulukos K.E., Pognonec P. Low dose cadmium poisoning results in sustained ERK phosphorylation and caspase activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 350: 803-807.
201. Maruyama T., Shirai Y., Sakata J., Wakai T., Iwafuchi M., Hatakeyama K. A 1.3-cm carcinoid tumor of the minor duodenal papilla with superior mesenteric lymph node metastases. *Surgery*, 2012; 151: 340-341.
202. Matović V., Buha A., Bulat Z., Đukić-Ćosić D. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 2011; 62: 65-75.
203. Matović V., Buha A., Bulat Z., Đukić-Ćosić D., Miljković M., Ivanišević J., Kotur-Stevuljević J. Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50: 552-557.



204. Matsubara-Khan J., Machida K. Cadmium accumulation in mouse organs during the sequential injections of cadmium-109. *Environmental Research*, 1975; 10: 29-38.
205. McKenna I.M., Waalkes M.P., Chen L.C., Gordon T. Comparison of inflammatory lung responses in Wistar rats and C57 and DBA mice following acute exposure to cadmium oxide fumes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997; 146: 196-206.
206. Mendieta-Wejebe J.E., Miliar-Garcia A., Correa-Basurto J., Sanchez-Rico C., Ramirez-Rosales D., Trujillo-Ferrara J., Rosales-Hernandez M.C. Comparison of the effect of chronic cadmium exposure on the antioxidant defense systems of kidney and brain in rat. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2013; 23: 329-336.
207. Messmer D., Yang H., Telusma G., Knoll F., Li J., Messmer B., Tracey K.J., Chiorazzi N. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *The Journal of Immunology*, 2004; 173: 307-313.
208. Miljkovic D., Stosic-Grujicic S., Markovic M., Momcilovic M., Ramic Z., Maksimovic-Ivanic D., Mijatovic S., Popadic D., Cvetkovic I., Mostarica-Stojkovic M. 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*, 2006; 84: 379-388.
209. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology*, 2000; 164: 6166-6173.
210. Mirkov I., Demenesku J., Popov Aleksandrov A., Ninkov M., Glamoclija J., Kataranovski D., Kataranovski M. Strain differences in the immune mechanisms of resistance of immunocompetent rats to pulmonary aspergillosis. *Immunobiology*, 2015; 220: 1075-1084.
211. Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 1972; 247: 3170-3175.
212. Misra R.R., Hochadel J.F., Smith G.T., Cook J.C., Waalkes M.P., Wink D.A. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chemical Research in Toxicology*, 1996; 9: 326-332.
213. Molin G., Jeppsson B., Johansson M.L., Ahrne S., Nobaek S., Stahl M., Bengmark S. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *Journal of Applied Bacteriology*, 1993; 74: 314-323.



214. Molin G., Johansson M.L., Stahl M., Ahrne S., Andersson R., Jeppsson B., Bengmark S. Systematics of the *Lactobacillus* population on rat intestinal mucosa with special reference to *Lactobacillus reuteri*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1992; 61:1751-83.
215. Moniuszko-Jakoniuk J., Jurczuk M., Galazyn-Sidorczuk M. Evaluation of some immunoregulatory cytokines in serum of rats exposed to cadmium and ethanol. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2009; 18: 673-680.
216. Mousa S.A. Expression of adhesion molecules during cadmium hepatotoxicity. *Life Sciences*, 2004; 75: 93-105.
217. Mowat A.M., Agace W.W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2014; 14: 667-685.
218. Mowat A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, 2003; 3: 331-341.
219. Mullane K.M., Kraemer R., Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *Journal of Pharmacological Methods*, 1985; 14: 157-167.
220. Muller L., Abel J., Ohnesorge F.K. Absorption and distribution of cadmium (Cd), copper and zinc following oral subchronic low level administration to rats of different binding forms of cadmium (Cd-acetate, Cd-metallothionein, Cd-glutathione). *Toxicology*, 1986; 39:187-195.
221. Newberry R.D., Lorenz R.G. Organizing a mucosal defense. *Immunological Reviews*, 2005; 206: 6-21.
222. Nigam D., Shukla G.S., Agarwal A.K. Glutathione depletion and oxidative damage in mitochondria following exposure to cadmium in rat liver and kidney. *Toxicology Letters*, 1999; 106: 151-157.
223. Noda M., Kitagawa M. A quantitative study of iliac bone histopathology on 62 cases with itai-itai disease. *Calcified Tissue International*, 1990; 47: 66-74.
224. Nolan C.V., Shaikh Z.A. An evaluation of tissue metallothionein and genetic resistance to cadmium toxicity in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1986; 85: 135-144.
225. Nordberg G.F. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009; 238: 192-200.
226. Nordberg M., Nordberg G.F. Toxicological aspects of metallothionein. *Cellular and Molecular Biology*, 2000; 46: 451-463.

227. Nriagu J.O. A silent epidemic of environmental metal poisoning?. *Environmental Pollution*, 1988; 50: 139-161.
228. Ogawa T., Kobayashi E., Okubo Y., Suwazono Y., Kido T., Nogawa K. Relationship among prevalence of patients with Itai-itai disease, prevalence of abnormal urinary findings, and cadmium concentrations in rice of individual hamlets in the Jinzu River basin, Toyama prefecture of Japan. *International Journal of Environmental Health Research*, 2004; 14: 243-252.
229. Ognjanovic B.I., Pavlovic S.Z., Maletic S.D., Zikic R.V., Stajn A.S., Radojicic R.M., Saicic Z.S., Petrovic V.M. Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiological Research*, 2003; 52: 563-570.
230. Ogunrinola O.O., Wusu D.A., Fajana O.O., Olaitan S.N., Smith Z.O., Bolaji A.R. Effect of low level cadmium exposure on superoxide dismutase activity in rat. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2016; 15: 115-119.
231. Ohsawa M., Masuko-Sato K., Takahashi K., Otsuka F. Strain differences in cadmium-mediated suppression of lymphocyte proliferation in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1986; 84: 379-388.
232. Olszowski T., Baranowska-Bosiacka I., Gutowska I., Chlubek D. Pro-inflammatory properties of cadmium. *Acta Biochimica Polonica*, 2012; 59:475-482.
233. Park J.D., Cherrington N.J., Klaassen C.D. Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats. *Toxicological Sciences*, 2002; 68: 288-294.
234. Pathak N., Khandelwal S. Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Toxicology Letters*, 2007; 169: 95-108.
235. Perelmuter K., Fraga M., Zunino P. In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *Journal of Applied Microbiology*, 2008; 104: 1718-1725.
236. Pinot F., Kreps S.E., Bachelet M., Hainaut P., Bakonyi M., Polla B.S. Cadmium in the environment: sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Reviews on Environmental Health*, 2000; 15: 299-324.
237. Popov Aleksandrov A., Mirkov I., Demenesku J., Ninkov M., Zolotarevski L., Kataranovski D., Kataranovski M. Strain differences in contact hypersensitivity reaction to dinitrochlorobenzene (DNCEB) in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2015; 75: 94-103.

238. Prozialeck W.C., Edwards J.R., Nebert D.W., Woods J.M., Barchowsky A., Atchison W.D. The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicological Sciences*, 2008; 102: 207-218.
239. Prozialeck W.C. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000; 164: 231-249.
240. Putnam C.D., Arvai A.S., Bourne Y., Tainer J.A. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 2000; 296: 295-309.
241. Rahman I., Kode A., Biswas S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 2006; 1: 3159-3165.
242. Rahman I., MacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000; 28: 1405-1420.
243. Rahman I., MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax*, 1998; 53: 601-612.
244. Rana S.V., Verma S. Protective effects of GSH, vitamin E, and selenium on lipid peroxidation in cadmium-fed rats. *Biological Trace Element Research*, 1996; 51: 161-168.
245. Randa A.H., Dawlat M.A., Nariman A.R., Hatem M.E., Dessouky M.I. Clinicopathological, histopathological and immunological studies on animals exposed to lead and cadmium under experimental conditions. *New York Science Journal*, 2012; 5: 12.
246. Randow F., Syrbe U., Meisel C., Krausch D., Zuckermann H., Platzer C., Volk HD. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *The Journal of Experimental Medicine*, 1995; 181: 1887-1892.
247. Rani A., Kumar A., Lal A., Pant M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International Journal of Environmental Health Research*, 2014; 24: 378-399.
248. Reeves P.G., Chaney R.L. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. *Science of the Total Environment*, 2008; 398:13-19.

249. Remans P.H., Van Oosterhout M., Smeets T.J., Sanders M., Frederiks W.M., Reedquist K.A., Tak P.P., Breedveld F.C., Van Laar J.M. Intracellular free radical production in synovial T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 2005; 52: 2003-2009.
250. Rendon-Mitchell B., Ochani M., Li J., Han J., Wang H., Yang H., Susarla S., Czura C., Mitchell R.A., Chen G., Sama A.E. IFN- $\gamma$  induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 2003; 170: 3890-3897.
251. Richter E, Feyerabend T, Richter E., 1991. Normal lymph node topography. Berlin Heidelberg, New York, Tokyo: Springer.
252. Rikans L.E., Yamano T. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2000; 14: 110-117.
253. Rock K.L., Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annual Review of Pathology*, 2008; 3: 99-126.
254. Roos D., Boer M. Molecular diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 2014; 175: 139-149.
255. Rusanov A.L., Smirnova A.V., Poromov A.A., Fomicheva K.A., Luzgina N.G., Majouga A.G. Effects of cadmium chloride on the functional state of human intestinal cells. *Toxicology in Vitro*, 2015; 29: 1006-1011.
256. Rugtveit J., Brandtzaeg P., Halstensen T.S., Fausa O., Scott H. Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut*, 1994; 35: 669-674.
257. Ryu D.Y., Lee S.J., Park D.W., Choi B.S., Klaassen C.D., Park J.D. Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. *Toxicology Letters*, 2004; 152: 19-25.
258. Sakuraba A., Sato T., Kamada N., Kitazume M., Sugita A., Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2009; 137: 1736-1745.
259. Sappington P.L., Yang R., Yang H., Tracey K.J., Delude R.L., Fink M.P. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology*, 2002; 123: 790-802.
260. Sarkar A.N., Ravindran G.E., Krishnamurthy V.I. A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. *International Journal of Biotechnology Research*, 2013; 3: 17-36.

261. Sarkar B. Metal replacement in DNA-binding zinc finger proteins and its relevance to mutagenicity and carcinogenicity through free radical generation. *Nutrition*, 1994; 11: 646-649.
262. Sarkar S., Yadav P., Bhatnagar D. Lipid peroxidative damage on cadmium exposure and alterations in antioxidant system in rat erythrocytes: A study with relation to time. *Biometals*, 1998; 11: 153-157.
263. Sarra M., Pallone F., MacDonald T.T., Monteleone G. IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2010; 16: 1808-1813.
264. Satarug S., Garrett S.H., Sens M.A., Sens D.A. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental Health Perspectives*, 2010; 118: 182-190.
265. Satarug S., Haswell-Elkins M.R., Moore M.R. Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 2000; 84: 791-802.
266. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 2002; 418: 191-195.
267. Schnell R.C., Yuhas E.M., Pence D.H., Means J.R., Roberts S.A., Yau E.T., Miya T.S., Mennear J.H. Effect of acute and chronic cadmium treatment on hepatic drug metabolism in male rats. *Archives of Toxicology*, 1978; 40: 269-277.
268. Schulte S., Mengel K., Gatke U., Friedberg K.D. No influence of cadmium on the production of specific antibodies in mice. *Toxicology*, 1994; 93: 263-268.
269. Sedgwick J.B., Vrtis R.F., Gourley M.F., Busse W.W. Stimulus-dependent differences in superoxide anion generation by normal human eosinophils and neutrophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1988; 81: 876-883.
270. Seidal K., Jorgensen N., Elinder C.G., Sjogren B., Vahter M. Fatal cadmium-induced pneumonitis. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 1993; 1: 429-431.
271. Shaikh Z.A., Jordan S.A., Tewari P.C. Cadmium disposition and metallothionein induction in mice: strain-, sex-, age-, and dose-dependent differences. *Toxicology*, 1993; 80: 51-70.
272. Shaikh Z.A., Vu T.T., Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999; 154: 256-263.

273. Shen Y., Sangiah S. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, glutathione, and hydroxyl free radicals in cadmium chloride-induced testicular toxicity in mice. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1995; 29: 174-179.
274. Sherwood E.R., Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology*, 2004; 18: 385-405.
275. Shi G., Chen Z., Xu S., Zhang J., Wang L., Bi C., Teng J. Potentially toxic metal contamination of urban soils and roadside dust in Shanghai, China. *Environmental Pollution*, 2008; 156: 251-260.
276. Shimada H., Hata I., Hashiguchi T., Imamura Y. Genetic background of resistance to cadmium-induced testicular toxicity in inbred Wistar-Imamichi rats. *Archives of Toxicology*, 2011; 85: 1195-1199.
277. Shimada H., Narumi R., Nagano M., Yasutake A., Waalkes M.P., Imamura Y. Strain difference of cadmium-induced testicular toxicity in inbred Wistar-Imamichi and Fischer 344 rats. *Archives of Toxicology*, 2009; 83: 647-652.
278. Shimada H., Takamure Y., Shimada A., Yasutake A., Waalkes M.P., Imamura Y. Strain differences of cadmium-induced hepatotoxicity in Wistar-Imamichi and Fischer 344 rats: involvement of cadmium accumulation. *Toxicology*, 2004; 203: 189-197.
279. Shimada H., Yasutake A., Hirashima T., Takamure Y., Kitano T., Waalkes M.P., Imamura Y. Strain difference of cadmium accumulation by liver slices of inbred Wistar-Imamichi and Fischer 344 rats. *Toxicology in Vitro*, 2008; 22: 338-343.
280. Shukla G.S., Hussain T., Srivastava R.S., Chandra S.V. Glutathione peroxidase and catalase in liver, kidney, testis and brain regions of rats following cadmium exposure and subsequent withdrawal. *Industrial Health*, 1989; 27: 59-69.
281. Slack E., Hapfelmeier S., Stecher B., Velykoredko Y., Stoel M., Lawson M., Geuking M.B., Beutler B., Tedder T.F., Hardt W.D., Bercik P. A flexible continuum between adaptive and innate immunity in maintaining host-microbiota mutualism. *Science*, 2009; 325: 617-620.
282. Sorahan T., Lister A., Gilthorpe M.S., Harrington J.M. Mortality of copper cadmium alloy workers with special reference to lung cancer and non-malignant diseases of the respiratory system, 1946-92. *Occupational and Environmental Medicine*, 1995; 52: 804-812.
283. Souza V., del Carmen Escobar M., Gomez-Quiroz L., Bucio L., Hernandez E., Cossio E.C., Gutierrez-Ruiz M.C. Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA

- binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology*, 2004; 197: 213-228.
284. Stajn A., Zikic R.V., Ognjanovic B., Saicic Z.S., Pavlovic S.Z., Kostic M.M., Petrovic V.M. Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1997; 117: 167-172.
285. Stanisavljevic S., Lukic J., Momcilovic M., Miljkovic M., Jevtic B., Kojic M., Golic N., Mostarica Stojkovic M., Miljkovic D. Gut-associated lymphoid tissue, gut microbes and susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Beneficial Microbes*, 2016; 7: 363-373.
286. Stosic J., Mirkov I., Belij S., Nikolic M., Popov A., Kataranovski D., Kataranovski M. Gender differences in pulmonary inflammation following systemic cadmium administration in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2010; 23: 293-299.
287. Strober W., Fuss I.J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2011; 140: 1756-1767.
288. Sughis M., Penders J., Haufroid V., Nemery B., Nawrot T.S. Bone resorption and environmental exposure to cadmium in children: a cross-sectional study. *Environmental Health*, 2011; 10: 1-6.
289. Szkaradkiewicz A., Marciniak R., Chudzicka-Strugala I., Wasilewska A., Drews M., Majewski P., Karpinski T., Zwodziak B. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2009; 57: 291-294.
290. Tallkvist J., Bowlus C.L., Lonnerdal B. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicology Letters*, 2001; 122: 171-177.
291. Tang D., Shi Y., Kang R., Li T., Xiao W., Wang H., Xiao X. Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007; 81: 741-747.
292. Tarasub N., Tarasub C., Ayutthaya W.D. Histological changes of spleen, stomach and small intestine induced by cadmium in rats and the protective effect of curcumin. *Thammasat Medical Journal*, 2010; 9: 213-224.
293. Tellez-Plaza M., Guallar E., Howard B.V., Umans J.G., Francesconi K.A., Goessler W., Silbergeld E.K., Devereux R.B., Navas-Acien A. Cadmium exposure and incident cardiovascular disease. *Epidemiology*, 2013; 24: 421-429.



294. Theocharis S.E., Souliotis V.L., Panayiotidis P.G. 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*, 1994; 69: 132-136.
295. Thevenod F. Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells. *Biometals*, 2010; 23: 857-875.
296. Thomas P.T., Ratajczak H.V., Aranyi C., Gibbons R., Fenters J.D. Evaluation of host resistance and immune function in cadmium-exposed mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1985; 80: 446-456.
297. Tilney N.L. Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *Journal of Anatomy*, 1971; 109: 369-383.
298. Tzirogiannis K.N., Panoutsopoulos G.I., Demonakou M.D., Hereti R.I., Alexandropoulou K.N., Basayannis A.C., Mykoniatis M.G. Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver: the role of apoptosis. *Archives of Toxicology*, 2003; 77: 694-701.
299. Ullum H.E., Haahr P.M., Diamant M.A., Palmo J., Halkjaer-Kristensen J., Pedersen B.K. 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*, 1994; 77: 93-97.
300. Uzelac G., Miljkovic M., Lozo J., Radulovic Z., Tosic N., Kojic M. Expression of bacteriocin LsbB is dependent on a transcription terminator. *Microbiological Research*, 2015; 179: 45-53.
301. Vahter M., Berglund M., Åkesson A., Liden C. Metals and women's health. *Environmental Research*, 2002; 88: 145-155.
302. Valberg L.S., Haist J., Cherian M.G., Delaquerriere-Richardson L., Goyer R.A. Cadmium-induced enteropathy: Comparative toxicity of cadmium chloride and cadmium-thionein. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1977; 2: 963-975.
303. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico - Biological Interactions*, 2006; 160: 1-40.
304. Valladares R., Sankar D., Li N., Williams E., Lai K.K., Abdelgeliel A.S., Gonzalez C.F., Wasserfall C.H., Larkin III J., Schatz D., Atkinson M.A. *Lactobacillus*



- johnsonii N6. 2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP rats. *Plos one*, 2010; 5:e10507.
305. van Baarlen P., Wells J.M., Kleerebezem M. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends in Immunology*, 2013; 34: 208-215.
306. Veal E.A., Toone W.M., Jones N., Morgan B.A. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277: 35523-35531.
307. Verschure P.J., Noorden C., Dijkstra C.D. Macrophages and dendritic cells during the early stages of antigen-induced arthritis in rats: Immunohistochemical analysis of cryostat sections of the whole knee joint. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1989; 29: 371-381.
308. Vesey D.A. Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: focus on the interaction with essential metals. *Toxicology Letters*, 2010; 198: 13-19.
309. Vilaboa N.E., Garcia-Bermejo L., Perez C., de Blas E., Calle C., Aller P. Heat-shock and cadmium chloride increase the vimentin mRNA and protein levels in U-937 human promonocytic cells. *Journal of Cell Science*, 1997; 110: 201-207.
310. Waalkes M.P., Rehm S. Chronic toxic and carcinogenic effects of cadmium chloride in male DBA/2NCR and NFS/NCR mice: strain-dependent association with tumors of the hematopoietic system, injection site, liver, and lung. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1994; 23: 21-31.
311. Waeys A., De Vos M., Laukens D. Evidence for a potential role of metallothioneins in inflammatory bowel diseases. *Mediators of Inflammation*, 2009; 2009: 729172.
312. Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 2003; 192: 95-117.
313. Walrand S., Valeix S., Rodriguez C., Ligot P., Chassagne J., Vasson M.P. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clinica Chimica Acta*, 2003; 331: 103-110.
314. Wang B., Du Y. Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013; 2013: 898034.
315. 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. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 1999a; 285: 248–251.
316. Wang H., Vishnubhakat J.M., Bloom O., Zhang M., Ombrellino M., Sama A., Tracey K.J. Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituicytes. *Surgery*, 1999b; 126: 389-392.
317. Wang H., Zhu G., Shi Y., Weng S., Jin T., Kong Q., Nordberg G.F. Influence of environmental cadmium exposure on forearm bone density. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2003; 18: 553-560.
318. Wang L., Chen D., Cao .J, Liu Z. Protective effect of N-acetylcysteine on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in immature female rats. *Human and Experimental Toxicology*, 2009; 28: 221-229.
319. Weaver C.T., Hatton R.D., Mangan P.R., Harrington L.E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual Review of Immunology*, 2007; 25: 821-852.
320. Werner U., Szelenyi I. Measurement of MPO activity as model for detection of granulocyte infiltration in different tissues. *Agents and Actions*, 1992; 36: C101-C103.
321. Wesenberg G.B., Wesenberg F. Effect of cadmium on the immune response in rats. *Environmental Research*, 1983; 31: 413-419.
322. WHO, 1992. *Environmental Health Criteria 134: Cadmium*, first ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
323. WHO, 2011. *Guidelines for Drinking-Water Quality: Cadmium in Drinking-water*, fourth ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
324. Wu Y., Lu J., Antony S., Juhasz A., Liu H., Jiang G., Meitzler J.L., Hollingshead M., Haines D.C., Butcher D., Roy K. Activation of TLR4 is required for the synergistic induction of dual oxidase 2 and dual oxidase A2 by IFN- $\gamma$  and lipopolysaccharide in human pancreatic cancer cell lines. *Journal of Immunology*, 2013; 190: 1859-1872.
325. Xu C., Johnson J.E., Singh P.K., Jones M.M., Yan H., Carter C.E. In vivo studies of cadmium-induced apoptosis in testicular tissue of the rat and its modulation by a chelating agent. *Toxicology*, 1996; 107: 1-8.

326. Xu C., Liu C., Liu L., Zhang R., Zhang H., Chen S., Luo Y., Chen L., Huang S. Rapamycin prevents cadmium-induced neuronal cell death via targeting both mTORC1 and mTORC2 pathways. *Neuropharmacology*, 2015; 97: 35-45.
327. Xu G., Zhou G., Jin T., Zhou T., Hammarstrum S., Bergh A., Nordberg G. Apoptosis and p53 gene expression in male reproductive tissues of cadmium exposed rats. *Biometals*, 1999; 12: 131-139.
328. Yamada Y.K., Shimizu F., Kawamura R., Kubota K. Thymic atrophy in mice induced by cadmium administration. *Toxicology Letters*, 1981; 8: 49-55.
329. Yang X.F., Fan G.Y., Liu D.Y., Zhang H.T., Xu Z.Y., Ge Y.M., Wang Z.L. Effect of cadmium exposure on the histopathology of cerebral cortex in juvenile mice. *Biological Trace Element Research*, 2015; 165: 167-172.
330. Yen D., Cheung J., Scheerens H., Poulet F., McClanahan T., McKenzie B., Kleinschek M.A., Owyang A., Mattson J., Blumenschein W., Murphy E. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *Journal of Clinical Investigation*, 2006; 116: 1310-1316.
331. Yucesoy B., Turhan A., Ure M., Imir T., Karakaya A. Effects of occupational lead and cadmium exposure on some immunoregulatory cytokine levels in man. *Toxicology*, 1997; 123: 143-147.
332. Zalups R.K., Ahmad S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003; 186: 163-188.
333. Zhai Q., Wang G., Zhao J., Liu X., Tian F., Zhang H., Chen W. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013; 79: 1508-1515.
334. Zhang D., Wu W., Yan H., Jiang T., Liu M., Yu Z., Li H., Hang C. Upregulation of HMGB1 in wall of ruptured and unruptured human cerebral aneurysms: preliminary results. *Neurological Sciences*, 2016; 37: 219-226.
335. Zhang W.L., Du Y., Zhai M.M., Shang Q. Cadmium exposure and its health effects: A 19-year follow-up study of a polluted area in China. *Science of the Total Environment*, 2014; 470: 224-228.
336. Zhao Z., Hyun J.S., Satsu H., Kakuta S., Shimizu M. Oral exposure to cadmium chloride triggers an acute inflammatory response in the intestines of mice, initiated by the over-expression of tissue macrophage inflammatory protein-2 mRNA. *Toxicology Letters*, 2006; 164: 144-154.

337. Zhong Z., Troll W., Koenig K.L., Frenkel K. Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Research*, 1990; 50: 7564-7570.
338. Zikic R.V., Stajn A.S., Ognjanovic B.I., Saicic Z.S., Kostic M.M., Pavlovic S.Z., Petrovic V.M. The effect of cadmium and selenium on the antioxidant enzyme activities in rat heart. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 1998; 17: 259-264.
339. Zota A.R., Needham B.L., Blackburn E.H., Lin J., Park S.K., Rehkopf D.H., Epel E.S. Associations of cadmium and lead exposure with leukocyte telomere length: findings from National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2002. *American Journal of Epidemiology*, 2015; 181: 127-136.

## 8. BIOGRAFIJA

Marina M. Ninkov rođena je 1983. godine u Beogradu, Republika Srbija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 2002/2003. godine, na smeru Molekularna biologija i fiziologija. Fakultet je završila u decembru 2010. godine, sa prosečnom ocenom studiranja 8.35 i diplomskim radom sa ocenom 10. Školske 2012/2013. godine upisala je doktorske studije na modulu Imunobiologija Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od 01.04.2012. godine zaposlena je na Odeljenju za Ekologiju, u grupi za imunotoksikologiju Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković”, a u zvanje istraživač saradnik Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” izabrana je 2013. godine. Marina je do sada bila autor/koautor na 14 radova u međunarodnim časopisima, ima šest saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i tri saopštenja na skupovima nacionalnog značaja.

Kao dobitnik stipendije koju dodeljuje WUS Austria, Marina je 2015. godine provela mesec dana na Medicinskom Univerzitetu u Gracu, Austrija, kao gostujući naučnik.

Od 2015. godine je aktivni član Društva imunologa Srbije.