

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena B. Kulaš

**EFEKAT ORALNE PRIMENE KADMIJUM-  
HLORIDA NA IMUNSKI ODGOVOR U  
PLUĆIMA PACOVA U FIZIOLOŠKIM I  
PATOLOGIJSKIM USLOVIMA INFEKCIJE  
IZAZVANE OPORTUNISTIČKOM GLJIVOM  
*ASPERGILLUS FUMIGATUS***

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Jelena B. Kulaš

**EFFECTS OF ORAL CADMIUM-CHLORIDE  
INTAKE ON IMMUNE RESPONSE IN THE  
LUNGS OF RATS IN PHYSIOLOGICAL AND  
PATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS OF  
INFECTION WITH OPPORTUNISTIC FUNGUS  
*ASPERGILLUS FUMIGATUS***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTORI:

**Dr Ivana Mirkov**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

**Dr Mirela Ukropina**, docent

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

**Dr Biljana Božić Nedeljković**, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Dr Maja Čakić-Milošević**, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Dr Jasmina Glamočlija**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

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

*Posvećeno mami i tati. Hvala za svu ljubav i podršku tokom mog školovanja i usavršavanja.*

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za ekologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”- Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta #173039, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvaljujem se:

*Dr Mileni Kataranovski*, na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da postanem deo grupe za Imunotoksikologiju. Hvala na prenetom znanju, korisnim savetima i podršci.

*Dr Ivani Mirkov*, mom mentoru, na zalaganju, pomoći, strpljenju, razumevanju i stručnim savetima koje mi je pružala od prvih koraka mog eksperimentalnog i naučnog rada do kraja izrade doktorske disertacije.

*Dr Mireli Ukropini*, mom mentoru sa Biološkog fakulteta, na strpljenju, temeljnosti i značajnim sugestijama tokom čitanja disertacije koje su bitno doprinele njenom kvalitetu.

*Dr Biljni Božić Nedeljković* koja me je prva uvela u zanimljivi svet imunobiologije i zbog čijih sam predavanja poželela da se dalje usavršavam u ovoj oblasti. Hvala i na korisnim sugestijama i savetima koje su unapredile ovu disertaciju.

*Dr Maji Čakić Milošević* na histopatološkoj analizi tkiva pluća, stručnim savetima i konstruktivnim sugestijama koje su doprinele izradi disertacije.

*Dr Jasmini Glamočliji* koja je omogućila korišćenje oportunističke gljive *A. fumigatus* u eksperimentima i koja je svojim stručnim znanjem i sugestijama doprinela izradi disertacije.

*Dr Jeleni Mutić*, na određivanju koncentracije kadmijuma u organima i tkivima.

*Dragim kolegicama: dr Dini Tucović, dr Aleksandri Popov Aleksandrov, Dušanki Popović i Anastasiji Malešević* na druženju i nesebičnoj pomoći i podršci tokom eksperimentalne izrade teze.

Svim kolegama sa Odeljenja za Imunologiju na prijateljskoj atmosferi i druženju u našoj zajedničkoj laboratoriji 66.

*Dragim prijateljima Jovani Mitić i Blagoju Murganiću* na iskrenoj podršci i razumevanju tokom svih ovih godina.

Mojim najboljim i najdražim rođacima na neprekidnom bodrenju i podršci.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegici *dr Dijani Drači*, koja mi je pokazala te 2016. godine na koja vrata treba da pokucam.

# EFEKAT ORALNE PRIMENE KADMIJUM-FLORIDA NA IMUNSKI ODGOVOR U PLUĆIMA PACOVA U FIZIOLOŠKIM I PATOFIZIOLOŠKIM USLOVIMA INFEKCIJE IZAZVANE OPORTUNISTIČKOM GLJIVOM *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

## SAŽETAK

Kadmijum je jedan od najtoksičnijih teških metala kojem je opšta populacija izložena najvećim delom preko zagađene hrane. Iako je poznato da se kadmijum unet u organizam oralnim putem deponuje u plućima, retki su podaci o imunskom odgovoru u plućima na ovaj metal. Imunomodulatorni efekat kadmijuma koji u organizam dospeva oralnim putem (30 dana u vodi za piće) je ispitan u fiziološkim uslovima merenjem promena u ćelijskim i molekulskim mehanizmima imunskog odgovora na neletalne doze metala (5 i 50 mg/l) kod pacova i u patofiziološkim uslovima infekcije izazvane oportunističkom gljivom *Aspergillus fumigatus*. Ispitana je i uloga aril-ugljovodoničnog receptora (AhR) u imunotoksičnosti kadmijuma. U fiziološkim uslovima, prisustvo kadmijuma u plućima je izazvalo oksidativni stres, inflamaciju i oštećenje tkiva. Kadmijum je ispoljio diferencijalne efekte na aktivnosti leukocita pluća (nepromenjena produkcija reaktivnih oblika kiseonika i azota, inhibicija IL-1 $\beta$  i TNF, stimulacija MPO i IFN- $\gamma$ ) pri čemu su efekti kadmijuma na produkciju citokina posredovani aktivacijom AhR. U patofiziološkim uslovima infekcije izazvane gljivom *A. fumigatus*, kadmijum je doveo do efikasnijeg uklanjanja gljive iz tkiva (direktno je suprimirao rast gljive, povećao broj peharastih ćelija i produkciju mukusa i doveo do intenzivnije diferencijacije T-ćelija u pravcu Th17 T-ćelija u regionalnim limfnim čvorovima i njihove veće aktivnosti u tkivu pluća). Intenzivniji odgovor na gljivu kod jedinki koje su pile kadmijum je uzrokovao veće oštećenje tkiva pluća. Proinflamatorno mikrokruženje u plućima koje uspostavlja kadmijum, čini ovaj teški metal faktorom rizika za razvoj hronične inflamacije niskog stepena u plućima što bi moglo da utiče na osetljivost organizma u različitim patofiziološkim uslovima.

**Ključne reči:** oralni unos kadmijuma, DA pacovi, imunski sistem pluća, aril-ugljovodonični receptor, *Aspergillus fumigatus*

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Imunobiologija

**UDK broj:** [615.838.9+546.48]:[611.24+612.112](043.3)

**EFFECTS OF ORAL CADMIUM-CHLORIDE INTAKE ON IMMUNE RESPONSE IN  
THE LUNGS OF RATS IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL  
CONDITIONS OF INFECTION WITH OPPORTUNISTIC FUNGUS *ASPERGILLUS  
FUMIGATUS***

**ABSTRACT**

Cadmium is one of the most toxic heavy metals to which the general population is exposed mostly through contaminated food. Although cadmium taken orally is known to be deposited in the lungs, there is little evidence of an immune response in the lungs to this metal. The immunomodulatory effect of cadmium reaching the body orally (30 days in drinking water) was examined under physiological conditions by measuring changes in cellular and molecular mechanisms of the immune response to non-lethal metal doses (5 and 50 mg/l) in rats and pathophysiological conditions of infection caused by opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. The role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in cadmium immunotoxicity was also investigated. Under physiological conditions, the presence of cadmium in the lungs caused oxidative stress, inflammation, and tissue damage. Cadmium exhibited differential effects on lung leukocyte activity (unchanged production of reactive oxygen species and nitrogen, inhibition of IL-1 $\beta$  and TNF, stimulation of MPO and IFN- $\gamma$ ) with cadmium effects on cytokine production mediated by AhR activation. In the pathophysiological conditions of infection caused by *A. fumigatus*, cadmium led to more efficient removal of fungus from tissues (directly suppressing fungal growth, increasing goblet cell count and mucus production, and leading to more intense T-cell differentiation towards Th17 T-cells in regional lymph nodes and their greater activity in lung tissue). A more intense response to the fungus in individuals who drank cadmium caused greater damage to lung tissue. The proinflammatory microenvironment in the lungs established by cadmium makes this heavy metal a risk factor for the development of low-grade chronic inflammation in the lungs, which could affect the sensitivity of the organism in various pathophysiological conditions.

**Key words:** Oral cadmium intake, DA rats, lung immune system, aryl hydrocarbon receptor, *Aspergillus fumigatus*

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Immunobiology

**UDK number:** [615.838.9+546.48]:[611.24+612.112](043.3)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Kadmijum - hemijske i fizičke osobine i njegova primena.....	2
1.2. Putevi izloženosti ljudi kadmijumu, njegova apsorpcija, distribucija i ekskrecija .....	3
1.3. Toksičnost i mehanizmi toksičnosti kadmijuma .....	6
1.3.1. Oksidativni stres izazvan kadmijumom .....	7
1.3.2. Efekat kadmijuma na imunski sistem (imunotoksičnost).....	8
1.3.2.1. Ukratko o imunskom sistemu.....	8
1.3.2.2. Efekat kadmijuma na urođenu imunost.....	8
1.3.2.3. Efekat kadmijuma na adaptivnu imunost .....	11
1.3.3. Uloga aril-ugljovodoničnog receptora ( <i>engl.</i> Aryl hydrocarbon Receptor, AhR) u toksičnosti izazvanoj kadmijumom .....	12
1.4. Histološka građa pluća pacova .....	13
1.5. Toksičnost kadmijuma prema plućima .....	15
1.5.1. Bolesti pluća povezane sa izloženošću kadmijumu .....	15
1.5.2. Toksičnost kadmijuma unetog inhalacijom.....	16
1.5.3. Toksičnost kadmijuma unetog oralnim putem .....	17
1.5.4. Efekat kadmijuma na imunski odgovor u plućima u patofiziološkim uslovima .....	18
1.6. Oportunistička gljiva <i>Aspergillus fumigatus</i> (Fresenius, 1863) .....	18
<b>2. CILJ RADA</b> .....	20
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	22
3.1. Hemikalije i reagensi.....	23
3.2. Eksperimentalne životinje i tretmani.....	24
3.2.1. Eksperimentalne životinje .....	24
3.2.2. Oralni tretman kadmijum-hloridom .....	24
3.2.3. Uspostavljanje infekcije oportunističkom gljivom <i>Aspergillus fumigatus</i> kod jedinki koje su tretirane kadmijum-hloridom .....	25
3.2.4. Izolacija i obrada tkiva .....	25
3.3. Određivanje koncentracije kadmijuma u tkivima i organima .....	25
3.4. Histološka analiza tkiva pluća .....	26
3.5. Procena oksidativnog stresa u plućima .....	26
3.5.1. Priprema homogenata tkiva.....	26
3.5.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju .....	27
3.5.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT, EC 1.11.1.6) .....	27
3.5.4. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1).....	27
3.5.5. Određivanje količine lipidnih peroksida merenjem nivoa malon-dialdehida (MDA) u tkivu.....	27
3.6. Kvantitativna kultura gljive.....	28
3.7. Određivanje aktivnosti leukocita pluća .....	28
3.7.1. Izolacija leukocita iz pluća .....	28
3.7.2. Određivanje ukupnog broja i diferencijalnog sastava leukocita pluća .....	28
3.7.3. Kultura ćelija pluća .....	28
3.7.4. Određivanje nivoa azot-monoksida (NO) .....	28
3.7.5. Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO, E.C.1.11.1.7).....	29
3.7.6. Određivanje oksidativne aktivnosti leukocita iz pluća.....	29
3.8. Izolacija i kultura ćelija limfnih čvorova medijastinuma.....	29
3.9. <i>In vitro</i> efekat kadmijuma na leukocite pluća - ispitivanje uloge aril-ugljovodoničnog receptora .....	30
3.10. Izolovanje ukupne RNK, reakcije reverzne transkripcije i kvantitativna reakcija lančanog	



umnožavanja u realnom vremenu ( <i>engl.</i> Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, Real-Time qPCR).....	30
3.10.1. Izolovanje ukupne RNK.....	30
3.10.2. Reakcija reverzne transkripcije .....	30
3.10.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu.....	30
3.11. Određivanje koncentracije citokina imunoenzimskim testom na čvrstoj fazi ( <i>engl.</i> Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) .....	31
3.12. Određivanje direktnog efekta kadmijuma na rast <i>A. fumigatus</i> .....	31
3.13. Statistička obrada rezultata.....	31
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>33</b>
4.1. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma u fiziološkim uslovima .....	34
4.1.1. Osnovni podaci.....	34
4.1.2. Histološka analiza pluća nakon produženog oralnog unosa kadmijuma.....	34
4.1.3. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na odgovor u plućima .....	37
4.1.4. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na leukocite izolovane iz pluća.....	39
4.1.5. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na odgovor limfnih čvorova medijastinuma .....	42
4.2. Uloga aril-ugljovodoničnog receptora u imunotoksičnosti izazvanoj kadmijumom .....	44
4.2.1 Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na nivo iRNK za AhR, CYP1A1 i CYP1B1 u leukocitima pluća .....	44
4.2.2. Efekat kadmijuma na nivo iRNK za AhR, CYP1A1 i CYP1B1 leukocita izolovanih iz pluća zdravih netretiranih jedinki <i>in vitro</i> .....	44
4.2.3. Uloga AhR u produkciji citokina u leukocitima pluća u odgovoru na kadmijum .....	46
4.3. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na pluća u patofiziološkim uslovima tokom infekcije izazvane oportunističkom gljivom <i>A. fumigatus</i> .....	48
4.3.1. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na eliminaciju gljive <i>A. fumigatus</i> iz pluća .....	48
4.3.2. Direktna efekta kadmijuma na gljivu <i>A. fumigatus</i> .....	48
4.3.3. Histološka analiza pluća inficiranih jedinki nakon produženog oralnog unosa kadmijuma.....	49
4.3.4. Oštećenje tkiva pluća nakon infekcije gljivom <i>A. fumigatus</i> .....	52
4.3.5. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na odgovor pluća tokom infekcije izazvane gljivom <i>A. fumigatus</i> .....	52
4.3.6. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na odgovor leukocita pluća na prisustvo gljive <i>A. fumigatus</i> .....	53
4.3.7. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na odgovor limfnih čvorova medijastinuma na prisustvo gljive <i>A. fumigatus</i> .....	57
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	<b>59</b>
5.1. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na pluća u fiziološkim uslovima meren promenama u ćelijskim i molekulskim mehanizmima imunskog odgovora .....	60
5.2. Efekat kadmijuma delom je posredovan aktivacijom AhR.....	62
5.3. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na pluća u patofiziološkim uslovima tokom infekcije izazvane oportunističkom gljivom <i>A. fumigatus</i> .....	63
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>66</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>68</b>

# 1. UVOD

Spoljašnja (životna) sredina je okruženje u kome ljudi, biljke, životinje i mikroorganizmi žive i međusobno deluju jedni na druge, a u kojoj su obezbeđeni resursi neophodni za preživljavanje živih bića. Pored toga, spoljašnja sredina predstavlja i izvor fizičkih, hemijskih i bioloških agenasa koji mogu da utiču na kvalitet životne sredine i zdravlje živih organizama (zagađivači životne sredine). Nakon industrijske revolucije, antropogena aktivnost je najviše doprinela promeni stanja i uslova u životnoj sredini, iako povećanju stepena zagađenja spoljašnje sredine doprinose i prirodni procesi (fizičko-hemijsko raspadanje stena, erozija zemljišta, šumski požari i vulkanske erupcije) (Tchounwou i drugi, 2012). Nemarna eksploatacija prirodnih resursa, povećana industrijska proizvodnja, emisija zagađujućih materija u vodu, vazduh ili zemljište, povećanje stepena buke i vibracija, kao i neselektivna upotreba pesticida, boja, teških metala, plastike, deterdženata i kozmetike narušavaju ekološku i biološku ravnotežu. Sa povećanjem stepena zagađenja životne sredine došlo je i do razvoja naučnih disciplina koje se bave proučavanjem efekta toksičnih agenasa prisutnih u spoljašnjoj sredini na funkciju ćelija, organa i organizama kao celine, a savremena epidemiološka istraživanja su ukazala na vezu između izloženosti zagađivačima i štetnih efekata po zdravlje ljudi (Chen i drugi, 1998; Olsen i drugi, 2009; Pope i drugi, 2004). Povećanje svesti o negativnim efektima zagađenja na kvalitet same životne sredine i na zdravlje živih bića je rezultiralo donošenjem zakonskih regulativa, kojima se uređuje sistem zaštite životne sredine i određuju mere za sprečavanje, kontrolu, smanjenje ili saniranje svih oblika zagađenja životne sredine (Zakon o zaštiti životne sredine, "Sl. glasnik RS", br. 135/2004, 36/2009, 36/2009 - dr. zakon, 72/2009 - dr. zakon, 43/2011 - odluka US, 14/2016, 76/2018, 95/2018 - dr. zakon i 95/2018 - dr. zakon).

Efekat hemijskih zagađivača na zdravlje ljudi najviše je ispitivan od svih toksičnih agenasa (fizičkih, hemijskih i bioloških) prisutnih u spoljašnjoj sredini. Pod hemijskim zagađivačima životne sredine podrazumevaju se hemikalije čije ispuštanje u životnu sredinu utiče ili može uticati na kvalitet životne sredine. Ove hemikalije su prisutne u koncentraciji koja prevazilazi kapacitet životne sredine (sposobnost životne sredine da prihvati određenu količinu zagađujućih materija po jedinici vremena i prostora tako da ne nastupi nepovratna šteta) (Gautam i drugi, 2016; Martin i Johnson, 2012; Masindi i Muedi, 2018; Paithankar i drugi, 2021; Walker i drugi, 2012). Među najveće hemijske zagađivače životne sredine spadaju: neorganska, organska i organometalna jedinjenja, radioaktivni izotopi, gasovi i nanočestice (Walker i drugi, 2012). Prisustvo teških metala u životnoj sredini privlači posebnu pažnju istraživača zbog činjenice da oni ne podležu hemijskoj transformaciji i stoga trajno ostaju u životnoj sredini, kao i sposobnosti da se akumuliraju u tkivima živih organizama (Arora i drugi, 2008; Khanna i Khanna, 2011; Mostert i drugi, 2010; Radwan i Salama, 2006; Sharma i drugi, 2009; Singh i drugi, 2010; Szczyglowska i drugi, 2011; Yusuf i drugi, 2003; Zheng i drugi, 2007a, 2007b). Teški metali su prisutni u Zemljinoj kori odakle se oslobađaju prirodnim procesima (Tchounwou i drugi, 2012) i antropogenom aktivnošću. Dok su neki teški metali kao što su cink (Zn), gvožđe (Fe), kobalt (Co) i bakar (Cu) (esencijalni metali) bezopasni ili relativno bezopasni (pri niskim koncentracijama), olovo (Pb), kadmijum (Cd), živa (Hg), hrom (Cr) i arsen (As) su veoma toksični za žive organizme. Svetska zdravstvena organizacija je ukazala da izloženost toksičnim teškim metalima predstavlja glavnu pretnju po javno zdravlje (Jarup, 2003). Među toksičnim teškim metalima, kadmijum se smatra jednom od prioritarnih opasnosti po javno zdravlje (Arora i drugi, 2008; Czczot i Skrzycki, 2010; Filipic i drugi, 2006; Khanna i Khanna, 2011; Radwan i Salama, 2006) zbog njegovog prisustva u različitim delovima životne sredine (vazduhu, vodi, zemljištu i sedimentu), brzog ulaska u lanac ishrane (zemljište - biljka - čovek), lake apsorpcije i akumulacije u živim organizmima, sveprisutne izloženosti ljudi, i jake toksičnosti čak i pri niskim koncentracijama (Paithankar i drugi, 2021).

### **1.1. Kadmijum - hemijske i fizičke osobine i njegova primena**

Zasluge za otkriće kadmijuma (1817. godine) pripisuju se nemačkom lekaru Johanu Rolofu i hemičarima Karlu Hermanu i Fridrihu Štromajeru. Ime novootkrivene hemikalije koje je na kraju prihvaćeno od strane naučne zajednice, je predložio Štromajer, a potiče od latinskog izraza *cadmia*

*fornacea* (naziv za cink-karbonat), odnosno od grčkog termina  $\kappa\alpha\delta\mu\epsilon\iota\alpha \gamma\eta$  (kadmeia gè, tj. „kadmijumska zemlja”) (Fontani i drugi, 2015).

Kadmijum je metal (atomski broj 48, relativna atomska masa 112,41, tačka topljenja 321,07 °C, tačka ključanja 767 °C, specifična gustina 8,65) (Slika 1) koji je svrstan u IIb grupu periodnog sistema elemenata zajedno sa Zn i Hg. Plavkasto-bele je boje, bez mirisa i ukusa. Postoji osam stabilnih izotopa kadmijuma i dva radioizotopa (Carageorgiou i Katramadou, 2012).



**Slika 1. Kadmijum.** Preuzeto sa: <https://www.shutterstock.com/search/cadmium+symbol> i <https://www.dreamstime.com/photos-images/cadmium.html>.

Kadmijum je prisutan u različitim tipovima stena, zemljišta, vodi, kao i u uglju i nafti (Mendez-Armenta i Rios, 2007), ali se u prirodi retko nalazi u čistom stanju. Grinokit (CdS) je jedini mineral prisutan u prirodi koji sadrži ovaj teški metal (Carageorgiou i Katramadou, 2012; Lide, 2005). Skoro sav kadmijum koji se koristi u industriji se dobija kao nusproizvod pri preradi ruda cinka, bakra i olova. Ovaj metal lako formira jedinjenja sa ostalim elementima kao što su kiseonik (kadmijum-oksidi), hlor (kadmijum-hlorid) ili sumpor (kadmijum-sulfat, kadmijum-sulfid). Formirane kadmijumove soli mogu biti rastvorljive (kadmijum-hlorid i kadmijum-sulfat) i nerastvorljive (kadmijum-sulfid, kadmijum-karbonat i kadmijum-oksidi) u vodi.

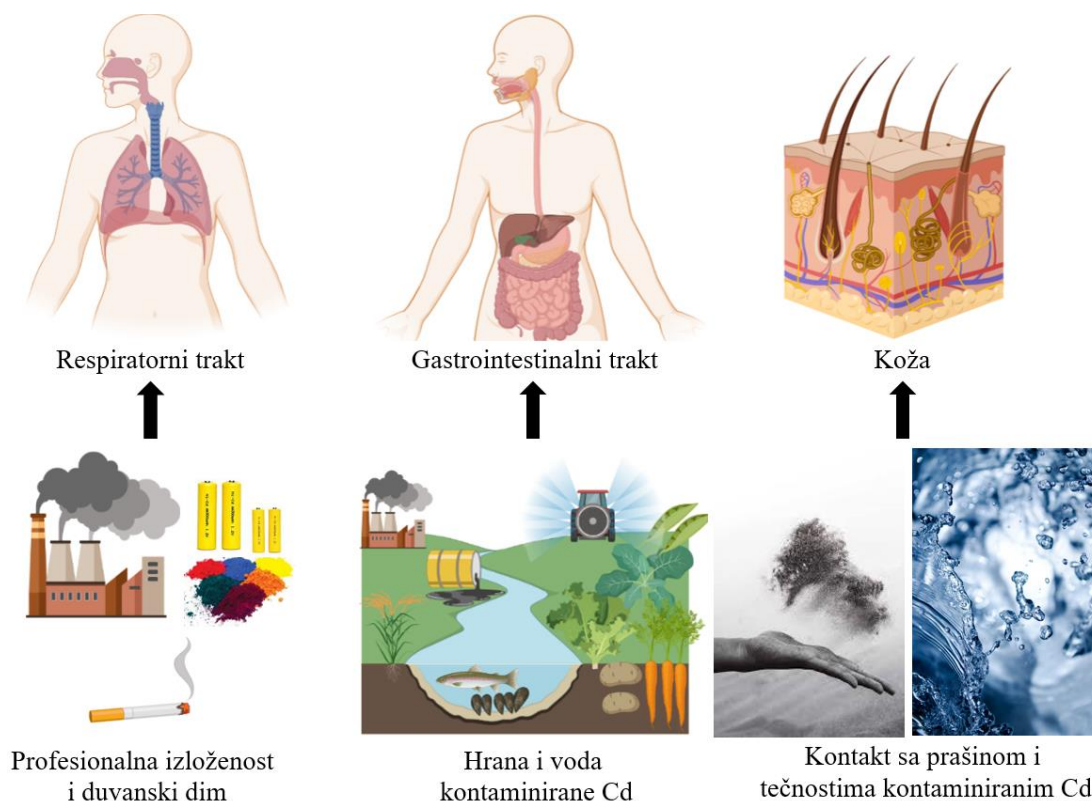
Zbog svojih dobrih metalurških svojstava kadmijum je postao cenjen od 1940. godine i od tada se njegova upotreba stalno uvećavala. Godišnje se u svetu proizvede više od 30.000 tona kadmijuma koji se dalje koristi u proizvodnji baterija (nikal-kadmijumske baterije), u izradi pigmenta i boja za bojenje različitih materijala kao što su plastika i sintetički proizvodi, premazi i obloge i za izradu legura sa niskim tačkama topljenja, kao što je lem.

## 1.2. Putevi izloženosti ljudi kadmijumu, njegova apsorpcija, distribucija i ekskrecija

Iako je kadmijum prisutan u prirodi, povećana izloženost ljudi dejstvu ovog metala je posledica antropogene aktivnosti, koja je doprinela povećanju koncentracije kadmijuma u zemljištu, vodi i vazduhu (Orisakwe, 2012). Osobe koje rade u proizvodnji nikal-kadmijumskih baterija, pigmenta i plastike (profesionalna izloženost) su izložene parama koje sadrže kadmijum. Osim u uslovima profesionalne izloženosti, inhalacija kadmijuma je put unosa ovog teškog metala i u opštoj populaciji. Naime, duvanski dim sadrži kadmijum i procenjuje se da se u organizmu akumulira oko 10% kadmijuma prisutnog u jednoj cigareti, odnosno da prosečan pušač koji popuši 20 cigareta dnevno apsorbuje oko 1 µg kadmijuma dnevno. Apsorpcija kadmijuma iz duvanskog dima rezultira u 4-5 puta većoj koncentraciji kadmijuma u krvi i 2-3 puta u bubrezima pušača u poređenju sa nepušačima, u uslovima iste sredinske izloženosti ovom teškom metalu (Satarug i Moore, 2004).

Glavni put unosa kadmijuma u opštoj populaciji je preko zagađene hrane i vode. Ukoliko se izuzmu teško zagađena područja, može se reći da kadmijum prisutan u vodi u maloj meri doprinosi njegovom unosu u organizam (Olsson i drugi, 2002), tako da hrana zapravo predstavlja glavni izvor kadmijuma u opštoj populaciji ljudi. Kadmijum prisutan u vodi i zemljištu lako ulazi u lanac ishrane. Povećanju nivoa kadmijuma u hrani biljnog porekla doprinelo je i korišćenje fosfatnih stena (nasuprot fosfornoj kiselini i fosfatnim đubrivima) u poljoprivredne svrhe. Hrana biljnog porekla uglavnom sadrži veće koncentracije kadmijuma od mesa, jaja, mleka, mlečnih proizvoda i ribe (Jarup i Akesson, 2009). Žitarice, poput pirinča i pšenice, zeleno lisnato povrće i povrće poput šargarepe i celera,

akumuliraju ovaj metal (Alloway, 1995), a visok nivo kadmijuma primećen je i u semenima od kojih se dobijaju ulja, kakao zrnju, kikirikiju, divljim pečurkama. Više od 80% kadmijuma, koji se unosi putem hrane, potiče od žitarica i povrća (Olsson i drugi, 2002). Pored hrane biljnog porekla, školjke (akumuliraju 1-2 mg/kg kadmijuma) i proizvodi od životinjskih iznutrica (jetra i bubrezi, koji mogu imati koncentracije kadmijuma veće od 50 µg/kg), posebno od starijih životinja predstavljaju značajan izvor kadmijuma u humanoj ishrani. Prosečan unos kadmijuma iz hrane varira između 8 i 25 µg dnevno, u zavisnosti od koncentracije kadmijuma u hrani (Egan i drugi, 2007; Larsen i drugi, 2002; MacIntosh i drugi, 1996; Olsson i drugi, 2002; Thomas i drugi, 1999). Veći unos kadmijuma zapaža se kod osoba sa određenim navikama u ishrani, na primer, vegetarijanci i osobe čija je ishrana bogata školjkama. Pored navika u ishrani, pokazano je i da nedostatak esencijalnih metala (kao što su Zn, kalcijum (Ca) ili Fe) može doprineti povećanom unosu kadmijuma u organizam. U prilog tome govore podaci o povećanom unosu kadmijuma u zemljama u razvoju, kao i kod anemičnih osoba i žena u reproduktivnom periodu života (od prve menstruacije do menopauze) (Thevenod i Lee, 2013).



**Slika 2. Putevi unosa kadmijuma u organizam kod ljudi.** Najznačajniji putevi unosa kadmijuma u organizam ljudi su inhalacijom i konzumiranjem zagađene hrane i vode, ali takođe se manja količina može usvojiti i preko kože. Originalna slika.

U skladu sa prethodno navedenim, kadmijum može da uđe u organizam preko pluća i gastrointestinalnog (GI) trakta (Slika 2). Iako je apsorpcija kadmijuma iz pluća mnogo efikasnija (10-50% kadmijuma unetog inhalacijom se apsorbuje) u poređenju sa apsorpcijom iz creva (5-10% kadmijuma prisutnog u hrani se apsorbuje) (Jarup i drugi, 1998), glavni put unosa ovog teškog metala u opštoj populaciji ljudi je preko hrane kontaminirane kadmijumom. Apsorpcija kadmijuma prisutnog u hrani zavisi od više faktora kao što su: vrsta organizma, tip kadmijumovog jedinjenja, doza, učestalost unosa, itd. Na apsorpciju kadmijuma prisutnog u hrani kod ljudi utiču karakteristike izložene osobe (starost, istorija trudnoće, laktacija, itd.), ali i nivo dvovalentnih jona (Fe, Zn, Ca) i drugih dijetalnih komponenti koje se unose putem hrane. Za apsorpciju kadmijuma iz GI trakta odgovoran je proteinski transmembranski nespecifični transporter dvovalentnih jona metala (*engl.* Divalent Metal Transporter 1 - DMT1) prisutan u ćelijskoj membrani apikalnog regiona enterocita (Gunshin i drugi, 1997; Zoller i drugi, 2001). Kako ovaj transporter nije selektivan (preko njega se

vrši apsorpcija i drugih metala (Fe, Zn, Ca)), dolazi do kompeticije između kadmijuma i drugih metala, pa tako povećanje nivoa dvovalentnih jona metala u hrani može da utiče na smanjenu apsorpciju kadmijuma (Asagba, 2009). Nasuprot tome, u uslovima u kojima dolazi do povećanja gustine ekspresije DMT1 na površini enterocita (najčešće usled nedostatka gvožđa), zapaženo je povećanje apsorpcije kadmijuma (Flanagan, i drugi, 1978). Kod žena je zapažena veća apsorpcija kadmijuma u poređenju sa muškarcima (Vahter i drugi, 2007). Glavni razlog je povećana incidenca nedostatka gvožđa ili vidljivog nedostatka gvožđa kod žena (Akeson i drugi, 2002; Kippler i drugi, 2007). Takođe, tokom trudnoće, na apikalnoj površini enterocita se povećava gustina DMT1 radi optimizacije apsorpcije mikroelemenata, pa samim tim dolazi i do veće apsorpcije kadmijuma (Akeson i drugi, 2002; Vahter i drugi, 2007). Kod žena sa nedostatkom gvožđa (procenjeno na osnovu niskog nivoa feritina u serumu) zapažena je u proseku dva puta veća apsorpcija kadmijuma nakon oralnog unosa u poređenju sa ženama koje nemaju nedostatak gvožđa (Berglund i drugi, 1994). Povećana apsorpcija kadmijuma (nakon oralne gavaže) zapažena je i kod pacova koji su prethodno bili podvrgnuti dijeti siromašnoj gvožđem sve dok im se zalihe gvožđa u tkivima nisu iscrpele, u poređenju sa jedinkama iz istog legla koje nisu bile na tom režimu ishrane (Ragan, 1977).

Nakon apsorpcije, kadmijum dospeva u krv gde se vezuje za albumin, proteine velike molekulske mase koji sadrže sulfhidrilne grupe (-SH grupe), i proteine male molekulske mase u plazmi, kao i za ćelije krvi (Bernard i Lauwerys, 1986). Kadmijum se deponuje u ćelijama krvi (uglavnom eritrocitima, ali takođe i u leukocitima), a samo mali procenat (<10%) ostaje u plazmi (Nordberg i drugi, 1986). Eritrociti (Rahman i drugi, 2000), limfociti (Lu i drugi, 2005) i krvne pločice (Sugiura i Nakamura, 1994) sadrže metalotioneine (MT) proteine male molekulske mase bogate -SH grupama, čiju ekspresiju indukuje i kadmijum. Oni doprinose distribuciji kadmijuma u vidu Cd-MT kompleksa putem sistemske cirkulacije. MT igraju glavnu ulogu u detoksikaciji kadmijuma, ali su takođe odgovorni i za zadržavanje ovog ksenobiotika u tkivima (Baba i drugi, 2013). Kadmijum vezan za proteine plazme se transportuje uglavnom u jetru gde se oslobađaju joni  $Cd^{2+}$ , koji zatim indukuju sintezu MT i akumuliraju se u hepatocitima kao Cd-MT kompleksi (Dai i drugi, 2013; Matović i drugi, 2015; Rogalska i drugi, 2011; Sabolić i drugi, 2010). Većina Cd-MT kompleksa se deponuje u jetri, ali u malim količinama kompleksi se oslobađaju u krv i zbog male molekulske mase (6-7 kDa), filtriraju se kroz bubrežne glomerule i prelaze u tubularnu tečnost (Dai i drugi, 2013; Matović i drugi, 2015; Sabolić i drugi, 2010). Unutar bubrežnih tubula, Cd-MT kompleksi se razgrađuju na slobodne jone  $Cd^{2+}$  i amino-kiseline ili se reapsorbuju u ćelijama proksimalnog tubula. U lizozomima ovih ćelija se kompleksi razgrađuju i oslobađaju se toksični joni  $Cd^{2+}$  (Sabolić i drugi, 2010).

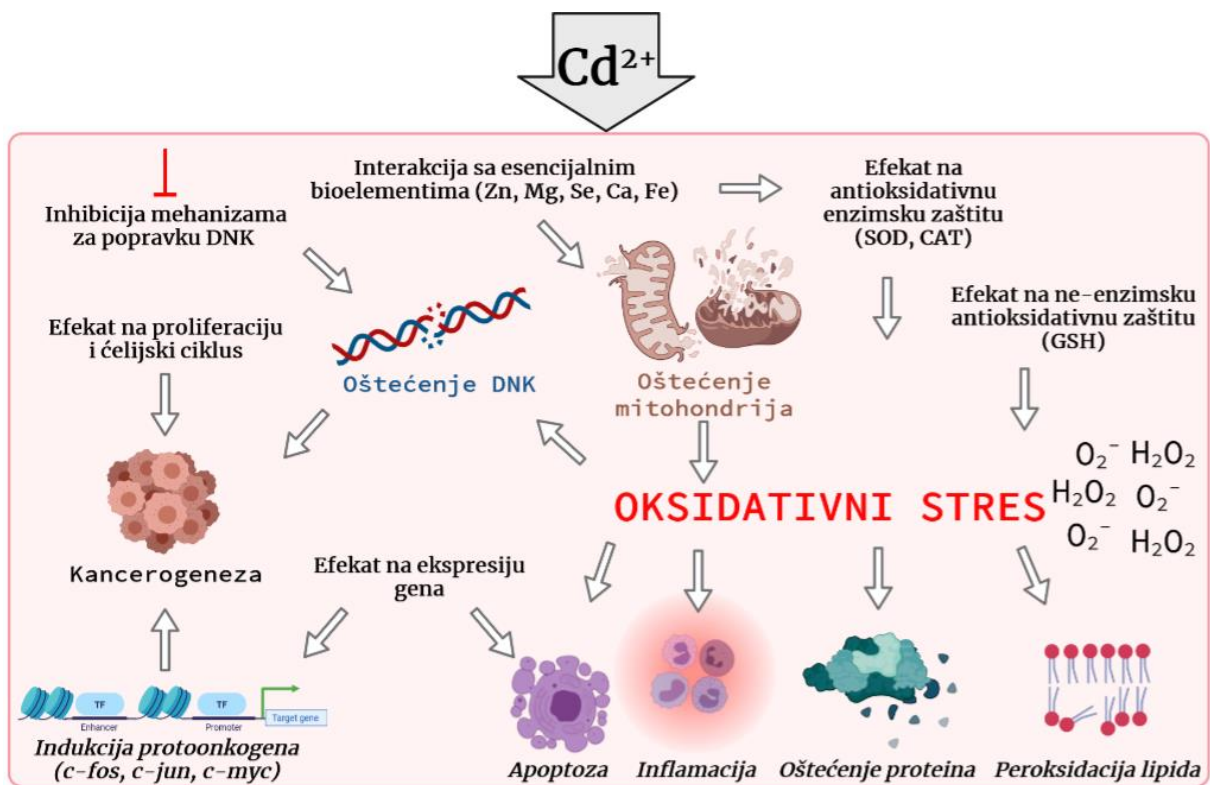
Oslobođeni joni  $Cd^{2+}$  indukuju sintezu MT u bubrezima i akumuliraju se u bubrezima vezani za ove proteine. U skladu sa prethodno navedenim, jetra i bubrezi su primarni ciljni organi deponovanja kadmijuma u slučajevima sistemske intoksikacije. Pored jetre i bubrega, kadmijum se akumulira i u nadbubrežnim žlezdama, plućima, dlaci, koži, kostima i testisima (Satarug i drugi, 2010).

Sposobnost jetre i bubrega da sintetišu MT i tako detoksikuju jone  $Cd^{2+}$  je ograničena, pa u slučajevima povećane apsorpcije kadmijuma povećava se koncentracija slobodnih jona  $Cd^{2+}$ , koji mogu da ispolje toksično dejstvo (Dai i drugi, 2013; Sabolić i drugi, 2010). Pored toga, Cd-MT kompleksi su kratkog života i razlažu se dovodeći do oslobađanja jona  $Cd^{2+}$  (Sabolić i drugi, 2010). Kadmijum se vrlo slabo izlučuje, uglavnom urinom i fecesom. Kod ljudi količina kadmijuma, koja se dnevno izlučuje urinom predstavlja samo oko 0,005-0,015% ukupnog telesnog opterećenja ovim teškim metalom (Friberg i drugi, 1974; Kjellstrom, 1979). Kadmijum se takođe eliminiše kroz dlaku (Gross i drugi, 1976; Shaikh i Smith, 1986) i majčino mleko (Kippler i drugi, 2009, 2010), ali ovi putevi su od ograničenog značaja i ne menjaju značajno poluživot ovog metala. Rezultat slabe ekskrecije kadmijuma je progresivna i skoro ireverzibilna akumulacija metala u telu, a dug poluživot (1-3 decenije) kadmijuma u organizmu doprinosi njegovom nepovoljnom delovanju na zdravlje ljudi (EFSA, 2009; Satarug i drugi, 2001, 2010). Prvi organ koji pokazuje znake štetnih efekata nakon dugotrajne umerene izloženosti kadmijumu inhalacijom ili ingestijom je bubreg. Kadmijum interferira ne samo sa procesom tubularne reapsorpcije proteina male molekulske mase (npr.  $\beta$ 2-

mikroglobulin, retinol vezujući protein) već remeti i ekskreciju proteina velike molekulske mase (npr. albumin, transferin) (Lauwerys i drugi, 1982).

### **1.3. Toksičnost i mehanizmi toksičnosti kadmijuma**

Prvi slučajevi akutnog trovanja kadmijumom opisani su u literaturi 1858. godine (Sovet, 1858), dok prve eksperimentalne toksikološke studije potiču iz 1919. godine. Pirinač zagađen kadmijumom, koji je korišćen u ishrani ljudi doveo je do intoksikacije koja je po prvi put opisana 1955. godine (Hagino, 1957). Itai-itai (jao-jao) bolest nazvana tako zbog bolova koji se javljaju, karakteriše se osteomalacijom, osteoporozom (uglavnom kod starijih žena koje su rodile više dece), femoralnim bolom, lumbagom, deformacijom skeleta, imunskim deficijencijama i disfunkcijom bubrega. Pored toga postoje podaci o trovanju ljudi kadmijumom u uslovima profesionalne izloženosti isparenjima koja sadrže kadmijum što može rezultirati edemom pluća, akumulacijom tečnosti u plućima, a u težim slučajevima i smrću. Kadmijum i nekoliko njegovih jedinjenja mogu izazvati različite vrste karcinoma kod ljudi (tumor prostate, pluća, bubrega, kao i drugih tkiva). Sve ovo je doprinelo da se kadmijum kao zagađivač životne sredine svrsta na sedmo mesto na prioritetoj listi opasnih supstanci (Faroon i drugi, 2012), a takođe i klasifikuje kao karcinogen od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC). U skladu sa ovim, postoji tendencija da se smanji izloženost ljudi ovom teškom metalu, pa je Evropska unija zabranila upotrebu kadmijuma u elektronici od 2004. godine, sa samo nekoliko izuzetaka dozvoljenih zakonom (Carageorgiou i Katramadou, 2012). Primeri ovih izuzetaka su: fosforne prevlake u pojačivačima slike za rendgenske snimke i u rezervnim delovima za rendgenske sisteme (2013/2901(DEA)), anode u Heršovim ćelijama za određene senzore kiseonika koji se koriste u industrijskim instrumentima za nadzor i kontrolu (2016/2671(DEA)), led diode koje menjaju boju (2017/2807(DEA)), stakla sa filterom i stakla koja se koriste kao referentni standard pri merenju refleksije (2017/2609(DEA)) i električni spojevi (2018/2946(DEA)). Na osnovu procene rizika po zdravlje ljudi usled unošenja kadmijuma putem hrane (nedeljni unos u zemljama Evrope kreće od 1,9 do 3 µg/kg, a kod vegetarijanaca i ljudi koji redovno konzumiraju školjke i divlje pečurke dostiže čak 5 µg/kg), Evropska agencija za bezbednost hrane je ograničila dozvoljeni nedeljni unos kadmijuma na 2,5 µg/kg (EFSA, 2009).



Slika 3. Mehanizmi toksičnosti kadmijuma. Modifikovano prema Mezynska i Brzóska, 2018.

Mehanizmi toksičnosti ovog ksenobiotika su višestruki (Slika 3). Joni  $\text{Cd}^{2+}$  imaju visok afinitet vezivanja za biološke strukture, koje sadrže sulfhidrilne, amino, karboksil, imidazolil i disulfidne grupe uzrokujući poremećaje njihove funkcije (Dkhil i drugi, 2014; Pari i Shagirtha, 2012; Sabolić i drugi, 2010). Kadmijum takođe može da ometa homeostazu esencijalnih bioelemenata kao što su Zn, magnezijum (Mg), selen (Se), Ca i Fe istiskujući ove metale iz aktivnih mesta enzima i na taj način remeti biološke funkcije ovih enzima (El-Boshy i drugi, 2015; Galazyn-Sidorczuk i drugi, 2012; Ibrahim i drugi, 2014; Jamakala i Rani, 2015; Matović i drugi, 2012; Rogalska i drugi, 2011; Satarug i drugi, 2001; Wang i drugi, 2014). Pored toga, kadmijum može da dovede do smanjenja membranskog potencijala mitohondrija narušavajući tako ćelijsko disanje i proizvodnju adenosin-trifosfata (*engl.* adenosine triphosphate, ATP) (Messner i drugi, 2016; Wang i drugi, 2014; Xu i drugi, 2013). Brojne *in vivo* i *in vitro* studije su pokazale da na ćelijskom nivou ovaj toksični metal može da ošteti strukturu DNK. Kod pacova tretiranih sa 14 mg/kg/dnevno kadmijuma oralnom gavažom uočeno je povećanje jednolančanih prekida DNK u tri ispitivana organa (ćelije mozga, bubrega i jetre) sa povećanjem dužine trajanja tretmana (2-33 dana) (Latinwo i drugi, 1997). Slično je zapaženo i kod pacova, kojima je na površinu kože nanošeno 14 i 28 mg/kg/dnevno kadmijuma u periodu od 14-42 dana (Fasanya-Odewumi i drugi, 1998). Oštećenje DNK je uočeno i u primarnim endotelskim ćelijama poreklom iz pupčane vrpce čoveka tretiranim 96 h sa 15 i 30  $\mu\text{M}$  kadmijuma (Messner i drugi, 2016), U2OS ćelijskoj liniji osteokarcinoma čoveka tretiranoj sa 0-40  $\mu\text{M}$  kadmijuma tokom 1-12 dana (Zhang i drugi, 2019) i ćelijama poreklom iz jetre model organizma ribe *Danio rerio* (zebrice) nakon 24 h tretmana sa 5, 15 i 30  $\mu\text{M}$  kadmijuma (Chen i drugi, 2014). Oštećenja DNK izazvana kadmijumom su verovatno posledica inhibicije enzima za reparaciju DNK od strane ovog teškog metala, kao što je pokazano na U2OS ćelijama (Zhang i drugi, 2019) i ćelijama poreklom iz jetre zebrice (Chen i drugi, 2014). Osim oštećenja DNK, kadmijum može da utiče i na ekspresiju protoonkogeni, kao što je pokazano u pacovskim L6 mioblastima kod kojih je tretman sa 5  $\mu\text{M}$  kadmijuma doveo do indukcije c-myc i c-jun protoonkogeni (Abshire i drugi, 1996). Indukcija c-fos, c-jun i c-myc protoonkogeni zapažena je i u ćelijama poreklom iz jetre zebrice nakon stimulacije kadmijumom (Chen i drugi, 2014).

Kao glavni mehanizmi toksičnog dejstva kadmijuma, međutim, izdvajaju se oksidativni stres (Amamou i drugi, 2015; Matović i drugi, 2015; Pari i Shagirtha 2012; Wang i drugi, 2014; Xu i drugi,



2013) i efekti na imunski sistem (imunotoksičnost) (Descotes, 1992; Horiguchi i drugi, 2000; Olszowski i drugi, 2012; Theocharis i drugi, 1994).

### **1.3.1. Oksidativni stres izazvan kadmijumom**

Jedan od glavnih mehanizama toksičnosti kadmijuma je oksidativni stres (Amamou i drugi, 2015; Matović i drugi, 2015; Pari i Shagirtha 2012; Wang i drugi, 2014; Xu i drugi, 2013). Oksidativni stres nastaje kao rezultat disbalansa između produkcije reaktivnih oblika kiseonika (ROK) kao što su superoksidni-anjon, vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksi radikal, i aktivnosti enzima uključenih u konverziju ROK do vode (Ercal i drugi, 2001; Sharma i drugi, 2014; Wu i drugi, 2016). Kadmijum ne može direktno da indukuje produkciju ROK Fentonovom reakcijom već stimuliše njihovu proizvodnju indirektno (Amamou i drugi, 2015; Brzoska i drugi, 2016; Dkhil i drugi, 2014; Pari i Shagirtha 2012). Kao što je prethodno navedeno, kadmijum može da istisne redoks aktivne metale (kao što su Fe i Cu) iz vezivnih mesta u enzimima i na taj način povećava koncentraciju ovih metala, koji zatim u Fentonovoj reakciji dovode do produkcije ROK (Ercal i drugi, 2001; Sharma i drugi, 2014; Wu i drugi, 2016). Drugi način na koji kadmijum može da dovede do oksidativnog stresa je inhibicija enzima antioksidativne zaštite, istiskivanjem redoks aktivnih metala iz katalitičkog mesta enzima. Kadmijum može da se veže i za -SH grupe u proteinima i, ukoliko se -SH grupe nalaze u aktivnom mestu proteina, može da dovede do inaktivacije enzima. Osim enzimskih komponenti antioksidativne zaštite, kadmijum formira kovalentnu vezu i sa glutationom (GSH), ne-enzimskom komponentom antioksidativne zaštite, smanjujući na taj način količinu redukovano glutationa u ćelijama. Povećana produkcija ROK i/ili smanjena aktivnost enzimskih i ne-enzimskih komponenti antioksidativne zaštite dovodi do prekomerne produkcije slobodnih radikala u ćelijama koji mogu da oštete proteine, DNK i lipide unutarćelijskih organela i ćelijskih membrana (Matović i drugi, 2015; Messner i drugi, 2016; Pari i Shagirtha 2012).

### **1.3.2. Efekat kadmijuma na imunski sistem (imunotoksičnost)**

Brojna istraživanja su pokazala da kadmijum može da utiče na ćelije imunskog sistema i da može da menja neke imunske odgovore. Međutim, zbog složene prirode imunskog sistema i njegovih aktivnosti koje su određene brojnim interakcijama, osnovni mehanizmi uključeni u imunotoksičnost ovog metala su još uvek nejasni (Mirkov i drugi, 2021).

#### **1.3.2.1. Ukratko o imunskom sistemu**

Imunski sistem predstavlja kompleksan i dinamičan skup tkiva, ćelija i molekula čija je jedna od najvažnijih fizioloških uloga zaštita organizma od infekcije. Pored toga, imunski sistem učestvuje u uklanjanju mrtvih ćelija, ubijanju aberantnih ćelija u organizmu i fagocitozi ćelijskog debrisu i stranih ćelija. Mehanizmi imunske odbrane domaćina sastoje se od urođene i adaptivne imunosti.

Urođena (prirodna ili nespecifična) imunost je filogenetski starija, uvek postoji kod zdravih jedinki i učestvuje u ranoj zaštiti od infekcija. Glavne komponente urođene imunosti su: anatomske barijere (epitelne ćelije kože i mukoze), dendritske ćelije, fagocitne ćelije (polimorfonuklearni (PMN) leukociti/neutrofili i mononuklearni fagociti/makrofagi), urođene limfoidne ćelije (npr. ćelije prirodne ubice) i solubilni faktori u krvi (sistem komplementa i različiti inflamatorni medijatori). Stromalne i parenhimske ćelije tkiva, kao i endotelske ćelije krvnih sudova takođe učestvuju u reakcijama urođene imunosti (Abbas i drugi, 2017).

Adaptivna imunost (specifična ili stečena) se razvija kasnije i obezbeđuje specijalizovaniju odbranu od infekcija, jer se umnožavaju i diferenciraju limfociti specifični za mikroorganizme sa ciljem efikasnije odbrane. Limfociti su glavne komponente adaptivne imunosti. Postoje dva tipa

adaptivne imunosti: humoralna i ćelijska imunost. Humoralna imunost je posredovana antitelima koje proizvode plazmociti koji se diferenciraju od B-limfocita nakon njihove aktivacije, dok su T-limfociti medijatori ćelijske imunosti. Postoje dva glavna podtipa T-limfocita: CD4<sup>+</sup> (pomoćnički) i CD8<sup>+</sup> (citotoksični) T-limfociti (Abbas i drugi, 2017; Castellino i Germain, 2006; Zhang i Bevan, 2011). U okviru CD4<sup>+</sup> T-limfocita razlikuju se Th1 ćelije (proizvode uglavnom interferon (IFN)- $\gamma$ ), Th2 (proizvode interleukin (IL)-4, IL-5 i IL-13) i Th17 ćelije (proizvode IL-17, IL-21 i IL-22) (Abbas i drugi, 2017; Annunziato i Romagnani, 2009; Littman i Rudensky, 2010; Paul i Zhu, 2010).

### 1.3.2.2. Efekat kadmijuma na urođenu imunost

Eksperimentalna istraživanja su pokazala da kadmijum može direktno da interaguje sa ćelijama imunskog sistema izazivajući ćelijsku smrt ili može da utiče na signalne puteve koji regulišu sekreciju citokina, ekspresiju površinskih markera na ćelijama, aktivaciju ćelija i diferencijaciju (Mirkov i drugi, 2021). Međutim, u zavisnosti od vrste na kojoj su vršena istraživanja (čovjek ili eksperimentalne životinje), tipa eksperimentalnog sistema (*in vivo/in vitro*), vrste analiziranog tkiva ili ćelija (primarne ćelije, ćelijske linije), zatim doze kadmijuma, puta izlaganja (sistemski, inhalacija, oralni) i dužine izlaganja (akutno/subhronično/hronično) dobijeni rezultati ukazuju da kadmijum ima stimulatorni, supresivni ili nema efekta na aktivnost ćelija imunskog sistema (Afolabi i drugi, 2012; Cormet-Boyaka i drugi, 2012; Dong i drugi, 1998; Freitas i Fernandes, 2011; Kundu i drugi, 2011; Lag i drugi, 2010; Lee i Lim, 2011; Souza i drugi, 2004; Stosic i drugi, 2010; Yazihan i drugi, 2011; Zhao i drugi, 2006). Smatra se da je imunotoksičnost kadmijuma (efekat na produkciju citokina i hemokina) posredovana njegovim efektom na redoks-osetljive transkripcione faktore nuklearni faktor (NF)- $\kappa$ B i aktivacioni protein-1 (AP-1) (Freitas i Fernandes, 2011; Theron i drugi, 2012). Povećana aktivacija NF- $\kappa$ B zapažena je u odgovoru na kadmijum u epiteljskim ćelijama pluća pacova (Hart i drugi, 1999), u primarnoj kulturi ćelija mikroglije pacova (Yang i drugi, 2007) kao i kod miševa tretiranih intraperitonealno CdCl<sub>2</sub> (Lee i Lim, 2011). Nasuprot tome, na HepG2 ćelijama (poreklom od hepatoma ćelija jetre čoveka) pokazano je da tretman kadmijumom (1-20  $\mu$ M tokom 4 h) ne dovodi do povećanja aktivacije NF- $\kappa$ B već AP-1 (Souza i drugi, 2004). Povećana ekspresija AP-1 zapažena je i u tkivu jetre miševa nakon akutne intoksikacije ovim teškim metalom (Lee i Lim, 2011).

Istraživanja uticaja kadmijuma na urođenu imunost (uglavnom na fagocitne ćelije) su pokazala da kadmijum dovodi do promena koje su važne za aktivaciju ćelija i njihovu migraciju i aktivnost u perifernim tkivima (Das i Al-Naemi, 2019; Hossein-Khannazer i drugi, 2020; Olszowski i drugi, 2012; Theron i drugi, 2012). Povećanje broja PMN zapaženo je u perifernoj krvi pacova nakon akutne sistemske (intraperitonealne) aplikacije kadmijuma (Alghasham i drugi, 2013; Kataranovski i drugi, 1998, 1999). Povećanje broja PMN uz povećanje količine faktora nekroze tumora- $\alpha$  (*engl.* Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) i IL-6 u plazmi, deo je sistemskog inflamatornog odgovora eksperimentalnih jedinki na ovaj teški metal. Međutim, kod ljudi je pokazano da ne postoji korelacija između nivoa kadmijuma u serumu i nivoa C-reaktivnog proteina, što sugeriše da povećana koncentracija kadmijuma u serumu nema za posledicu povećanje markera sistemske inflamacije (Messner i Bernhard, 2010).

Porast broja PMN u perifernoj krvi verovatno je posledica efekta kadmijuma na hematopoezu s obzirom na podatke koji ukazuju da kadmijum deluje na hematopoetske stem ćelije, povećavajući broj mijeloidnih progenitora, a smanjujući broj limfoidnih progenitora u kostnoj srži, što za posledicu ima povećanje broja neutrofila i/ili monocita (Zhang i drugi, 2016). Osim u perifernoj krvi, veći broj PMN uočen je u slezini pacova (Demenesku i drugi, 2014) i miševa (Zhang i drugi, 2016), kao i u jetri i plućima jedinki tretiranih kadmijumom (Das i Al-Naemi, 2019; Gavett i Oberdörster, 1994; Hossein-Khannazer i drugi, 2020; Kataranovski i drugi, 1998). Povećanje broja PMN u tkivima nastaje kao posledica povećane ekspresije CD11b/CD18 molekula (molekula ključnog za uspostavljanje čvrste adhezije neutrofila za vaskularni endotel) koje se zapaža kod pacova nakon akutne sistemske aplikacije kadmijuma (Djokic i drugi, 2014). Povećana ekspresija adhezivnih molekula zapažena je i na PMN poreklom iz krvi čoveka nakon stimulacije ovim teškim metalom

(Hernandez i Macia, 1996). Kadmijum može da utiče i na druge klase adhezivnih molekula (ICAM-1, VCAM-1, VE-kadherini) (Bertin i Averbek, 2006; Jiang i drugi, 2002; Jeong i drugi, 2004; Prozialeck i drugi, 2006; Seok i drugi, 2006). Povećana ekspresija ICAM-1 je zapažena nakon stimulacije S1 ćelijske linije poreklom od S1 segmenta proksimalnog tubula mužjaka C57B16J miša heterozigota za SV40 veliki T antigen i TMCK ćelijske linije (ćelijska linija proksimalnog tubula miša) (Jiang i drugi, 2002), kao i b.End.3 endotelskih ćelija mozga miševa (Seok i drugi, 2006) kadmijumom u kulturi (2  $\mu$ M kadmijuma tokom 4 h), dok je povećanje ekspresije VCAM-1 na endotelskim ćelijama krvnih sudova pokazano kod miševa hronično izloženih kadmijumu u vodi za piće (Knoflach i drugi, 2011). Kadmijum može da raskine veze posredovane kadherinom, što je prikazano u rezultatima ispitivanja Prozialeck i drugi, 2006 na endotelskim ćelijama poreklom iz umbilikalne vene čoveka.

Kadmijum ispoljava efekat i na aktivnost PMN. Na PMN poreklom iz krvi čoveka pokazano je da kadmijum dovodi do povećanja oksidativne aktivnosti ćelija (Amoruso i drugi, 1982; Zhong i drugi, 1990). Povećana oksidativna aktivnost (proizvodnja ROK i NO) zapažena je i kod PMN iz periferne krvi pacova nakon akutne intraperitonealne administracije kadmijuma (1 mg/kg) (Djokic i drugi, 2014). Pored toga, povećana aktivnost mijeloperoksidaze (MPO) zapažena je nakon akutne sistemske aplikacije kadmijuma u PMN periferne krvi pacova (Djokic i drugi, 2014) i u ćelijama izolovanim iz pluća ovih jedinki (Stosic i drugi, 2010). Dozno-zavisno povećanje aktivnosti MPO zapaženo je u tkivu duodenuma miševa izloženih kadmijumu oralnim putem (50 i 100 mg/kg) (Zhao i drugi, 2006). Kadmijum može da dovede i do NEToze, forme ćelijske smrti neutrofila povezane sa oslobađanjem neutrofilnih vanćelijskih zamki (*engl.* Neutrophil Extracellular Traps, NETs) (Wang i drugi, 2019). Nasuprot povećanoj oksidativnoj aktivnosti ćelija, inhibicija ekspresije proinflammatory citokina TNF i IL-1 $\beta$ , kao i smanjen potencijal ćelija da na inflamatorni stimulus - lipopolisaharid (LPS) odgovore produkcijom citokina zapaža se u PMN periferne krvi pacova nakon akutne intoksikacije kadmijumom (Djokic i drugi, 2014).

Kadmijum može da stimuliše ili inhibira skoro sve funkcije monocita i makrofaga. Mikromolarne koncentracije kadmijuma (20, 50 i 100  $\mu$ M) smanjuju vijabilnost mononuklearnih fagocita (Enger i drugi, 1983), indukuju morfološke i ultrastrukturne promene (Goering i drugi, 2000; Zhang i drugi, 2019) i apoptozu RAW ćelijske linije makrofaga miša (Garcia-Mendoza i drugi, 2019; Riemschneider i drugi, 2015; Zhang i drugi, 2019). Izlaganje makrofaga glodara mikromolarnim koncentracijama kadmijuma inhibira pokretljivost makrofaga i menja njihovu interakciju sa inhibitornim faktorom makrofaga, utičući tako na njihovu migratornu sposobnost (Kiremidjian-Schumacher i drugi, 1981). Izlaganje peritonealnih makrofaga miša i ćelijske linije makrofaga J774A.1 necitotoksičnim dozama kadmijuma (10  $\mu$ M) dovodi do povećanja produkcije ROK i NO (Amoruso i drugi, 1982; Hassoun i Stohs, 1996; Ramirez i drugi, 1999). Značajna indukcija sinteze inducibilne azot-oksida sintaze (iNOS) zabeležena je kod peritonealnih makrofaga miševa hronično izloženih kadmijumu (15 ppm tokom 2 meseca) u vodi za piće (Ramirez i Gimenez, 2003). Alveolarni makrofagi eksperimentalnih glodara izloženih aerosolu kadmijuma odgovaraju na ovaj metal proizvodnjom različitih inflamatornih medijatora, uključujući fibronektin (Driscoll i drugi, 1992) i hemotaksične lipidne medijatore kao što je leukotrijen B4 (Kudo i drugi, 1996). Pokazano je da kadmijum može i da inhibira nekoliko aktivnosti makrofaga relevantnih za odbranu od mikroorganizama, uključujući fagocitozu (Cohen, 2004) kao i da suprimira proinflammatory citokinski odgovor makrofaga na klasični inflamatorni stimulus - endotoksin/LPS, i na taj način onemogućuje ekspresiju funkcionalnog inflamatornog M1 fenotipa (Cox i drugi, 2016).

U različitim eksperimentalnim modelima pokazano je da kadmijum dovodi do povećanja ekspresije i/ili produkcije IL-6, citokina koji je marker inflamacije i koji indukuje sintezu akutno-faznih proteina, ali može biti uključen i u regulaciju prelaska iz akutne u hroničnu inflamaciju i stimulaciju T- i B-limfocita (Lag i drugi, 2010). Povećana ekspresija gena za IL-6 u odgovoru na stimulaciju kadmijumom zapažena je u HepG2 ćelijama (Souza i drugi, 2004), u M1 humanim fibroblastima (Lag i drugi, 2010) i u kulturi epitelnih ćelija pluća tipa 2 (Lag i drugi, 2010). U kulturi bronhijalne epitelne ćelijske linije poreklom od čoveka, Calu-3 (Rennolds i drugi, 2012), u primarnim

humanim epitelnim ćelijama malih vazdušnih puteva (Cormet-Boyaka i drugi, 2012) kao i u ćelijskoj liniji adenokarcinoma pluća (A549) (Kundu i drugi, 2011), detektovana je povećana produkcija IL-6 u odgovoru na kadmijum. Povećanje produkcije IL-6 uočeno je kod eksperimentalnih glodara nakon i akutnog i hroničnog tretmana ovim teškim metalom. Intraperitonealna administracija kadmijuma kod pacova dovela je do povećanja nivoa citokina u plućima (Stosic i drugi, 2010) što je posledica povećane produkcije IL-6 od strane ćelija pluća (Kataranovski i drugi, 2009). Slično je zapaženo i u tkivu jetre ICR miševa nakon akutnog tretmana kadmijumom (Lee i Lim, 2011). Produženo/hronično izlaganje kadmijumu dovodi do povećanja ekspresije IL-6 u ćelijama pluća Swiss albino miševa (Kundu i drugi, 2009), povećanja nivoa citokina u supernatantu tkiva srca Wistar pacova (Yazihan i drugi, 2011) i do povećanja nivoa IL-6 u plazmi (Afolabi i drugi, 2012). Iako je u većini studija pokazano da kadmijum dovodi do povećanja ekspresije/produkcije IL-6, postoji i podatak da u alveolarnim makrofagima izloženim 3  $\mu\text{M}$  kadmijuma u periodu od 2-20 h ne dolazi do promene u nivou iRNK za ovaj citokin (Lag i drugi, 2010).

Za razliku od IL-6 čija se produkcija uglavnom povećava u odgovoru na prisustvo kadmijuma, efekat ovog teškog metala na TNF, citokin produkovan od strane aktiviranih makrofaga koji utiče na produženje inflamatornog odgovora aktiviranjem drugih ćelija da produkuju citokine i druge medijatore inflamacije (Tracey, 2002), zavisi od eksperimentalnog modela, ispitivanog tkiva ili tipa ćelija. Tretman HepG2 ćelija mikromolarnim koncentracijama  $\text{CdCl}_2$  dovodi do povećanja ekspresije gena i sekrecije TNF (Dong i drugi, 1998; Souza i drugi, 2004). Povećan TNF odgovor je zapažen i u RAW 264.7 makrofagima stimulisanim  $\text{CdSO}_4$  (1,25 i 10  $\mu\text{M}$  tokom 24 h) (Haase i drugi, 2010) i A549 ćelijskoj liniji (2,5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  tokom 24 i 48 h tretmana) (Kundu i drugi, 2011). Povećan TNF odgovor zapažen je u tkivu jetre ICR miševa nakon akutnog tretmana (2,5 mg/kg) (Lee i Lim, 2011), srca Wistar pacova hronično izloženih kadmijumu (Yazihan i drugi, 2011) i u plazmi pacova nakon sedmedeljnog izlaganja pacova kadmijumu (50 i 100 ppm) u vodi za piće (Afolabi i drugi, 2012). Efekat kadmijuma na TNF odgovor nije zapažen u kulturi primarnih ćelija pluća pacova tipa 2 nakon 20 h izlaganja različitim koncentracijama kadmijuma (1, 3, 6 i 10  $\mu\text{M}$ ) (Lag i drugi, 2010). Identično odsustvo efekta je uočeno i u duodenumu i jejunumu miševa nakon oralnog izlaganja  $\text{CdCl}_2$  (25 mg/kg i 100 mg/kg) u periodu od 0-24 h (Zhao i drugi, 2006). Nasuprot prethodno navedenom, smanjenje nivoa iRNK za TNF zapaženo je nakon izlaganja primarne kulture pneumocita tipa 2 i alveolarnih makrofaga 3  $\mu\text{M}$  kadmijuma tokom 2-20 h (Lag i drugi, 2010).

IL-1 $\beta$  zajedno sa TNF ima važnu ulogu u pokretanju inflamatornih procesa koji regulišu ekspresiju drugih citokina i hemokina (Lag i drugi, 2010). Lag i saradnici su uočili da je obrazac ekspresije i oslobađanja IL-1 $\beta$  isti kao i za TNF pri tretiranju primarne kulture pneumocita tipa 2 i alveolarnih makrofaga sa 3  $\mu\text{M}$  kadmijuma (Lag i drugi, 2010). Pokazano je i da kadmijum indukuje povećanje ekspresije gena za IL-1 $\beta$  kod HepG2 ćelija (Souza i drugi, 2004).  $\text{CdCl}_2$  koji su miševi unosili oralnim putem nije doveo do promene ekspresije IL-1 $\beta$  u duodenumu i jejunumu (Zhao i drugi, 2006).

### 1.3.2.3. Efekat kadmijuma na adaptivnu imunost

Kadmijum takođe ispoljava svoj efekat i na adaptivnu imunost tako što utiče na vijabilnost limfocita, njihovu proliferaciju, sazrevanje, odnos ćelijskih podtipova, aktivnost i zastupljenost u limfoidnim tkivima i krvi.

Prvi podaci o efektu kadmijuma na adaptivnu imunost su pokazali da ovaj teški metal uzrokuje smanjenje mase i atrofiju timusa kod glodara (izloženih 5 mg/kg kadmijuma) koja nastaje kao posledica defekta u proliferaciji timocita (Morselt i drugi, 1988) ili indukcije apoptoze (Mackova i drugi, 1996). Svi podtipovi mišjih timocita podležu apoptozi (u različitoj meri) nakon stimulacije kadmijumom u kulturi, ali su  $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$  ćelije najosetljivije (Dong i drugi, 2001; Pathak i Khandelwal, 2008). Nasuprot rezultatima dobijenim u kulturi ćelija, u eksperimentima u kojima su jedinke miševa bile izložene prenatalno sredinski relevantnim dozama kadmijuma (10 ppm) pokazano je da ovaj teški metal najviše pogađa nezrele timocite ( $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ ) po rođenju miševa

(Hanson i drugi, 2010). Osim efekta na produkciju T-ćelija u timusu, kadmijum utiče i na njihovu sudbinu na periferiji. Kako akutna (1 mg/kg, i.p.) tako i subhronična oralna (25 ppm) intoksikacija pacova kadmijumom ima za posledicu pad ukupnog broja mononuklearnih ćelija iz periferne krvi (Djokic i drugi, 2015) i smanjenje broja CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> podtipova T-limfocita u krvi (Lafuente i drugi, 2004). Smanjenje stepena proliferacije splenocita koje je zapaženo i kod miševa (Pathak i Khandelwal, 2007) i kod pacova (Demenesku i drugi, 2014) nakon akutne intoksikacije kadmijumom je verovatno posledica apoptoze ćelija i/ili smanjene proliferacije ćelija usled smanjene produkcije IL-2 (Pathak i Khandelwal, 2007), smanjenog procenta ćelija koje eksprimiraju visokoafinitetni lanac receptora za IL-2 (CD25) (Demenesku i drugi, 2014) i inhibicije signalne transdukcije u T-ćelijama (Lee i drugi, 2001).

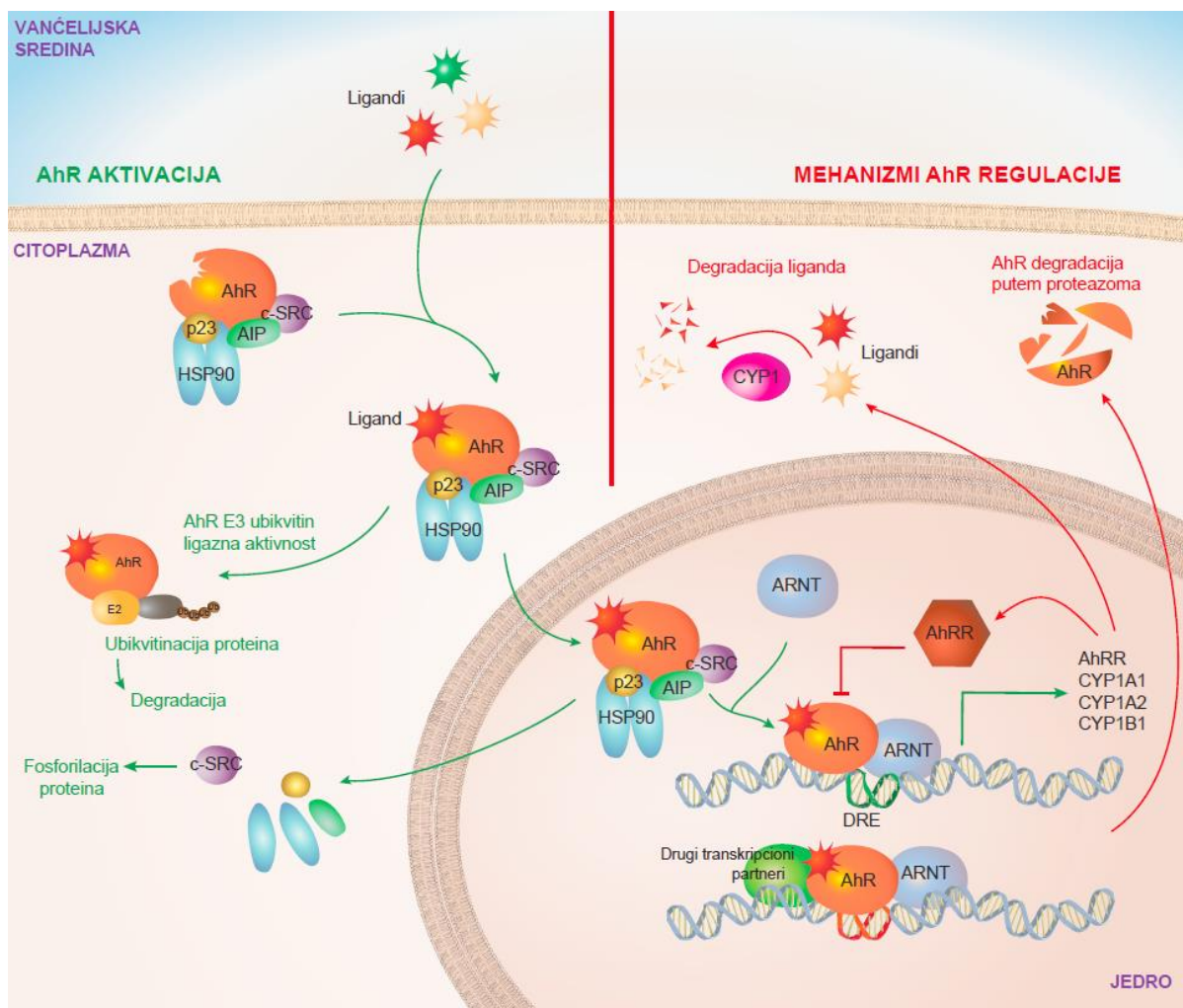
Pored produkcije IL-2, kadmijum utiče i na produkciju drugih citokina. Nakon stimulacije mononuklearnih ćelija periferne krvi ljudi i glodara sa kadmijumom zapaženo je smanjenje produkcije IFN- $\gamma$  (Boscolo i drugi, 2005; Djokic i drugi, 2015; Hemdan i drugi, 2006). Za razliku od mononuklearnih ćelija periferne krvi za koje literaturni podaci ukazuju na generalnu inhibiciju produkcije IFN- $\gamma$  u odgovoru na kadmijum, u ćelijama izolovanim iz slezine zapažena je kako stimulacija (Krocova i drugi, 2000; Turley i drugi, 2019) tako i inhibicija produkcije ovog citokina (Demenesku i drugi, 2014). Uočene razlike u odgovoru splenocita na kadmijum mogu biti posledica upotrebe različitih modela: stimulacija izolovanih ćelija u kulturi sa kadmijumom (Krocova i drugi, 2000), akutna intraperitonealna (Demenesku i drugi, 2014) ili hronična oralna (Turley i drugi, 2019) intoksikacija. Kadmijum polarizuje citokinski odgovor u pravcu Th2 odgovora sudeći po izraženijoj inhibiciji (Hemdan i drugi, 2006) ili slabijoj stimulaciji (Krocova i drugi, 2000) IFN- $\gamma$  u poređenju sa IL-4. U modelu akutne intraperitonealne intoksikacije pokazano je da kadmijum suprimira produkciju IL-10 (Demenesku i drugi, 2014), dok je u modelu hronične intoksikacije zapaženo povećanje produkcije ovog citokina (Turley i drugi, 2019). Kadmijum ispoljava diferencijalni efekat i na nivou produkcije IL-17. Smanjeni IL-17 odgovor zapažen je u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i splenocitima u modelu akutne intoksikacije (Demenesku i drugi, 2016) kao i u splenocitima jedinki nakon produžene oralne izloženosti kadmijumu (Demenesku i drugi, 2014). Nasuprot tome, limfociti izolovani iz regionalnih drenirajućih limfnih čvorova (mezenteričnih čvorova) jedinki oralno izloženih kadmijumu produkuju veće količine IL-17 u poređenju sa jedinkama koje nisu bile izložene ovom metalu (Ninkov i drugi, 2015, 2016).

Prisustvo kadmijuma u organizmu utiče i na B-ćelije pa je tako smanjenje broja B-limfocita uočeno u krvi pacova nakon produžene oralne intoksikacije različitim dozama kadmijuma (5, 10, 25, 50 i 100 ppm) (Lafuente i drugi, 2004) i slezini nakon aplikacije visokih doza (Lafuente i drugi, 2004; Ohsawa i drugi, 1983). Niske doze kadmijuma su dovele do povećanja broja B-limfocita u slezini (Lafuente i drugi, 2004). Kadmijum takođe pogađa i B-ćelije u kostnoj srži (Stelzer i Pazdernik, 1983) koje se diferenciraju u plazmocite, koji produkuju antitela. Osim efekta na nivou broja B-ćelija, kadmijum ispoljava efekat i na njihovu funkciju, koji zavisi od doze (stimulacija na nižim koncentracijama kadmijuma, a inhibicija na višim), tipa antigena (T-nezavisni ili T-zavisni), dužine izloženosti (inhibicija tokom dugotrajne izloženosti), kao i klase produkovanih antitela (IgM, IgG) (Fujimaki, 1985, 1987; Fujimaki i drugi, 1982).

### **1.3.3. Uloga aril-ugljovodoničnog receptora (*engl.* Aryl hydrocarbon Receptor, AhR) u toksičnosti izazvanoj kadmijumom**

AhR je transkripcioni faktor koji se nalazi u citoplazmi ćelije u vidu multiproteinskog kompleksa (Slika 4). Nakon vezivanja liganda, multiproteinski kompleks podleže konformacionoj promeni i zatim prelazi u jedro, gde se AhR receptor, zajedno sa svojim ligandom, odvaja od ostatka kompleksa, i pokreće transkripciju različitih gena (pre svega enzima uključenih u metabolizam ksenobiotika, od kojih su citohromi P450/CYP najčešće analizirani) (Hord i Perdew, 1994). Različiti egzogeni (dioksini, policiklični aromatični ugljovodonici i polihlorni bifenoli) i endogeni ligandi (indigoidi, metaboliti arahidonske kiseline, hem i triptofan) (Stejskalova i drugi, 2011), kao i faktori

stresa (hiperoksija, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ozon, itd.) (Wincent i drugi, 2012) mogu da aktiviraju AhR. Iako postoje mišljenja da teški metali mogu da budu ligandi za AhR (Wincent i drugi, 2012), njihov efekat na AhR i gene u čiju je regulaciju on uključen malo su ispitivani, a dobijeni rezultati variraju u zavisnosti od eksperimentalnog pristupa (teškog metala i ćelija na kojima je proučavan efekat). Tako je na primer stimulacija As dovela do povećanja ekspresije gena za AhR u humanoj liniji keratinocita (HaCaT ćelije) (Mohammadi-Bardbori i drugi, 2015), dok u humanoj ćelijskoj liniji adenokarcinoma pluća (H1355 ćelije) nije zabeležena (Wu i drugi, 2009). Za razliku od samog receptora, povećana ekspresija gena za CYP1A1 je zabeležena u odgovoru na As (Elbekai i El-Kadi, 2004; Mohammadi-Bardbori i drugi, 2015; Wu i drugi, 2009), Hg (Korashy i El-Kadi, 2004, 2005), Pb (Korashy i El-Kadi, 2004, 2005), Cu (Korashy i El-Kadi, 2004, 2005) i Cr (Elbekai i El-Kadi, 2004). Iako je povećanje ekspresije gena za CYP1A1 zapaženo u ćelijama nakon stimulacije teškim metalima, još uvek nije razjašnjeno da li je ovaj efekat teških metala posredovan aktivacijom AhR ili indukovanim oksidativnim stresom. Povećana ekspresija gena za CYP1A1 koja je posledica povećanog oksidativnog stresa nakon stimulacije ćelija arsenom je zabeležena u H1355 (Wu i drugi, 2009) i HaCaT (Mohammadi-Bardbori i drugi, 2015) ćelijskim linijama. Pored oksidativnog stresa, Wu i drugi (2009) su pokazali da je povećana ekspresija gena za CYP1A1 u H1355 ćelijama posledica i aktivacije AhR od strane arsena, sudeći po odsustvu efekta metala na ekspresiju gena u prisustvu AhR antagonista. Povećanje ekspresije gena za CYP1A1 koje zavisi od aktivacije AhR zabeleženo je i nakon stimulacije ćelija živom, olovom i bakrom (Korashy i El-Kadi, 2005).



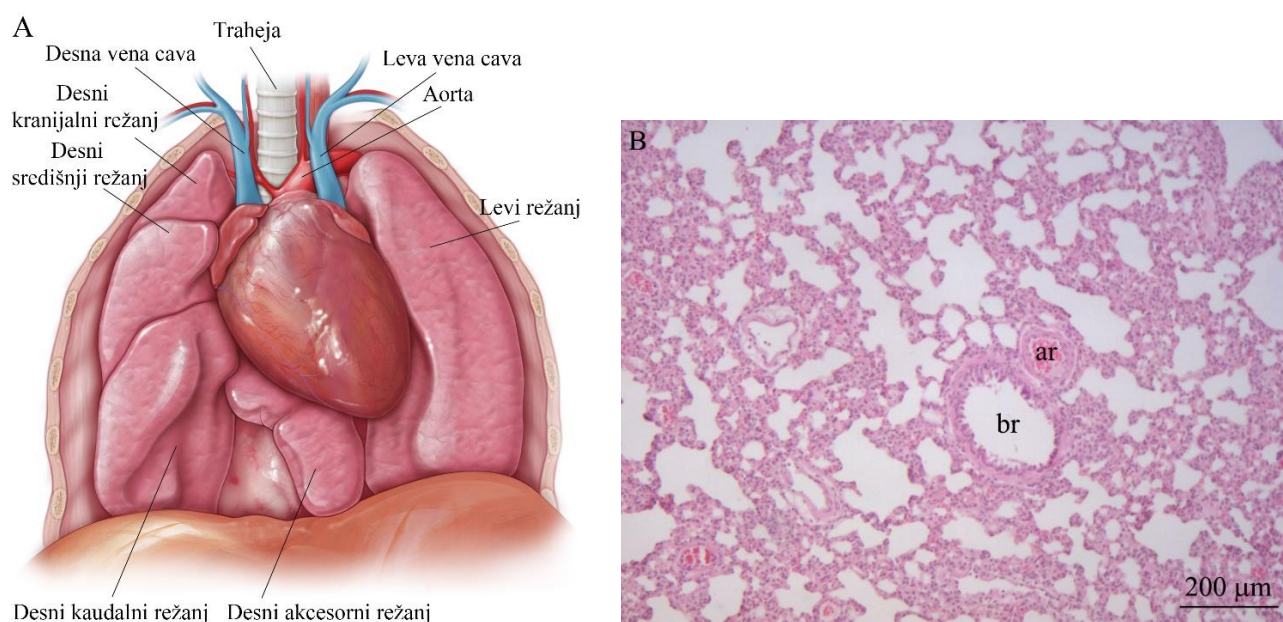
Slika 4. AhR signalni put. Modifikovano prema Gutierrez-Vazquez i Quintana, 2018.

Kadmijum takođe dovodi do povećanja ekspresije AhR-regulisanih gena, uključujući gene za: CYP1A1, NAD(P)H: hinon oksidoreduktazu i glutation S-transferazu. Ya u hepatoma ćelijama

poreklom od čoveka i miša (Anwar-Mohamed i drugi, 2009; Elbekai i El-Kadi, 2004; Tully i drugi, 2000). Kod jedinki pacova nakon oralnog tretmana kadmijumom zapaženo je da metal utiče na AhR signalne puteve u crevu i moduliše AhR signalizaciju (ekspresiju gena za CYP1A1) (Kluxen i drugi, 2013). Kadmijum (nakon oralne primene) dovodi i do povećanja nivoa iRNK za AhR i CYP1B1 ali smanjenja iRNK za CYP1A1 u epidermalnim ćelijama pacova (Tucovic i drugi, 2020). Dok je uticaj kadmijuma na AhR i posledično na enzime uključene u metabolizam ksenobiotika pokazan u nekoliko tipova ćelija i tkiva, za sada ne postoje podaci koji bi ukazali na uključenost AhR u imunomodulatorne efekte kadmijuma, iako je poznato da aktivacija ovog receptora u imunskim ćelijama može da utiče na produkciju citokina (Li i drugi, 2019; Kimura i drugi, 2009; Sekine i drugi, 2009).

#### 1.4. Histološka građa pluća pacova

Respiratorni sistem pacova se sastoji iz dva dela: sprovodnog (nosna šupljina, farinks, larinks, traheja, bronhije i terminalne bronhiole) i funkcionalnog (plućni parenhim) (kratke respiratorne bronhiole, mogu biti i odsutne, alveolarni kanali i alveole). Kod pacova se desno plućno krilo sastoji iz četiri režnja (kranijalni, središnji, kaudalni i akcesorni), a levo samo od jednog režnja (Slika 5).



**Slika 5. Pluća pacova.** (A) Anatomska građa pluća pacova. Desno plućno krilo se sastoji iz četiri režnja: kranijalnog, središnjeg, kaudalnog i akcesornog. Levo plućno krilo se sastoji samo od jednog režnja. Modifikovano prema Meyerholz i drugi, 2018. (B) Originalna mikrografija preseka pluća zdravog netretiranog pacova. Skraćenice: ar - arteriola, br - bronhiola. Bar = 200  $\mu\text{m}$ .

Traheja glodara je najveća struktura sprovodnog dela koja se grana na dve vanplućne bronhije (ulaze u levo i desno plućno krilo). Vanplućne bronhije se zatim dalje granaju na unutarplućne bronhiole sprovodeći tako vazduh do različitih anatomskih regiona pluća. Za glodare je karakterističan asinhroni, monopodijalni sistem grananja, gde su nove ćerke bronhiole manjeg dijametra od roditeljske bronhiole. Zid unutarplućnih respiratornih puteva se sastoji od mukoze (respiratorni epitel i tanak sloj podepitelskog vezivnog tkiva), tankog sloja glatkih mišićnih ćelija, submukoznog vezivnog tkiva bez žlezda i vezivnog tkiva adventicije. Pošto kod pacova unutarplućni vazdušni putevi nemaju potpurnu hrskavičavu komponentu, prema striktno histološkoj definiciji vazdušnih puteva, u plućima pacova se nalaze samo bronhiole različitog prečnika. Sprovodni vazdušni putevi prelaze u funkcionalni deo respiratornog sistema u nivou prelaska terminalnih

bronhiola u respiratorne. Respiratorna bronhiola se nastavlja na alveolarne kanale koji se završavaju alveolama (Harkema i drugi, 2018).

Trepljaste ćelije, prisutne u epitelu sprovodnih vazdušnih puteva, zajedno sa sekretornim ćelijama čine ćelijske komponente mukocilijarnog sistema odbrane koji je važan za uklanjanje različitih udahnutih stranih agensa (npr. prašina, bakterije). Sekretorne epitelne ćelije se nalaze između trepljastih ćelija. Tri glavna tipa sekretornih ćelija u respiratornom epitelu koji oblaže traheobronhijalne vazdušne puteve su: peharaste, Klarine i serozne ćelije. Citoplazma svih ovih ćelija sadrži jedinstvene, sferične sekretorne granule smeštene u apikalnom delu ćelije. Peharaste ćelije sekretuju mukus, hidratizovani lepljivi gel koji se sastoji prvenstveno od vode ali sadrži i karakteristične glikoproteine bogate ugljenim hidratima (mucine), lipide, proteine i soli. Sekretorne granule peharastih ćelija se boje alcijan plavim (pH 2,5), i Šifovim reagensom uz pretretman perjodnom kiselinom (AB-PAS), što ukazuje na prisustvo kako kiselih tako i neutralnih mukusnih komponenti. Produkcija i sekrecija mukusa u vazdušnim putevima je važna za održavanje mukocilijarnog sistema odbrane sprovodnih vazdušnih puteva. Vazdušni putevi glodara sadrže mali broj peharastih ćelija u poređenju sa ljudima, i obično ih nema u unutarplućnim bronhiolama, međutim njihov broj može da se poveća u odgovoru na inflamaciju i izlaganje mikroorganizmima. Klarine ćelije su sekretorne ćelije respiratornog epitela koje ne poseduju treplje niti produkuju mukus, već nekoliko karakterističnih proteina, između ostalog i surfaktanata. Na svetlosnom mikroskopu, Klarine ćelije su cilindričnog ili kockastog oblika sa karakterističnom luminalnom površinom kupolastog oblika i sadrže male PAS-pozitivne sekretorne granule. Ove ćelije su kod pacova glavni sekretorni tip ćelija u traheobronhijalnim vazdušnim putevima. Kod glodara, Klarine ćelije poseduju sposobnost transformacije u peharaste ćelije i tako mogu da povećaju njihov broj u vazdušnim putevima u stresnim uslovima. Serozne ćelije (najčešći tip ćelija u proksimalnim unutarplućnim vazdušnim putevima glodara) su sekretorne ćelije respiratornog epitela koje se po fenotipu razlikuju od peharastih i Klarinih ćelija. Karakteriše ih prisustvo neutralnih, PAS-pozitivnih mukosupstanci, određenih proteina i antibakterijskih agenasa. Nakon izlaganja određenim udahnutim iritirajućim ili alergijskim agensima (npr. LPS, ovoalbumin) serozne ćelije produkuju seromukozne ili mukozne granule diferencirajući se tako u peharaste ćelije bez ćelijske deobe (Harkema i drugi, 2018, Meyerholz i drugi, 2018).

Alveola je osnovna komponenta funkcionalnog dela respiratornog sistema. Zid alveole se sastoji od tankog epitelnog sloja koji čine: pločaste ćelije (pneumociti tipa 1), kockaste ćelije (pneumociti tipa 2) i po nekim autorima i četkaste ćelije (pneumociti tipa 3). Pneumociti tipa 1 su uključeni u razmenu gasova, dok pneumociti tipa 2 produkuju surfaktant. Unutar alveolarnih prostora se nalaze alveolarni makrofagi koji hvataju čestice unete vazduhom i predstavljaju prvu liniju odbrane od mikroorganizama koji dospeju do epitelne površine funkcionalnog dela respiratornog sistema. Ispod alveolarnog epitela se nalazi bogata kapilarna mreža, smeštena u rastresitom vezivnom tkivu. Njega čine: elastična i retikularna vlakna, fibroblasti, miofibroblasti, rezidentni makrofagi, limfociti, mastociti i malobrojna kolagena vlakna (Meyerholz i drugi, 2018).

## **1.5. Toksičnost kadmijuma prema plućima**

Štetni efekti kadmijuma na pluća ljudi opisani su još 1950-tih, u ranim istraživanjima uticaja ovog metala na zdravlje ljudi nakon profesionalne izloženosti (Faroon i drugi, 2012).

### **1.5.1. Bolesti pluća povezane sa izloženošću kadmijumu**

Kod opšte populacije duvanski dim je glavni izvor intoksikacije kadmijumom putem inhalacije. Kadmijum iz duvanskog dima dospeva u pluća u vidu kadmijum-oksida (CdO) i kadmijum-hlorida (CdCl<sub>2</sub>) (Piade i drugi, 2014). Skoro 10% udahnutog CdO se deponuje u tkivu pluća pušača, a 30-40% se apsorbuje u sistemsku cirkulaciju (Satarug i Moore, 2004). Više



koncentracije kadmijuma u plućima, i viši nivo ovog metala u krvi i urinu su zapaženi kod pušača u poređenju sa nepušačima (Adams i Newcomb, 2014; Paakko i drugi, 1989). Smatra se da je lokalno nagomilavanje kadmijuma kod dugogodišnjih pušača (s obzirom na značajno zadržavanje kadmijuma u plućima i dug poluživot metala) (Ganguly i drugi, 2018) glavni faktor predispozicije za plućne bolesti (Ganguly i drugi, 2018). U skladu sa tim, epidemiološke studije su ukazale da kod aktivnih pušača postoji povećan rizik od šištanja, sviranja (*engl.* wheezing) u plućima i astme (Yang i drugi, 2019). Kod osoba koje su profesionalno izložene kadmijumu (isparenja iz industrijskih postrojenja) uočena je povećana incidenca emfizema, dispnee i bronhitisa (Faroon i drugi, 2012) što takođe ukazuje na vezu između kadmijuma i inflamatornih/imunoloških procesa u plućima i poremećaja funkcije pluća (Lampe i drugi, 2008). Brzi pad funkcije pluća i brz početak emfizema kod dugogodišnjih pušača koji nemaju istoriju bolesti pluća, a koji su profesionalno izloženi isparenjima kadmijuma, ukazuju na kadmijum kao etiološki faktor u emfizemu (Leduc i drugi, 1993). Kadmijum se takođe povezuje sa plućnom fibrozom kod ljudi (Assad i drugi, 2018). Rana istraživanja su ukazala na intersticijalnu fibrozu kod nekih radnika izloženih visokim koncentracijama kadmijuma na radnom mestu, sa inverznom asocijacijom između forsiranog vitalnog kapaciteta i koncentracije kadmijuma u urinu (Smith i drugi, 1976) i dugoročnih fibrotičnih odgovora nakon akutnog udisanja isparenja kadmijuma (Townshend, 1982).

Povećan nivo kadmijuma u krvi (čak i kod nepušača) doveden je u vezu i sa pojavom hronične opstruktivne bolesti pluća (*engl.* Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) (Oh i drugi, 2014). Na vezu između izloženosti ovom metalu i COPD ukazuje i podatak da je kod pacijenata sa veoma blagim stadijumom COPD zapažen niži nivo kadmijuma u plućima u poređenju sa pacijentima sa teškim stadijumom COPD (Hassan i drugi, 2014). Štaviše, među pacijentima sa teškim stadijumom COPD, nivo kadmijuma u plućima bio je proporcionalan ukupnoj potrošnji duvana (opterećenje duvanom). Osim veze između kadmijuma koji je prisutan u duvanskom dimu i COPD, skorašnji epidemiološki podaci su ukazali na vezu između COPD i doživotne izloženosti kadmijumu prisutnog u hrani (Satarug i drugi, 2017a, 2017b).

Još jedna posledica direktne izloženosti pluća kadmijumu je rak pluća (Oberdörster, 1986; Takenaka i drugi, 1983; Waalkes, 2000). Epidemiološke studije ukazuju na povezanost profesionalnog udisanja kadmijuma i povećanog rizika od raka pluća (Oberdörster, 1986; Waalkes, 2000).

### 1.5.2. Toksičnost kadmijuma unetog inhalacijom

Ispitivanja u humanoj populaciji su pokazala da je opterećenje alveolarnih makrofaga kadmijumom značajno veće kod pušača u poređenju sa nepušačima (Grasseschi i drugi, 2003) verovatno kao posledica veće koncentracije kadmijuma u bronhoalveolarnoj tečnosti (*engl.* Bronchoalveolar Lavage Fluid, BALF) kod dugogodišnjih pušača (u poređenju sa jedva detektabilnim nivoima metala kod nepušača) (Sundblad i drugi, 2016). Iako je nivo kadmijuma bio povećan nije primećen istovremeni porast nivoa MT, što ukazuje na zasićenje MT (Grasseschi i drugi, 2003). Koncentracije kadmijuma u BALF pušača korelirale su sa povećanim nivoima iRNK za TNF, povećanim koncentracijama IL-6, IL-8 i matriksne metaloproteinaze (MMP) -9 u sputumu, kao i povećanjem broja neutrofila (Sundblad i drugi, 2016).

Ekperimenti na životinjama, uglavnom glodarima, potkrepljuju uzročno-posledičnu vezu između direktne izloženosti pluća kadmijumu i plućnih bolesti. Intratrahealna instilacija kadmijumom jedan je od životinjskih modela emfizema (Huang i drugi, 2017). Primena kadmijuma kod pacova u obliku aerosola povezana je sa promenama na plućima koje karakterišu povećani indeksi ograničenja protoka vazduha (što odgovara klinički očiglednoj udisajnoj i izdisajnoj dispnei) i povećano srednje rastojanje između zidova kao indeks prečnika alveola i alveolusnih kanala (što ukazuje na razvoj emfizema) (Kirschvink i drugi, 2005). Proliferacija fibroblasta zapažena u plućima pacova izloženih kadmijumu inhalacijom (Kutzman i drugi, 1986) i proizvodnja fibronektina od strane alveolarnih makrofaga nakon intratrahealne instilacije kadmijumom (Driscoll i drugi, 1992) povezuje inflamaciju

izazvanu kadmijumom sa razvojem plućne fibroze. Čak i pri dozama koje ne uzrokuju veća oštećenja tkiva pluća ni inflamatorni odgovor u tkivu (sudeći po odsustvu infiltracije ćelija), kadmijum može da dovede do pojave edema (Pearson i drugi, 2003). Raskidanje veza posredovanih kadherinima (E- i VE- kadherini) između epitelnih ćelija u plućima miševa nakon intratrahealne instilacije kadmijumom dovelo je do povećanja mase pluća, povećanja nivoa proteina i alkalne fosfataze u BALF (Pearson i drugi, 2003), što su sve markeri plućnog edema. Doze kadmijuma koje nakon inhalacije (i akutne i hronične) (0,1% pare CdCl<sub>2</sub>) dovode do histološki vidljivih promena u tkivu pluća uzrokuju povećanje aktivnosti MMP-2 i -9 i povećano deponovanje kolagena u bronhiolama što rezultuje pojavom emfizema u plućima izloženih jedinki (Kirschvink i drugi, 2005). Aktivnost MMP-2 kao i TNF (koji stimuliše aktivaciju MMP-2), ostaje povećana i sedam dana nakon udisanja nanočestica CdO u koncentraciji relevantnoj za ljude u profesionalnom okruženju, što sugeriše na postojanu inflamaciju i remodelovanje tkiva pluća (Blum i drugi, 2014). Pored MMP, remodelovanju vanćelijskog matriksa i destrukcija i zamena vezivom parenhima tkiva pluća mogu da doprinesu i elastaze i drugi hidrolitički enzimi koji se nalaze u azurofilnim granulama neutrofila. U prilog ovome govori i podatak da se kod jedinki kojima je intratrahealno ubrizgan kadmijum zapaža povećana degranulacija neutrofila u BALF (Yamada i drugi, 1982). Progresija emfizema kod miševa nakon inflamacije izazvane intratrahealnom instilacijom rastvora CdCl<sub>2</sub> i proteolize vanćelijskog matriksa pripisuje se smrti epitelnih ćelija i plućnih endotelskih ćelija alveolarnih kapilara. I apoptoza i autofagija (koja bi mogla zaštititi ćelije od apoptoze) indukuju se udisanjem rastvora CdCl<sub>2</sub>. Ravnotežu između ova dva procesa reguliše hemoksigenaza-1, sudeći prema smanjenju vrednosti markera autofagije i značajnom povišenju ekspresije i aktivnosti kaspaze-3 u endotelskim ćelijama pluća miševa sa potpunim odsustvom ekspresije gena za hemoksigenazu-1 (Surolija i drugi, 2015).

Kod jedinki koje su bile izložene kadmijumu zapaženo je i povećanje aktivnosti laktat dehidrogenaze (Blum i drugi, 2014; Hart i drugi, 1985; Ho i drugi, 2013; Pearson i drugi, 2003) u plućima što ukazuje na toksičnost ovog metala u tkivu. U prilog ovome govori podatak i o citotoksičnosti kadmijuma (procenjeno na osnovu povećanja nivoa laktat dehidrogenaze) na A549 ćelijsku liniju epitelnih ćelija čoveka (Napolitano i drugi, 2012). Zapaženo povećanje toksičnosti kadmijuma posledica je aktivacije NF-κB koje rezultira povećanjem ekspresije transportera za jone cinka u ćelijama (Napolitano i drugi, 2012). Veza između toksičnosti kadmijuma i povećane ekspresije transportera za jone cinka je dalje pokazana dodavanjem rastućih koncentracija jona cinka u kulturu ćelija čime je smanjena citotoksičnost kadmijuma (Napolitano i drugi, 2012).

I akutna i produžena/hronična inhalacija kadmijumom kod izloženih životinja dovodi do povećanja nivoa proteina i infiltracije inflamatornih ćelija (neutrofila i makrofaga) (Gavett i Oberdörster, 1994; Grose i drugi, 1987; Hart i drugi, 1985; Kenaga i drugi, 1996; Kirschvink i drugi, 2005, 2006). Iscrpljivanje antioksidanata (redukovano glutationa i askorbinske kiseline) (Kirschvink i drugi, 2006) i porast aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (Boudreau i drugi, 1988) kod pacova izloženih aerosolu kadmijuma, kao i značajna korelacija koja postoji između inflamacije u plućima i markera oksidativnog stresa (Kirschvink i drugi, 2006), ukazuje na vezu između oksidativnog stresa u plućima i inflamacije. Još jedna karakteristika odgovora jedinki na kadmijum u plućima je povećanje nivoa MT koje korelira sa nivoom kadmijuma u tkivu (Hart i drugi, 1985; Kenaga i drugi, 1996).

Stimulacija alveolarnih makrofaga, epitelnih ćelija tipa 2 i fibroblasta sa kadmijumom u kulturi rezultirala je povećanjem produkcije medijatora inflamacije (hemokini i citokini) (Lag i drugi, 2010). Povećana produkcija citokina od strane ovih ćelija je verovatno odgovorna za povećanje nivoa hemokina i citokina koje se zapaža u plućima jedinki izloženih kadmijumu u formi nanočestica (Ho i drugi, 2013). Perzistentna inflamacija izazvana produženom primenom aerosola kadmijuma (Kutzman i drugi, 1986) i nanočestica na bazi kadmijuma (Ho i drugi, 2013) može biti povezano sa stvaranjem granuloma u peribronhijalnom limfoidnom tkivu.

### 1.5.3. Toksičnost kadmijuma unetog oralnim putem

Istraživanja subakutne i produžene toksičnosti kadmijuma unetog oralnim putem su pokazala širok spektar toksičnih efekata metala, koji su osim u bubregu i jetri kao najpogođenijim tkivima, zapaženi i u respiratornom, digestivnom, reproduktivnom, skeletnom, imunskom i nervnom sistemu (Friberg i drugi, 1986; Hiratsuka i drugi, 1999; Jonah i Bhattacharyya, 1989; Müller i drugi, 1986; Saygi i drugi, 1991; Sugawara i Sugawara, 1974). Ovi eksperimenti su sugerisali da unos kadmijuma putem hrane, koja je izvor dugotrajne izloženosti niskom nivou metala tokom života, može da uzrokuje poremećaje u plućima kod ljudi (Satarug i drugi, 2017a). Iako su povećani nivoi kadmijuma zabeleženi u plućima pacova i miševa izloženih kadmijumu oralnim putem (Chandler i drugi, 2016; Jorge-Nebert i drugi, 2015; Lehman i Klaassen, 1986; Lei i drugi, 2015; Winiarska-Mieczan, 2014), toksični efekti kadmijuma koji u organizam dospeva ovim putem na pluća su slabo ispitivani. U jednom istraživanju je pokazano da kadmijum koji je deponovan u plućima miševa nakon oralnog unosa, dovodi do preteranog odgovora vazdušnih puteva (Chandler i drugi, 2016) što može biti u osnovi bolesti kao što je astma ili COPD. Analiza ekspresije gena i ukupnih metabolita u plućima ovih jedinki su pokazale da kadmijum dovodi do povećanja ekspresije gena koji su uključeni u kontrolu autonomnih i hemosenzornih nervnih puteva, kao i da povećava koncentraciju glutamata i drugih prekursora neurotransmitera (Chandler i drugi, 2016). Razvoj inflamacije u plućima može biti posledica remećenja funkcije mitohondrija izazvane kadmijumom, kao što je predloženo u eksperimentima na miševima u kojima je analiziran metabolom (Hu i drugi, 2019a). Kadmijum narušava funkciju enzima Krebsovog ciklusa i sintezu ATP, što rezultira akumulacijom ključnog regulatora biosinteze masnih kiselina, acetil-CoA, i na kraju akumulacijom lipida. Ove promene mogu da dovedu do promene funkcije surfaktanta pluća i aktivacije proinflamatorne signalizacije (Hu i drugi, 2019a).

### 1.5.4. Efekat kadmijuma na imunski odgovor u plućima u patofiziološkim uslovima

Povećano deponovanje kadmijuma u plućima i posledična inflamacija u tkivu nakon udisanja (Blum i drugi, 2014; Kirschvink i drugi, 2006) i oralnog unosa (Lehman i Klaassen, 1986; Lei i drugi, 2015; Winiarska-Mieczan, 2015) metala može imati brojne zdravstvene posledice kao što su pojave kancera pluća (Chen i drugi, 2016; Verougstraete i drugi, 2003) i COPD (Ganguly i drugi, 2018; Oh i drugi, 2014). Iako su veze između prisustva kadmijuma u tkivu i ovih bolesti detaljnije ispitivane, postoji samo nekoliko istraživanja koja ispituju posledice izloženosti kadmijumu na osetljivost na infekciju u plućima. Prva istraživanja bila su usmerena na ispitivanje uticaja kadmijuma unetog inhalacijom na rezistenciju na bakterijske (Bouley i drugi, 1982; Gardner i drugi, 1977) i virusne (Bouley i drugi, 1982; Chaumard i drugi, 1983, 1991) infekcije. Promena rezistencije jedinki prethodno izloženih metalu je praćena na osnovu stope preživljavanja životinja nakon infekcije (Bouley i drugi, 1982; Chaumard i drugi, 1983; Gardner i drugi, 1977) ili titra virusa u plućima (Chaumard i drugi, 1983, 1991).

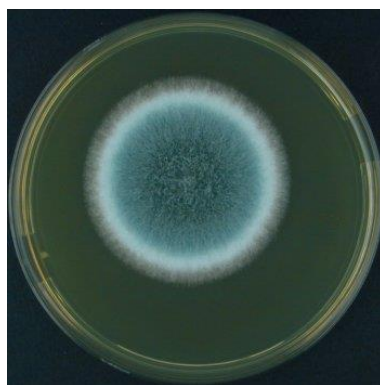
Novija istraživanja su se fokusirala na ispitivanje efekta kadmijuma unetog oralnim putem na infekciju u plućima. Istraživanja na miševima nakon dugotrajne (16 nedelja) izloženosti niskoj dozi kadmijuma (1 mg/l) su pokazala da ova doza ne dovodi do značajnije inflamacije u plućima sama po sebi, ali je pojačala odgovor na infekciju izazvanu H1N1 virusom gripa (Chandler i drugi, 2019). Iako kadmijum nije uticao na titar virusa u plućima, veća infiltracija imunskih ćelija i veći nivo ekspresije gena za citokine, hemokine i proteine signalnih puteva su uočeni kod inficiranih jedinki koje su pile kadmijum u poređenju sa inficiranim jedinkama koje nisu bile izložene ovom metalu (Chandler i drugi, 2019). Izraženiji inflamatorni odgovor (infiltracija imunskih ćelija i produkcija hemokina) je zapažen i kod jedinki miševa inficiranih respiratornim sincicijalnim virusom (RSV) koje su prethodno pile kadmijum, ali je kod ovih jedinki jača inflamacija bila povezana sa slabijim uklanjanjem virusa iz pluća i većim oštećenjem tkiva (Hu i drugi, 2019b).

Ne postoje podaci o uticaju oralne izloženosti kadmijumu na infekciju pluća izazvanu drugim patogenima, uključujući one koji uzrokuju oportunističke infekcije. Efekat kadmijuma na infekcije izazvane oportunističkim mikroorganizmima posebno je važan s obzirom na činjenicu da kadmijum ima imunomodulatorni efekat (Gera i drugi, 2015) i da ti mikroorganizmi postaju patogeni kada imunski sistem nije u potpunosti funkcionalan (Jose i Brown, 2016).

### 1.6. Oportunistička gljiva *Aspergillus fumigatus* (Fresenius, 1863)

Od opisanih 120.000 vrsta gljiva, samo je nekoliko stotina njih patogeno za sisare, a oko 100 je patogeno samo za čoveka (Hawksworth i Lucking, 2017). Razlog je visoka telesna temperatura endotermnih organizama, pošto gljive tolerišu temperature u opsegu od 12 do 30 °C, a optimalna temperatura za rast većine gljiva je 25 °C (Robert i Casadevall, 2009). Za razliku od patogenih vrsta koje izazivaju infekciju kod svih osoba koje su im izložene, ishod infekcije izazvane oportunističkim vrstama zavisi od imunskog statusa domaćina. Dok kod osoba sa integrisanom funkcijom imunskog sistema ove vrste ne dovode do pojave bolesti, individue sa kompromitovanim imunskim sistemom predstavljaju grupu sa visokim rizikom za razvoj infekcije izazvane oportunističkim gljivama, često sa smrtnim ishodom. Kontinuirani napredak medicine, npr. hemioterapija i primena imunosupresiva (zbog transplantacije organa ili kostne srži), doprinosi stalnom povećanju broja pacijenata sa poremećenim imunološkim statusom (Brown i drugi, 2012), te su infekcije izazvane oportunističkim gljivama postale glavni razlog morbiditeta i mortaliteta pacijenata sa oslabljenom ili suprimiranom imunskom funkcijom (Katirae i drugi, 2010; Liao i drugi, 2013). U oportunističke patogene spadaju vrste iz više rodova: *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Cryptococcus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Saccharomyces* i drugi (Hajjeh i drugi, 2004; Marr i drugi, 2002; Pappas i drugi, 2003). A najčešći uzročnik infekcija kod osoba sa kompromitovanim imunskim sistemom je *Aspergillus fumigatus* (Fisher i drugi, 2013; Latge, 1999; Stuehler i drugi, 2015).

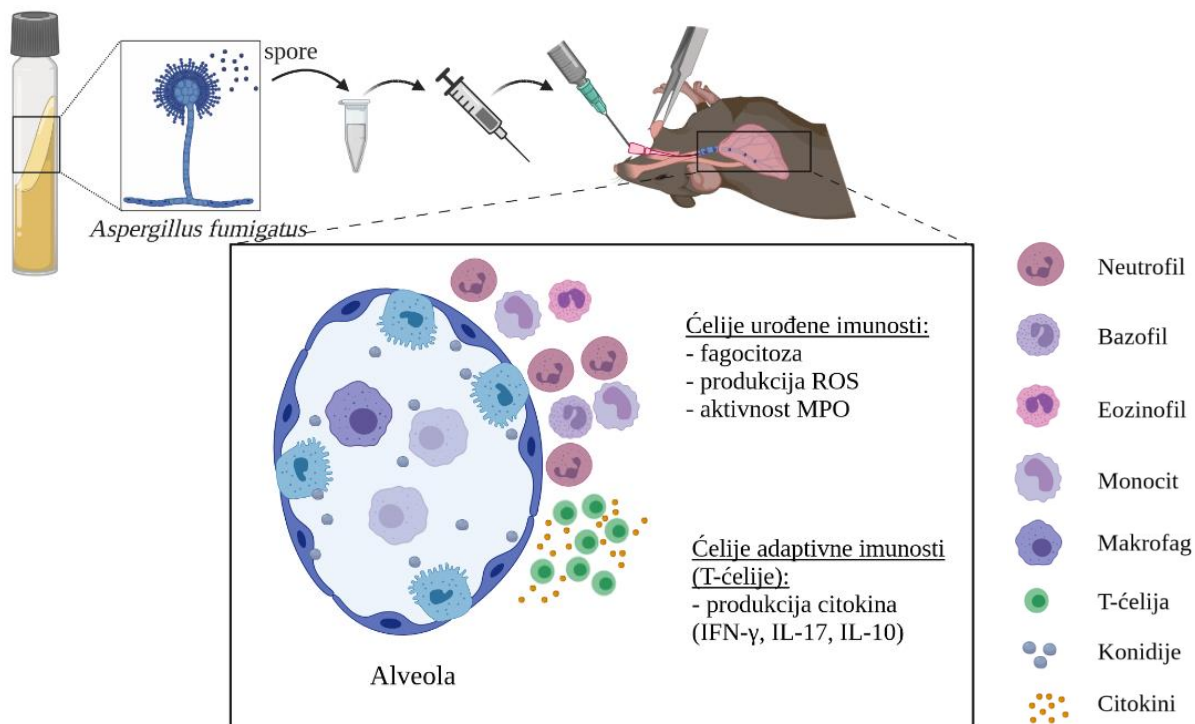
*A. fumigatus* (Slika 6) je saprobna, termotolerantna (optimalni temperaturni opseg za njegov rast se kreće od 37 °C do 42 °C) (Chang i drugi, 2004) gljiva sa širokim rasprostranjenjem. Konidije (spore) ove gljive se rasejavaju pasivno, strujanjem vazduha što uzrokuje njihovu veliku koncentraciju u spoljašnjoj sredini pa se procenjuje da ljudi dnevno udahnu 100-1000 konidija, od kojih neke dospevaju do pluća, zahvaljujući svojoj maloj veličini (2-3 µm) (Latge, 1999).



**Slika 6.** *Aspergillus fumigatus*. Bezbojni micelijum se uočava na periferiji kolonije. Centralni deo kolonije je zelen usled prisustva konidija. Preuzeto sa: [https://atlas.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/fungus/Aspergillus\\_fumigatus/](https://atlas.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/fungus/Aspergillus_fumigatus/)

Eksperimentalna istraživanja na imunokompetentnim pacovima kod kojih je infekcija izazvana intratrahealnim ubrizgavanjem konidija gljive (El-Muzghi i drugi, 2013; Mirkov i drugi, 2015) su pokazala da prisustvo gljive u plućima dovodi do infiltracije ćelija u ovo tkivo (prvenstveno neutrofila), i povećanja aktivnosti ćelija koje su relevantne za uklanjanje konidija iz pluća (fagocitoza, produkcija ROK i aktivnost MPO) (Mirkov i drugi, 2015). U regionalnim drenirajućim limfnim čvorovima (limfni čvorovi medijastinuma) dolazi do diferencijacije efektorskih T-ćelija (CD4<sup>+</sup> ćelija)

(El-Muzghi i drugi, 2013) koje proizvode proinflamatorne citokine IFN- $\gamma$  i IL-17, kao i anti-inflamatorni citokin IL-10 (El-Muzghi i drugi, 2013; Mirkov i drugi, 2015). Ove ćelije zatim migriraju u pluća gde produkcijom citokina doprinose stvaranju proinflamatorne sredine u kojoj se odvija efikasno uklanjanje konidija gljive (Slika 7) (El-Muzghi i drugi, 2013).



Slika 7. Uklanjanje konidija gljive *A. fumigatus* iz pluća imunokompetentnih pacova. Originalna slika.

## **2. CILJ RADA**

Osnovna hipoteza ovog rada je da kadmijum (u obliku kadmijum-hlorida) koji dospeva u organizam oralnim putem u neletalnoj dozi, moduliše imunski odgovor u plućima u fiziološkim uslovima, kao i u patofiziološkim uslovima infekcije izazvane oportunističkom gljivom *A. fumigatus*. Stoga, cilj ovog istraživanja je da se ispita imunomodulatorni efekat kadmijuma koji u organizam dospeva oralnim putem na imunski odgovor u plućima pacova. Za realizaciju cilja postavljeni su sledeći zadaci:

1. ispitivanje imunomodulatornog efekta kadmijuma na pluća u fiziološkim uslovima merenjem promena u ćelijskim i molekulskim mehanizmima imunskog odgovora na neletalne doze ovog metala nakon oralnog tretmana jedinki;

2. ispitivanje uloge aril-ugljovodoničnog receptora u imunitoksičnosti kadmijuma u plućima;

3. ispitivanje efekta kadmijuma da promeni osetljivost organizma, kao i karakteristike odgovora na stimulaciju biotičkim agensom (oportunističkom gljivom *A. fumigatus*).

Rezultati ovih istraživanja trebalo bi da prošire postojeća znanja o imunomodulatornom dejstvu kadmijuma na sistemskom nivou i ukažu na mogući širi neželjeni uticaj na zdravlje ljudi.

### **3. MATERIJAL I METODE**



### 3.1. Hemikalije i reagensi

1. Kadmijum-hlorid ( $\text{CdCl}_2$ ) (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg, Nemačka) rastvaran je u destilovanoj vodi ( $\text{dH}_2\text{O}$ ).
2. RPMI-1640 tečna podloga za gajenje ćelija (medijum) (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Nemačka), sa dodatim 5% (v/v) inaktivisanim fetalnim telećim serumom (*engl.* Fetal Calf Serum, FCS, PAA laboratories, Austrija), gentamicinom (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Galenika a.d., Beograd, Srbija) i antimikotikom vorikonazolom (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Pfizer PGM, Pocé-sur-Cisse, Francuska) korišćen je za kulturu ćelija.
3. PBS (*engl.* Phosphate Buffer Saline, pH 7,4): NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (8,1 mM) i  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,76 mM) (LachNer, Neratovice, Češka).
4. Tetrazolijumova so 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid, MTT (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, SAD) rastvarana je u apirogenom fiziološkom rastvoru u koncentraciji od 5 mg/ml.
5. Tetrazolijumova so tetrazolijum nitroplavo (*engl.* Nitro Blue Tetrazolium Chloride, NBT, AppliChem GmbH, Darmstadt, Nemačka) rastvarana je u destilovanoj vodi u koncentraciji od 5 mg/ml.
6. Kolagenaza tip IV (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, SAD) rastvarana je u tečnoj podlozi za gajenje ćelija u koncentraciji od 10 mg/ml.
7. Dezoksiribonukleaza I (*engl.* Deoxyribonuclease I, DNase I, Sigma, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, SAD) rastvarana je u tečnoj podlozi za gajenje ćelija u koncentraciji od 1 mg/ml.
8. Forbol-12-miristat-13-acetat (*engl.* Phorbol-12-myristate 13-acetate, PMA, Sigma, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, SAD) rastvaran je u tečnoj podlozi za gajenje ćelija u koncentraciji od 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
9. Supstrat za određivanje aktivnosti MPO: u 50 mM kalijum-fosfatnog pufera (pH 6,0) dodavan je o-dianizidin dihidrohlorid (Sigma, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, SAD) u koncentraciji od 0,167 mg/ml i 0,0005%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Zorka Pharma, Šabac, Srbija).
10. Standard MPO (Sigma, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, SAD).
11. Za stimulaciju ćelija: konkanavalin A (ConA) i LPS; tip 0111: B4 iz *E. coli* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, SAD) rastvarani su u RPMI-1640 medijumu.
12. Griess-ov reagens: 0,1% rastvor N-(1-naftil) etilendiamin-dihidrohlorida (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, SAD) i 1% rastvor sulfanilamida (u 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, SAD).
13. Reagens C: 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Carlo Erba, Milano, Italija) u 0,1 M NaOH (LachNer, Neratovice, Češka), 1%  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (Zorka Pharma, Šabac, Srbija) i 2% K-Na-tartarat (Alkaloid, Skoplje, Severna Makedonija).
14. TBA reagens: 0,375% tiobarbiturna kiselina (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, SAD), 0,25 M hlorovodonična kiselina (HCl) (Zorka Pharma, Šabac, Srbija) i 15% trihlor-sirćetna kiselina (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, SAD).
15. Malon-dialdehid (MDA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka).
16. Selektivne mikološke podloge: Sabouraud maltozni agar (SMA) i Sabouraud dekstrozna tečna podloga (SDB) (Torlak, Beograd, Srbija).
15. Boja korišćena za vizuelizaciju konidija: laktofenol-plavo (*engl.* Lactophenol Blue Solution, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švajcarska).
17. Antagonista AhR CH-223191 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD).
18. Komercijalni parovi antitela za ELISA test: pacovski IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 (R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD), TNF, IFN- $\gamma$  (eBioscience Inc., San Diego, CA, SAD) i mišji IL-17 (eBioscience Inc., San Diego, CA, SAD) koji je krosreaktivan sa pacovskim.
19. Albumin iz seruma govečeta (AppliChem, Darmstadt, Nemačka).
20. Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Darmstadt, Nemačka).
21. Streptomycin-sulfat (ICN-Galenika, Beograd, Srbija).

22. Boje korišćene za histološku analizu tkiva pluća: Hematoxylin M (BioGnost d.o.o, Zagreb, Hrvatska), Eosin Yellow c.i.45380 (Molar Chemicals Kft, Budimpešta, Mađarska), AB-PAS (*engl.* Alcian blue pH 2,5 – PAS, kit code 04-163802, Bio-Optica, Milano, Italija).
23. Boje korišćene za bojenje citospin preparata: May-Grünwald i Giemsa (Alfapanon, Novi Sad, Srbija).
24. Tripan-plavo (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka).
25. Saharozni pufer: pH 7,4, 0,25 mol/l saharoza (Fisher Scientific, Loughborough, UK), 0,05 mol/l Tris-HCl (tris-(hidroksimetil)-aminometan, Serva, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka), 0,1 mol/l etilen-diamin-tetra-sirćetna kiselina (EDTA, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka), 1 mM fenilmetansulfonil-fluorid (PMSF, Sigma-aldrich, Inc., St. Louis, MO, SAD).
26. Kultura *A. fumigatus* (humani izolat) dobijena je od Instituta za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović-Batut”.
27. Hemikalije za reverznu transkripciju: nasumični heksamerni prajmeri (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), smeša dezoksiribonukleotidtrifosfata (dNTP, Fermentas, Vilnius, Litvanija), enzim reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (Fermentas, Vilnius, Litvanija), pufer za reverznu transkripciju (5x Reaction buffer, Fermentas, Vilnius, Litvanija) i inhibitor RNaza (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD).
28. Hemikalije za Real-Time qPCR: Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), prajmeri za ciljne gene (Microsynth AG, Balgach, Švajcarska).
29. Zoletil 100 (Virbac, Carros, Francuska) korišćen je za anesteziiranje životinja.

Sve hemikalije korišćene u kulturi sterilisane su pomoću filtera (pore veličine 0,2 µm) (Filterpour, Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Nemačka).

## **3.2. Eksperimentalne životinje i tretmani**

### **3.2.1. Eksperimentalne životinje**

Eksperimenti su vršeni na mužjacima Dark Agouti (DA) soja pacova, starosti pet do sedam nedelja. Životinje su odgajane u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” (IBISS) - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u skladu sa uslovima za datu vrstu (režim 12 h svetlo/12 h mrak, temperatura  $22 \pm 2$  °C, 60% relativna vlažnost vazduha), bez ograničenja pristupa vodi i hrani i uz poštovanje principa bezbednosti i dobrobiti eksperimentalnih životinja (princip „5 sloboda”) (FAWC,1993; Webster 1994, 2005). Svi eksperimenti su izvedeni u skladu sa etičkim pravilima („3R” pravilo) (Russell i Burch, 1959) i odobreni su od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede - Uprava za veterinu (rešenje broj 323-07-07012/2020-05). Tretman životinja i eksperimentalne procedure sprovedeni su u skladu sa Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe.

### **3.2.2. Oralni tretman kadmijum-hloridom**

Pacovi su oralnim putem unosili kadmijum u formi CdCl<sub>2</sub> rastvorenog u destilovanoj vodi (dH<sub>2</sub>O) u trajanju od 30 dana. Za tretman su izabrane dve koncentracije Cd<sup>2+</sup>: niža, od 5 ppm (mg/l) koja odgovara sredinskom zagađenju kome su bili izloženi ljudi u Japanu, gde su žene obolele od itai-itai bolesti (Bhattacharyya i drugi, 1988), i viša, od 50 ppm (mg/l) koja odgovara koncentraciji metala u sredinama sa visokim stepenom zagađenja ili koncentraciji Cd<sup>2+</sup> kojoj su ljudi profesionalno izloženi (Wang i drugi, 2003). Životinje su raspoređene u tri eksperimentalne grupe sa četiri pacova po grupi, u dva nezavisna eksperimenta:

1. životinje koje su pile čistu dH<sub>2</sub>O (kontrolna grupa)
2. životinje koje su pile dH<sub>2</sub>O sa rastvorenim Cd<sup>2+</sup> u koncentraciji od 5 ppm
3. životinje koje su pile dH<sub>2</sub>O sa rastvorenim Cd<sup>2+</sup> u koncentraciji od 50 ppm

Po dve životinje iz iste grupe su bile smeštene u kavezu. Dva puta nedeljno pacovima su dH<sub>2</sub>O i rastvori CdCl<sub>2</sub> zamenjivani svežim, merena im je telesna masa i količina popijene tečnosti (po kavezu). Po završetku tretmana, životinje su žrtvovane iskrvarenjem u dubokoj anesteziji (intramuskularnim ubrizgavanjem 0,15 ml/kg (15 mg/kg) zoletila) i pristupano je izolaciji organa.

### 3.2.3. Uspostavljanje infekcije oportunističkom gljivom *Aspergillus fumigatus* kod jedinki koje su tretirane kadmijum-hloridom

Gljiva je gajena na selektivnoj mikološkoj podlozi SMA u periodu od sedam dana (Booth, 1971). Konidije su spirane sa površine agara sterilnim apirogenim fiziološkim rastvorom, a tako dobijena suspenzija ceđena je kroz sterilnu gazu da bi se uklonile hife i konidiofore. Dobijene konidije brojane su pomoću hemocitometra i podešavane na odgovarajuću koncentraciju.

U zasebnom eksperimentu, po završetku oralnog tretmana kadmijumom tokom 30 dana, jedinkama koje su pile destilovanu vodu i jedinkama koje su pile rastvor kadmijum-hlorida u koncentraciji od 5 ppm je intratrahealno ubrizgavan fiziološki rastvor u zapremini od 0,1 ml u kome je bilo 10<sup>7</sup> konidija *A. fumigatus*. Kontrolnim životinjama je intratrahealno ubrizgavana ista zapremina fiziološkog rastvora. Životinje su žrtvovane (kao što je prethodno opisano) 3. i 7. dana nakon infekcije.

### 3.2.4. Izolacija i obrada tkiva

Regionalni limfni čvorovi koji dreniraju pluća (limfni čvorovi medijastinuma) i pluća su izolovani iz životinja u aseptičnim uslovima. Pluća su očišćena od krvi i izmerena im je masa. Relativna masa pluća preračunavana je po formuli: masa pluća/masa tela x 100. Levo plućno krilo je iskorišćeno za dobijanje homogenata. Zamrznuto je u tečnom azotu i skladišteno na -80 °C do analize. Središnji režanj desnog plućnog krila upotrebljen je za histološku analizu. Ostatak desnog plućnog krila je iskorišćen za izolaciju leukocita enzimskom digestijom.

## 3.3. Određivanje koncentracije kadmijuma u tkivima i organima

Metodom masene spektrometrije sa indukovano kuplovanom plazmom (*engl.* Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) određivana je koncentracija kadmijuma u plućima, krvi, bubrezima i jetri. Stakleno posuđe korišćeno u analizi uzoraka bilo je potopljeno u 10% azotnu kiselinu (HNO<sub>3</sub>) 24 h, nakon čega je više puta isprano visoko prečišćenom (*engl.* ultra-pure) vodom (Millipore Simplicity System 185 sa dva UV filtera, 185 i 254 nm) pre korišćenja. Uzorci pune krvi (1 ml) ili tkiva (0,2 g) odmeravani su na analitičkoj vagi u posudama aparata za mikrotalasnu digestiju (Ethos One, Milestone, Italija) u koje je zatim dodavano 7 ml 65% HNO<sub>3</sub> i 1 ml 33% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. HNO<sub>3</sub> je dodavana kako bi se povećala rastvorljivost metala prevođenjem u nitrite, dok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sprečava formiranje azotnih isparenja i ubrzava razlaganje uzorka (sa porastom temperature). Uzorci su razlagani u aparatu za mikrotalasnu digestiju na 180 °C, prema sledećem temperaturnom programu: povećanje temperature do 180 °C tokom prvih 10 minuta (min) i održavanje ove temperature narednih 15 min. Po isteku programa rastvor je premešten u teflonske čaše u vodenom kupatilu kako bi se isparavanjem tečnosti (do 3 ml) smanjila količina suvišnih kiselina. Nakon hlađenja, uzorci su premešteni u volumetrijske posude (od 15 ml) i rastvarani sa visoko prečišćenom vodom. Koncentracije metala su određivane pomoću ICP-MS (ICAP, Q, X Thermo Scientific series 2). Ceo

sistem je kontrolisan pomoću Qtegra Instrument Control Software. Instrumentalni parametri i mereni izotop je dat u Tabeli 1.

Štok rastvor koji sadrži 1000 mg/l kadmijuma korišćen je za pripremu standarda. Kao kontrolni uzorci korišćeni su  $^6\text{Li}$ ,  $^{45}\text{Sc}$ ,  $^{115}\text{In}$  i  $^{159}\text{Tb}$  (VHG standards, Manchester, UK). Koncentracije metala izražavane su kao  $\mu\text{g}$  metala po gramu tkiva ( $\mu\text{g/g}$ ).

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

Rf snaga (W)	1548
Protok gasa (l/min)	13,9
Pomoćni protok gasa (l/min)	1,09
Brzina protoka raspršivača (l/min)	0,8
Vreme uzimanja uzoraka	3 x 50 s
Broj tačaka po piku	3
Integraciono vreme (ns)	50
Izmereni izotop	$^{111}\text{Cd}$

### 3.4. Histološka analiza tkiva pluća

Središnji režnjevi desnog plućnog krila fiksirani su u puferisanom 4% formalinu (pH 6,9), a zatim sprovedeni kroz seriju alkohola (etanola) rastuće koncentracije (30-100%), nakon čega su prosvetljavani u ksilolu i ukalupljeni u parafin. Preseci tkiva pluća (debljine 5  $\mu\text{m}$ ) obojeni su hematoksilinom i eozinom (H&E), a analiza i procena histopatoloških promena vršena je pomoću Leica DMLB mikroskopa (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka). Analizirani parametri su uključivali: intraparenhimske hiperemične krvne sudove/izražene aleveolarne septalne krvne sudove, edem (intersticijalni, perivaskularni i peribronhijalni), infiltraciju inflamatornih ćelija (intraparenhimsku, perivaskularnu i peribronhijalnu) i deskvamaciju respiratornog epitela. Nivo histopatoloških promena bio je procenjivan u skladu sa smernicama najbolje prakse u toksikološkoj patologiji (Crissman i drugi, 2004) i ocenjen semikvantitativno korišćenjem arbitrarne skale (od 0 do 4) (Mann i drugi, 2012), gde je: 0 = unutar normalnih granica i 1 = minimalne, 2 = blage, 3 = umerene i 4 = ozbiljne promene.

Broj peharastih ćelija u vazдушnim putevima određivan je na presecima tkiva obojenim metodom alcijan plavo-PAS i izražavan kao broj ćelija po milimetru dužine epitela malih (dijametar manji od 300  $\mu\text{m}$ ) i velikih (dijametar veći od 300  $\mu\text{m}$ ) disajnih puteva.

### 3.5. Procena oksidativnog stresa u plućima

#### 3.5.1. Priprema homogenata tkiva

Uzorci pluća su homogenizovani na ledu. Homogenizacija se vršila pomoću električnog homogenizera (IKA T18 Basic Homogenizer, IKA Works Inc., Wilmington, NC, SAD): za sve procedure upotrebljavan je homogenat dobijen homogenizacijom u saharoznom puferu u odnosu 1:10, osim za kvantitativnu kulturu gljive gde je upotrebljavan homogenat dobijen homogenizacijom u 5 ml sterilnog fiziološkog rastvora (primarni homogenat).

Dobijeni homogenati za procenu oksidativnog stresa su sonifikovani na ledu, 3  $\times$  15 s, na 30% maksimalne snage (Bandelin electronic, UW 2070, Berlin, Nemačka) i centrifugirani (100.000  $\times$  g, na +4  $^{\circ}\text{C}$ , u trajanju od 1 h i 45 min), nakon čega su izdvojeni supernatanti koji su korišćeni za dalje analize. U izdvojenim supernatantima određivana je koncentracija proteina metodom po Lowry-ju, MPO, katalaze, superoksid-dismutaze i nivo lipidne peroksidacije.

### 3.5.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju

Za određivanje koncentracije proteina korišćena je kolorimetrijska Lowry metoda (Lowry i drugi, 1951) gde je koncentracija ukupnih proteina srazmerna intenzitetu boje rastvora uzorka. Po 20  $\mu$ l uzorka ili standarda mešano je sa 300  $\mu$ l reagensa C. Nakon 15 min inkubacije na sobnoj temperaturi, dodavano je 60  $\mu$ l Folin-Ciocalteu reagensa, i uzorci su inkubirani još 30 min na sobnoj temperaturi. U mikrotitar ploču sa 96 mesta nalivano je po 100  $\mu$ l uzorka u triplikatu i merena je apsorbancia spektrofotometrijski na 670 nm pomoću automatskog ELISA čitača (GRD, Rim, Italija). Koncentracije proteina preračunavane su sa standardne prave konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija albumina iz seruma govečeta od 0,1 do 1 mg/ml, i izražavane su u mg/ml.

### 3.5.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT, EC 1.11.1.6)

Katalaza je enzim koji štiti ćelije od oksidativnog oštećenja prevodeći  $H_2O_2$  do kiseonika i vode (Chance i drugi, 1979). Nalazi se u visokoj koncentraciji u peroksizomima, organelama prisutnim u svim eukariotskim ćelijama (Glorieux i Calderon, 2017). Aktivnost CAT određivana je u supernatantima homogenata pluća, merenjem stope razlaganja  $H_2O_2$  pomoću spektrofotometra (Shimadzu UV-1800, Kjoto, Japan). U kvarcnim kivetama je mešano 10  $\mu$ l supernatanta sa 50  $\mu$ l Tris-EDTA pufera (pH 8,0) i 1 ml  $H_2O_2$ . Merena je promena apsorbance na 240 nm u trajanju od 3 min u intervalima od po 30 sekundi. Kao mera aktivnosti katalaze uzimana je količina enzima koja razloži 1 mmol  $H_2O_2$  u minuti na 25 °C. Aktivnost CAT izražavana je u jedinici po miligramu (U/mg) proteina.

### 3.5.4. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1)

Superoksid-dismutaze su prva i najvažnija linija antioksidativnog enzimskog sistema odbrane od ROK, naročito superoksidnih anjona (Zelko i drugi, 2002). SOD prevodi superoksidne radikale ( $O_2^-$ ), do  $H_2O_2$  i molekulskog kiseonika dovodeći tako do njihove neutralizacije (Fridovich, 1995). Kod sisara su do danas otkrivene tri vrste SOD. SOD1 (CuZn-SOD) se nalazi u unutrašnjosti ćelije (citoplazmi, nukleusu, lizozomima) (Chang i drugi, 1988; Crapo i drugi, 1992; Keller i drugi, 1991; Liou i drugi, 1993), SOD2 (Mn-SOD) samo u mitohondrijama (Weisiger i Fridovich, 1973), a SOD3 (EC-SOD) u vanćelijskim tečnostima (plazmi, limfi, cerebrospinalnoj tečnosti) (Marklund i drugi, 1982, 1986). Njena aktivnost određivana je u supernatantima homogenata pluća merenjem inhibicije spontane autooksidacije adrenalina (epinefrin) u baznoj sredini, epinefrinskom metodom (Misra i Fridovich, 1972). U staklenim kivetama je mešano 20  $\mu$ l uzorka, 3 ml natrijum-bikarbonatnog pufera ( $Na_2CO_3$  i EDTA u dej $H_2O$ , pH 10,2) i 20  $\mu$ l epinefrina. Merena je promena apsorbance na talasnoj dužini od 480 nm, u trajanju od 10 min (na svakih 1 min) pomoću spektrofotometra (Shimadzu UV-1800, Kjoto, Japan). Kao mera aktivnosti SOD uzimana je količina enzima potrebna da smanji stopu autooksidacije adrenalina za 50%, i izražavana je u jedinici po miligramu (U/mg) proteina.

### 3.5.5. Određivanje količine lipidnih peroksida merenjem nivoa malon-dialdehida (MDA) u tkivu

MDA nastaje kao krajnji produkt lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina u biomembranama pod dejstvom slobodnih radikala (Gawel i drugi, 2004). Nivo MDA određivan je prema metodi Villacara i drugih (1989) u kojoj MDA reaguje sa tiobarbituratnom kiselinom iz smeše i kao krajnji produkt nastaju jedinjenja žute boje (TBA reagujuće supstance) čiji je intenzitet srazmeran nivou MDA u uzorku. Reakcija je izvođena dodavanjem 50  $\mu$ l homogenata pluća/standarda u 2 ml TBA reagensa i 950  $\mu$ l Tris-HCl (pH 7,4), nakon čega je smeša zagrevana u

vodenom kupatilu na temperaturi od 95 °C, u trajanju od 60 min. Zatim su uzorci centrifugirani (1620 x g, 10 min) i 200 µl supernatanta nalivano je u duplikatu u mikrotitar ploču sa 96 mesta. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 535 nm. Koncentracija MDA je preračunavana sa standardne prave konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija MDA i izražavana u nmol/mg proteina.

### 3.6. Kvantitativna kultura gljive

Broj formiranih kolonija (*engl.* Colony Forming Units, CFU) u plućima određivan je pomoću kvantitativne kulture *A. fumigatus* (Sheppard i drugi, 2006). Od primarnog homogenata pravljena su tri serijska razblaženja i razlivena na petri šolje sa SMA podlogom sa streptomycin-sulfatom. Uzorci su inkubirani na 37 °C u periodu od 24 do 48 h. Nakon inkubacije brojane su kolonije koje su izrasle na petri šoljama i računat broj CFU/g tkiva.

### 3.7. Određivanje aktivnosti leukocita pluća

#### 3.7.1. Izolacija leukocita iz pluća

Leukociti pluća izolovani su enzimskom digestijom, prethodno usitnjenog tkiva pluća, sa kolagenazom tip IV u koncentraciji 1 mg/ml i dezoksiribonukleazom I u koncentraciji od 30 µg/ml u trajanju od 30 min na 37 °C. Dobijene ćelije resuspendovane su u medijumu i koncentracija podešavana na  $4 \times 10^6$ /ml.

#### 3.7.2. Određivanje ukupnog broja i diferencijalnog sastava leukocita pluća

Ukupan broj i vijabilnost leukocita dobijenih enzimskom digestijom pluća je određivan brojanjem ćelija bojenih u 0,1% rastvoru tripan-plavog na automatskom brojaču ćelija (LUNA-II™, Logos Biosystems, Inc.). Diferencijalni sastav (relativan broj) određivan je na osnovu morfoloških karakteristika ćelija na citospin preparatima bojenim prema metodi May-Grünwald Giemsa. Citospin preparati analizirani su pomoću svetlosnog mikroskopa (Nicon Co, Tokio, Japan). Za određivanje diferencijalnog sastava brojano je najmanje 300 ćelija po životinji.

#### 3.7.3. Kultura ćelija pluća

Leukociti izolovani iz pluća sejani su ( $0,4 \times 10^6$  ćelija u 250 µl po bunariću) u ploče sa 96 mesta u čistom medijumu ili u prisustvu toplotom inaktivisanih konidija gljive *A. fumigatus* i gajeni u inkubatoru za gajenje ćelija pod standardnim uslovima (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) u periodu od 48 h. Nakon toga kondicionirani medijum je sakupljan centrifugiranjem 10 min na 260 x g.

#### 3.7.4. Određivanje nivoa azot-monoksida (NO)

NO je mali bioaktivni gas sa mnoštvom funkcija kako u urođenim tako i u adaptivnim imunskim odgovorima. Neophodan je za odbranu domaćina od patogena i za regulaciju imunskih odgovora. Stvaraju ga mnoge ćelije imunskog sistema (makrofagi, neutrofilni, neki tipovi dendritskih ćelija, T-ćelije) kao odgovor na različite stimule (Lee i drugi, 2017). Velike količine NO mogu biti toksične i proinflamatorne (Guzik i drugi, 2003). Određivanje nivoa NO vršeno je pomoću Griess-ove reakcije, u kojoj se detektuju nitriti (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) i/ili nitrati (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) kao krajnji produkti metabolizma NO (Hibbs i drugi, 1988). Za određivanje količine NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, u 50 µl kondicioniranog medijuma/standarda

je dodavano 50  $\mu\text{l}$  Griess-ovog reagensa. Smeša je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi nakon čega je merena apsorbance spektrofotometrijski na 540 nm, a korekcija je rađena na 670 nm. Količina produkovanog  $\text{NO}_2^-$  preračunavana je sa standardne prave konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija natrijum-nitrita ( $\text{NaNO}_2$ ) i izražavana u  $\mu\text{M}$ . Nivo NO nakon stimulacije izražavan je kao indeks stimulacije (odnos stimulisane i spontane produkcije NO).

### 3.7.5. Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO, E.C.1.11.1.7)

MPO je glavni proinflamatorni enzim skladišten u azurofilnim granulama neutrofila i, u manjoj meri, u azurofilnim granulama monocita. U prisustvu  $\text{H}_2\text{O}_2$  i halogenida (hlorida, bromida ili tiocijanata) MPO katalizuje formiranje reaktivnih kiseoničnih intermedijera, kao i hipohlorne, hipobromne i hipotocijanatne kiseline. Nakon aktivacije neutrofila u perifernoj krvi i tkivima, MPO se oslobađa u fagolizozome. MPO predstavlja komponentu unutarćelijskog mikrobicidnog sistema fagocita i stoga je deo urođenog imunskog sistema za odbranu domaćina od mikroorganizama (Klebanoff i drugi, 2013; Pattison i drugi, 2012; Rayner i drugi, 2014; Nauseef, 2014). Aktivnost MPO je određivana u homogenatima pluća i leukocitima izolovanim iz pluća ( $4 \times 10^6$  ćelija) na osnovu oksidacije supstrata o-dianizidin dihidrohlorida u prisustvu  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bozeman i drugi, 1990). Test je rađen dodavanjem 33  $\mu\text{l}$  lizata ćelija ili homogenata pluća u 967  $\mu\text{l}$  supstrata. Nakon inkubacije od 10 min, 100  $\mu\text{l}$  uzorka nalivano je u duplikatu u mikrotitar ploču od 96 mesta. Apsorbance je merena spektrofotometrijski na 450 nm, a korekcija je rađena na 540 nm. Aktivnost MPO preračunavana je sa standardne prave konstruisane na osnovu apsorbanci standarda MPO, a rezultat izražavan kao jedinica MPO po mg (U/mg) proteina ili  $10^6$  ćelija.

### 3.7.6. Određivanje oksidativne aktivnosti leukocita iz pluća

Oksidativna aktivnost leukocita iz pluća određivana je pomoću kvantitativnog citohemijskog testa za respiratorni prasak (Choi i drugi, 2006) zasnovanog na redukciji tetrazolijumove soli NBT do formazana od strane ćelija. Ćelije ( $0,4 \times 10^6$  ćelija u 100  $\mu\text{l}$  po bunariću) su zasejane u ploče sa 96 mesta samo u medijumu (spontana redukcija) ili u prisustvu 100 ng/ml kulture PMA (PMA stimulisana redukcija). U ploče je dodavano 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kulture tetrazolijumove soli NBT i ćelije su inkubirane u trajanju od 30 min. Nastali formazan ekstrahovan je preko noći pomoću zakišeljelog natrijum-dodecil-sulfata (10% SDS / 0,01 N HCl). Apsorbance je merena spektrofotometrijski na 540 nm, a korekcija je rađena na 670 nm. Rezultati su prikazivani kao srednja vrednost apsorbance ( $A_{540 \text{ nm}}$ ) za četvoroplikat kulture.

### 3.8. Izolacija i kultura ćelija limfnih čvorova medijastinuma

Ćelije su dobijene mehaničkim istiskivanjem čvorova kroz najlon mrežice (70  $\mu\text{m}$ , Cell strainer, BD Falcon, BD Biosciences, Bedford, MA, SAD), ispirane i resuspendovane u medijumu. Ukupan broj i vijabilnost ćelija određivana je kao što je prethodno opisano za ćelije pluća.

Ćelije su zasejane ( $1 \times 10^6$  ćelija u finalnoj zapremini od 220  $\mu\text{l}$ ) i gajene su u samom medijumu ili u prisustvu toplotom inaktivisanih konidija tokom 48 h. Nakon kultivacije izdvajan je kondicionirani medijum centrifugiranjem 10 min na 260 x g.

### **3.9. *In vitro* efekat kadmijuma na leukocite pluća - ispitivanje uloge aril-ugljovodoničnog receptora**

Leukociti izolovani enzimskom digestijom iz pluća zdravih netretiranih životinja ( $4 \times 10^6$  ćelija/bunariću) gajeni su 48 h radi određivanja produkcije citokina i nivoa iRNK, sa različitim koncentracijama kadmijuma (1, 5, 10, 50  $\mu\text{M}$ ) sa ili bez antagonista AhR CH-223191.

### **3.10. Izolovanje ukupne RNK, reakcije reverzne transkripcije i kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (*engl.* Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, Real-Time qPCR)**

#### **3.10.1. Izolovanje ukupne RNK**

Određivanje nivoa informacione (iRNK) za ciljane proteine u tkivu pluća, ćelijama pluća i limfnim čvorovima medijastinuma vršeno je pomoću reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu nakon izolacije ukupne RNK i reverzne transkripcije (Bustin, 2000).

Ukupna RNK izolovana je pomoću mi-Total RNA Isolation Kit (Metabion, Martinsried, Nemačka) prema uputstvima proizvođača. Sledeći korak podrazumevao je merenje količine RNK u uzorcima i podešavanje njene koncentracije kako bi u reakciju reverzne transkripcije ušla ista količina RNK svakog uzorka (1  $\mu\text{g}$  RNK).

#### **3.10.2. Reakcija reverzne transkripcije**

Reakcija reverzne transkripcije se koristi da bi se izolovana RNK prevela u komplementarnu DNK (cDNK). Reakciona smeša koja se sastoji od: ukupne RNK, nasumičnih heksamernih prajmera i smeše dezoksiribonukleotidtrifosfata inkubirana je na temperaturi od 70 °C u cilju denaturacije sekundarne strukture RNK. Nakon toga je reakcija nastavljena dodavanjem enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije, pufera za reverznu transkripciju (5x Reaction buffer) i inhibitora RNaza prema zadatom programu za reverznu transkripciju (Biometra T-personal Combi Thermo Cycler 050-552, Nemačka): a) inkubacija na 25 °C (15 min), b) inkubacija na 42 °C (60 min) i c) prekid inkubacije na 70 °C (10 min) i 95 °C (3 min). Dobijena cDNK razblažena je u DEPC H<sub>2</sub>O (*engl.* Diethylpyrocarbonate treated water) i čuvana na -20 °C do dalje upotrebe.

#### **3.10.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu**

Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu korišćena je za analizu relativne promene nivoa iRNK gena od interesa. Amplifikacija 2  $\mu\text{l}$  cDNK u 10  $\mu\text{l}$  reakcione smeše za PCR rađena je u aparatu za Real-Time qPCR (QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Instrument, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) upotrebom Power SYBR® Green PCR Master Mix-a. Umnožavanje ciljnih iRNK vršeno je po unapred zadatom programu na aparatu: 50 °C (2 min), 95 °C (10 min), 95 °C (15 s) i 40 ciklusa umnožavanja (60 °C tokom 60 s), zatim 95 °C (15 s), 60 °C (60 s) i 95 °C (1s). Dobijeni rezultati su analizirani pomoću softverskog programa (QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.4.3, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Nivo iRNK u uzorku preračunavan je na osnovu nivoa iRNK za referentni protein ( $\beta$ -aktin) u uzorcima po formuli  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  gde je  $\Delta\text{Ct}$  razlika između Ct (*engl.* Threshold Cycle) vrednosti iRNK gena od interesa i iRNK  $\beta$ -aktina. Nukleotidne sekvence prajmera predstavljene su u Tabeli 2.



**Tabela 2. Nukleotidne sekvence prajmera**

Sekvenca prajmera		
	5' - 3' nizvodni (forward)	3' - 5' uzvodni (reverse)
β-aktin	CCCTGGCTCCTAGCACCAT	GAGCCACCAATCCACACAGA
IL-1β	CACCTCTCAAGCAGAGCA	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
IL-6	GCCCTTCAGGAACAGCTATGA	TGTCAACAACATCAGTCCCAAG
TNF	TCGAGTGACAAGCCCGTAGC	CTCAGCCACTCCAGCTGCTC
IFN-γ	TGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAG	TGCAGGATTTTCATGTCACCA
IL-17	ATCAGGACGCGCAAACATG	TGATCGCTGCTGCCTTCA
IL-10	GAAGACCCTCTGGATACAGCTGC	TGCTCCACTGCCTTGCTTTT
MT-1	GAAGTCAAATGCACCTCCTGC	CAAGACTCTGAGTTGGTCCG
MT-2	TGCAAGAAAAGCTGCTGTTCC	TTACACCATTGTGAGGACGCC
AhR	GCTGTGATGCCAAAGGGCAGC	TGAAGCATGTCAGCGGCGTGGAT
CYP1A1	GGGGAGGTTACTGGTTCTGG	CGGATGTGGCCCTTCTCAA
CYP1B1	CTCATCCTCTTTACCAGATACCCG	GACGTATGGTAAGTTGGGTTGGTC
NLRP3	CAGAAGCTGGGGTTGGTGAA	CCCATGTCTCCAAGGGCATT
MUC5b	CCTGAAGTCTTCCCCAGCAG	GCATAGAATTGGCAGCCAGC
MUC5ac	ACCACGGATATCAGAACCAGC	TGTCAAGCCACTTGGTCCAG

### 3.11. Određivanje koncentracije citokina imunoenzimskim testom na čvrstoj fazi (*engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA*)

Koncentracija citokina određivana je u homogenatu tkiva pluća i kondicioniranom medijumu leukocita pluća i limfnim čvorovima medijastinuma. Za određivanje koncentracije citokina korišćeni su komercijalni parovi antitela za: pacovski IL-1β, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ i mišji IL-17 koji je unakrsno reaktivan sa pacovskim. Reakcija je izvođena prema uputstvu proizvođača. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 450 nm, a korekcija je rađena na 540 nm. Koncentracija citokina preračunavana je sa standardne prave konstruisane na osnovu vrednosti apsorbaneci poznatih koncentracija relevantnog citokina i izražavana u pg/ml.

### 3.12. Određivanje direktnog efekta kadmijuma na rast *A. fumigatus*

Sposobnost kadmijuma da utiče na rast *A. fumigatus* određivana je *in vitro* na osnovu stepena klijanja konidija i redukcije MTT od strane formiranih vijabilnih hifa (Levitz i Diamond, 1985).

Stepen klijanja konidija određivan je 8 h nakon inkubacije na 37 °C zasejanih 10<sup>7</sup> konidija/ml (u SDB medijumu) u prisustvu CdCl<sub>2</sub> (0 μg/l, 50 μg/l, 100 μg/l, 500 μg/l) ili u RPMI-1640 sa 5% homogenata pluća kontrolnih životinja ili jedinki koje su oralnim putem unosile CdCl<sub>2</sub> tokom 30 dana (5 ppm). Preparati su bojeni laktofenol-plavim i najmanje 300 konidija je brojano na svetlosnom mikroskopu.

Vijabilnost hifa formiranih 18 h nakon zasejavanja konidija (4 x 10<sup>4</sup>) u prisustvu CdCl<sub>2</sub> (10 μg/l) ili 5% homogenata pluća iz kontrolnih jedinki ili jedinki tretiranih sa 5 ppm kadmijuma (0 mg/l i 5 mg/l) na 37 °C određivana je nakon 3 h inkubacije sa MTT. Nastali formazan je ekstrahovan izopropanolom, a apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 540 nm, a korekcija je rađena na 670 nm. Uzorci su postavljeni u triplikatu, a vijabilnost je izražavana kao srednja vrednost apsorbance za triplikat kulture.

### 3.13. Statistička obrada rezultata

Rezultati eksperimenata predstavljeni su kao srednja vrednost svih merenja sa standardnom greškom (± SEM). Statistička obrada podataka je rađena u kompjuterskom softveru Statsoft

STATISTICA v7.0.61.0. (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD) i korišćeni su Mann-Whitney U test i ANOVA praćena Tucky-jevim testom. Statistički značajnim smatrane su P vrednosti manje od 0,05.

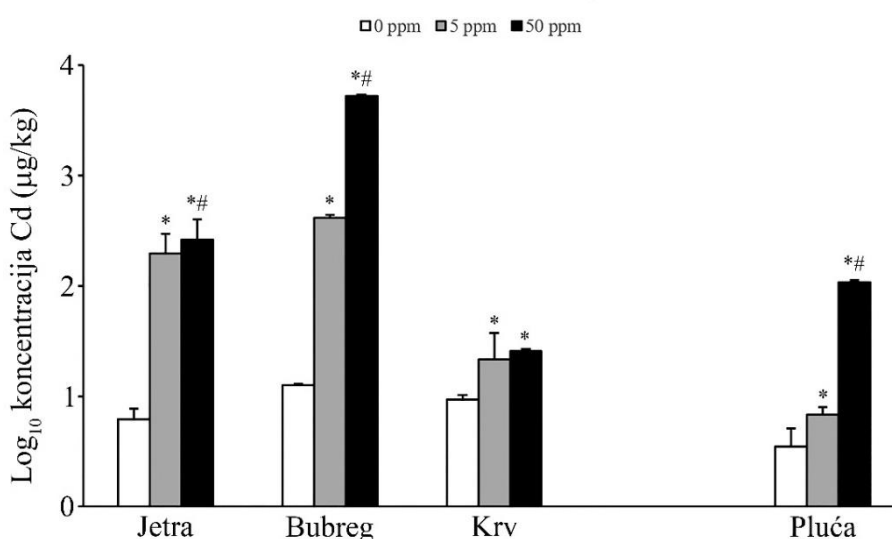
## **4. REZULTATI**

## 4.1. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma u fiziološkim uslovima

### 4.1.1. Osnovni podaci

Produženi oralni tretman kadmijumom u trajanju od 30 dana nije doveo do razlika u unosu hrane između kontrolnih ( $14,8 \pm 0,9$  g) i pacova tretiranih nižom ( $14,3 \pm 1,2$  g) i višom ( $15 \pm 1,4$  g) dozom kadmijuma. Takođe, nije bilo razlika ni u prinosu telesne mase (računatom kao razlika u telesnoj masi na kraju i početku tretmana) između kontrolnih ( $89,95 \pm 23,94$  g; opseg 43-120 g) i životinja tretiranih nižom ( $86,74 \pm 19,48$  g; opseg 54-120 g) i višom dozom kadmijuma ( $80,87 \pm 23,07$  g; opseg 51-120 g). Prosečan dnevni unos kadmijuma preračunat na osnovu popijene tečnosti i telesne mase životinja, je  $0,80 \pm 0,34$  mg/kg (opseg 0,37-2,17 mg/kg) kod životinja koje su pile nižu dozu kadmijuma i  $6,32 \pm 2,20$  mg/kg (opseg 3,5-12,4 mg/kg) kod životinja koje su pile višu dozu.

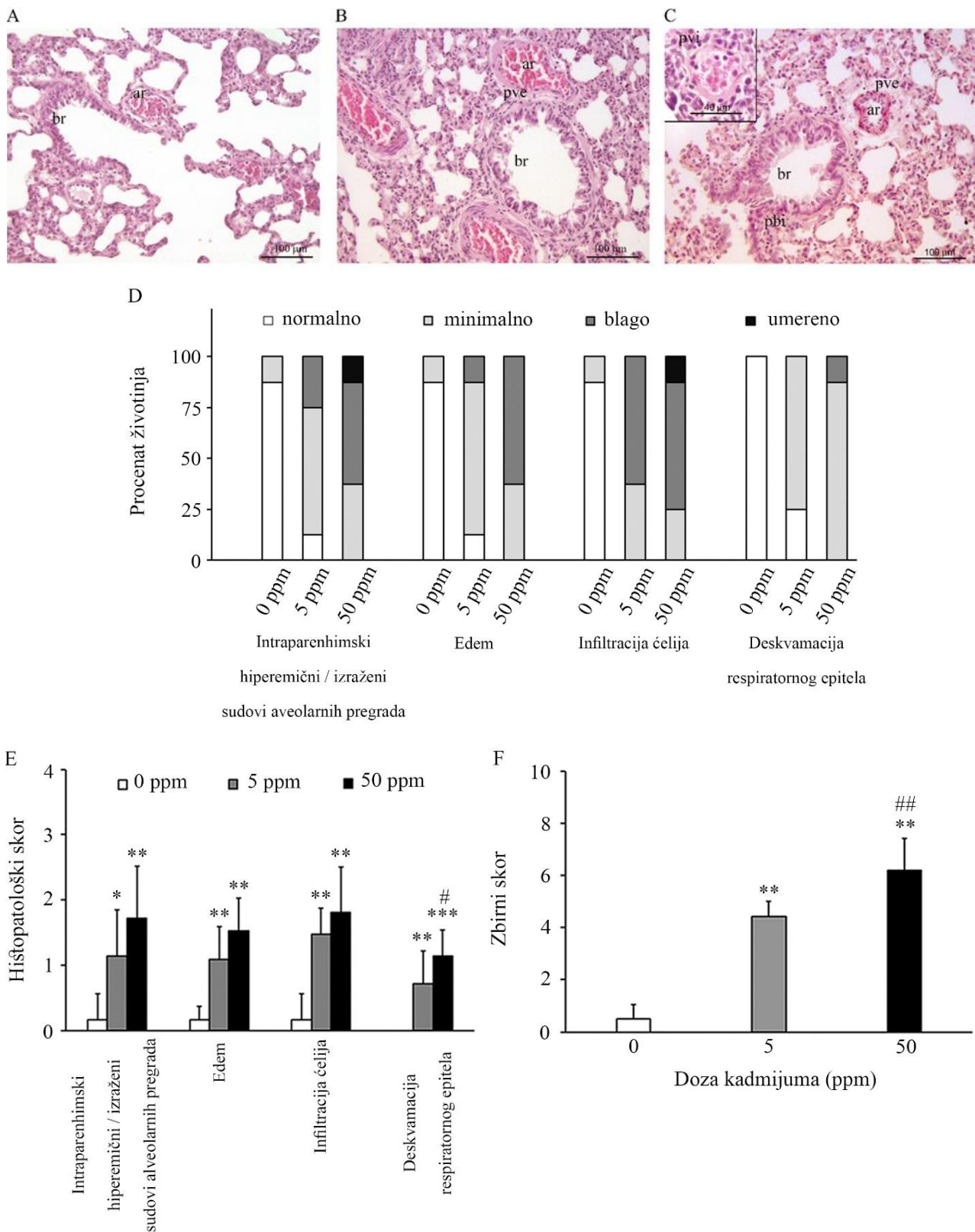
Dozno-zavisno povećanje nivoa metala zapaženo je u perifernim organima, pri čemu je najveće deponovanje u bubrezima i jetri. Značajni nivoi kadmijuma uočeni su i u plućima i krvi životinja izloženih ovom metalu (Grafik 1).



**Grafik 1. Deponovanje kadmijuma u tkivima nakon oralnog unosa ovog metala.** Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti za osam životinja po grupi  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05 vs. Cd 0 ppm; #P < 0,05 vs. Cd 5 ppm.

### 4.1.2. Histološka analiza pluća nakon produženog oralnog unosa kadmijuma

Histološka analiza tkiva pluća životinja koje su bile tretirane nižom dozom kadmijuma pokazala je da u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 8A) kadmijum uzrokuje pojavu perivaskularnog i peribronhijalnog edema i dovodi do infiltracije ćelija u tkivo i deskvamacije respiratornog epitela (Slika 8B). Zapažene promene su bile uočene u plućima većine tretiranih jedinki, a intenzitet promena procenjen na osnovu semikvantitativne analize tkiva je varirao od minimalnih do blagih (Slika 8D, E). U plućima svih jedinki izloženih višoj dozi kadmijuma (Slika 8C) su zapaženi perivaskularni edem i perivaskularna, peribronhijalna i intersticijalna infiltracija. Histopatološki skor za ispitivane parametre se kretao od minimalnog do umerenog (Slika 8D, E). Preračunavanje zbirnog skora svih histopatoloških promena pokazalo je dozno-zavisno povećanje nakon unosa kadmijuma (Slika 8F).



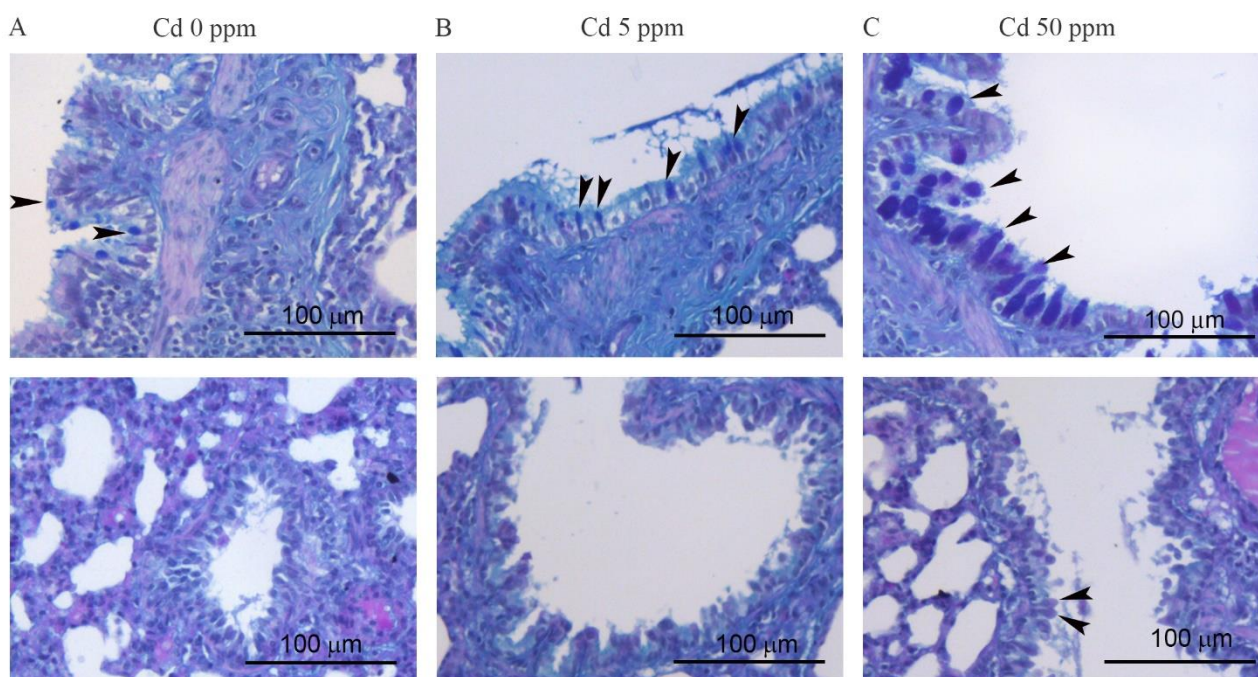
**Slika 8. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na pluća.** (A, B, C) Reprezentativne mikrografije preseka pluća iz kontrolnih životinja (A) i životinja izloženih 5 ppm kadmijuma (B) i 50 ppm (C) bojenih hematoksilinom i eozinom (H&E). (D) Distribucija histopatoloških skorova za određene parametre kod kontrolnih i životinja tretiranih kadmijumom. (E) Histopatološki skor za posmatrane parametre. (F) Zbirni skor svih histopatoloških promena. Insert na C: značajna perivaskularna infiltracija. Skraćenice: ar - arteriola, br - bronhiola, pve - perivaskularni edem, pvi - perivaskularna infiltracija, pbi - peribronhijalna infiltracija. Bar = 100  $\mu$ m, 40  $\mu$ m (insert). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti za osam životinja po grupi  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 vs. Cd 0 ppm; #P < 0,05, ##P < 0,01 vs. Cd 5 ppm.

Broj peharastih ćelija je određen na presecima tkiva pluća bojenih alcijan plavo-PAS metodom. Tretman kadmijumom doveo je do povećanja broja peharastih ćelija u većim vazdušnim putevima pluća (Tabela 3, Slika 9B, C) u poređenju sa kontrolom (Slika 9A). Viša doza kadmijuma je dovela i do pojave peharastih ćelija u vazdušnim putevima pluća sa dijametrom manjim od 300  $\mu\text{m}$  (Tabela 3 i Slika 9C).

**Tabela 3. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na broj peharastih ćelija u vazdušnim putevima životinja.**

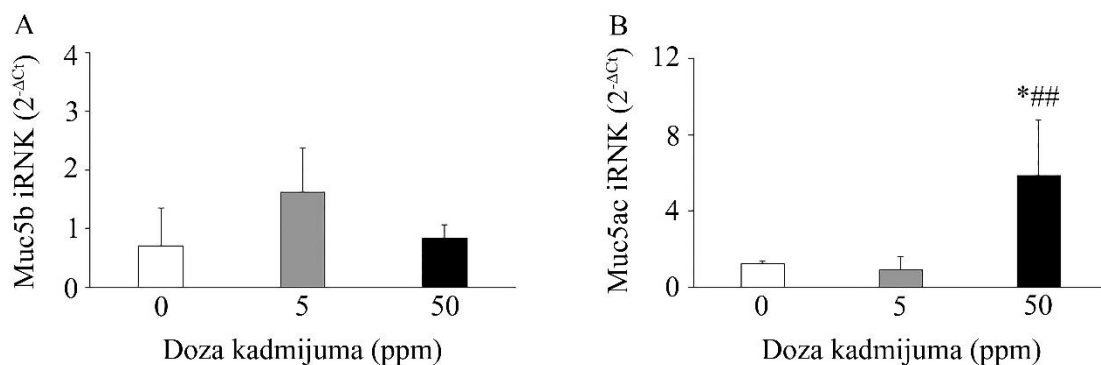
Doza Cd (ppm)	Peharaste ćelije (N/mm luminalnog perimetra)	
	Mali vazdušni putevi	Veliki vazdušni putevi
0	0 $\pm$ 0	1,7 $\pm$ 0,9 (0 - 1,9)
5	0 $\pm$ 0	10,6 $\pm$ 2,5 (8,1 - 13,1)
50	2,3 $\pm$ 3,3 (0-10,1)	58,3 $\pm$ 46,2 (34,6 - 137,1)

Mali vazdušni putevi – vazdušni putevi sa dijametrom manjim od 300  $\mu\text{m}$ . Veliki vazdušni putevi – vazdušni putevi sa dijametrom većim od 300  $\mu\text{m}$ . Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi  $\pm$  SEM. Opseg je dat u zagradama.



**Slika 9. Peharaste ćelije u vazdušnim putevima životinja nakon produženog oralnog unosa kadmijuma.** (A) Kontrolne životinje. (B) Životinje izložene 5 ppm kadmijuma. (C) Životinje izložene 50 ppm kadmijuma. Reprezentativne mikrografije vazdušnih puteva pluća velikog (gore) i malog (dole) dijametra bojenih AB-PAS metodom. Bar = 100  $\mu\text{m}$ ; strelice - peharaste ćelije.

Da bismo proverili da li povećanje broja peharastih ćelija rezultira u povećanoj produkciji mukusa, ispitivani su nivoi iRNK za glavne komponente mukusa, Muc5ac i Muc5b u tkivu pluća. Promena u nivou iRNK za mucin Muc5b nije uočena, dok je povećanje nivoa iRNK za Muc5ac zabeleženo samo kod jedinki koje su pile višu dozu kadmijuma (Grafik 2).

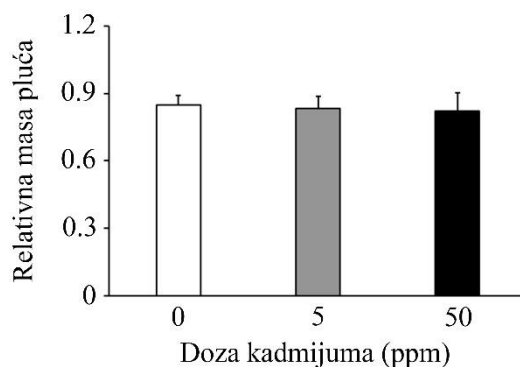


**Grafik 2. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na nivo iRNK za mucine u plućima.** (A) Muc5b. (B) Muc5ac. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti za osam životinja po grupi ± SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05 vs. Cd 0 ppm; ##P < 0,01 vs. Cd 5 ppm.

#### 4.1.3. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na imunski odgovor u plućima

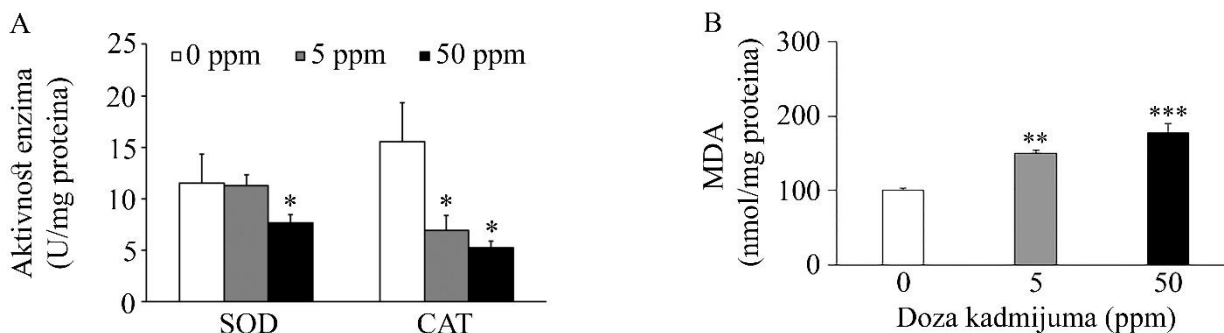
Efekat kadmijuma na pluća je procenjivan na osnovu promena relativne mase tkiva, oksidativnog stresa izazvanog metalom (nivo malon-dialdehida i aktivnost enzima antioksidativne zaštite) i inflamacije u tkivu (nivo MPO i citokina). Odgovor pluća na prisustvo kadmijuma u tkivu je procenjen i na osnovu nivoa iRNK za metalotioneine.

Tretman kadmijumom nije doveo do promena u relativnoj masi pluća životinja (Grafik 3).



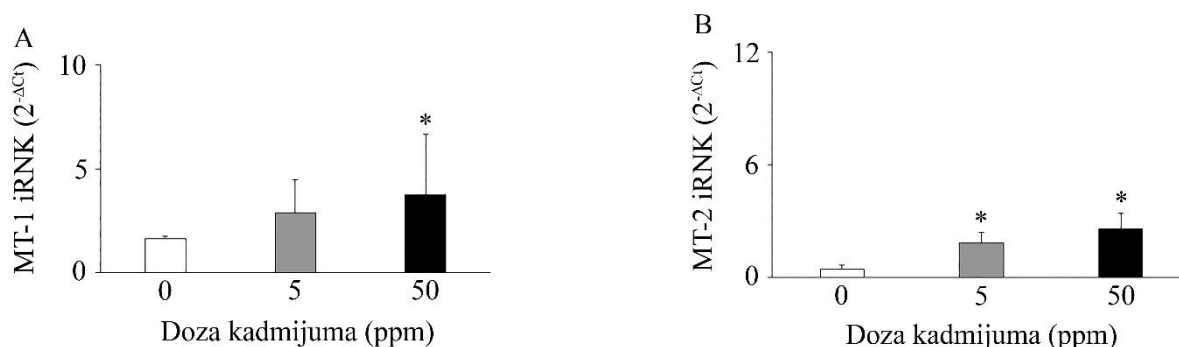
**Grafik 3. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na relativnu masu pluća.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi ± SEM.

Merenje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, SOD i CAT, pokazalo je da dolazi do značajnog smanjenja aktivnosti oba enzima na višoj dozi kadmijuma i smanjenja aktivnosti CAT na nižoj dozi (Grafik 4A), kao i povećanog oštećenja lipida u biomembranama kod jedinki koje su bile izložene kadmijumu (Grafik 4B).



**Grafik 4. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na parametre oksidativnog stresa u homogenatu pluća.** (A) Aktivnost SOD i CAT. (B) Nivo MDA. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi ± SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 vs. Cd 0 ppm.

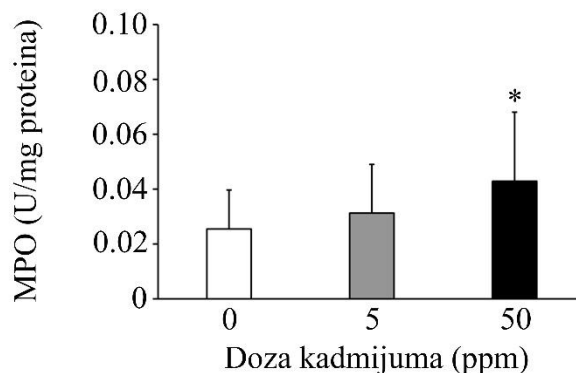
U odgovoru na prisustvo kadmijuma u tkivu pluća zapaženo je povećanje nivoa iRNK za MT-1 i MT-2 kod jedinki koje su pile višu dozu kadmijuma i MT-2 kod jedinki koje su pile nižu dozu (Grafik 5).



**Grafik 5. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na nivo iRNK za MT-1 i MT-2 u homogenatu pluća.** (A) MT-1. (B) MT-2. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi ± SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05 vs. Cd 0 ppm.

Inflamacija u plućima izazvana kadmijumom je procenjena na osnovu nivoa MPO i nivoa proinflamatornih citokina (IL-1β, TNF, IL-6, IFN-γ i IL-17) i imunoregulatornog citokina IL-10.

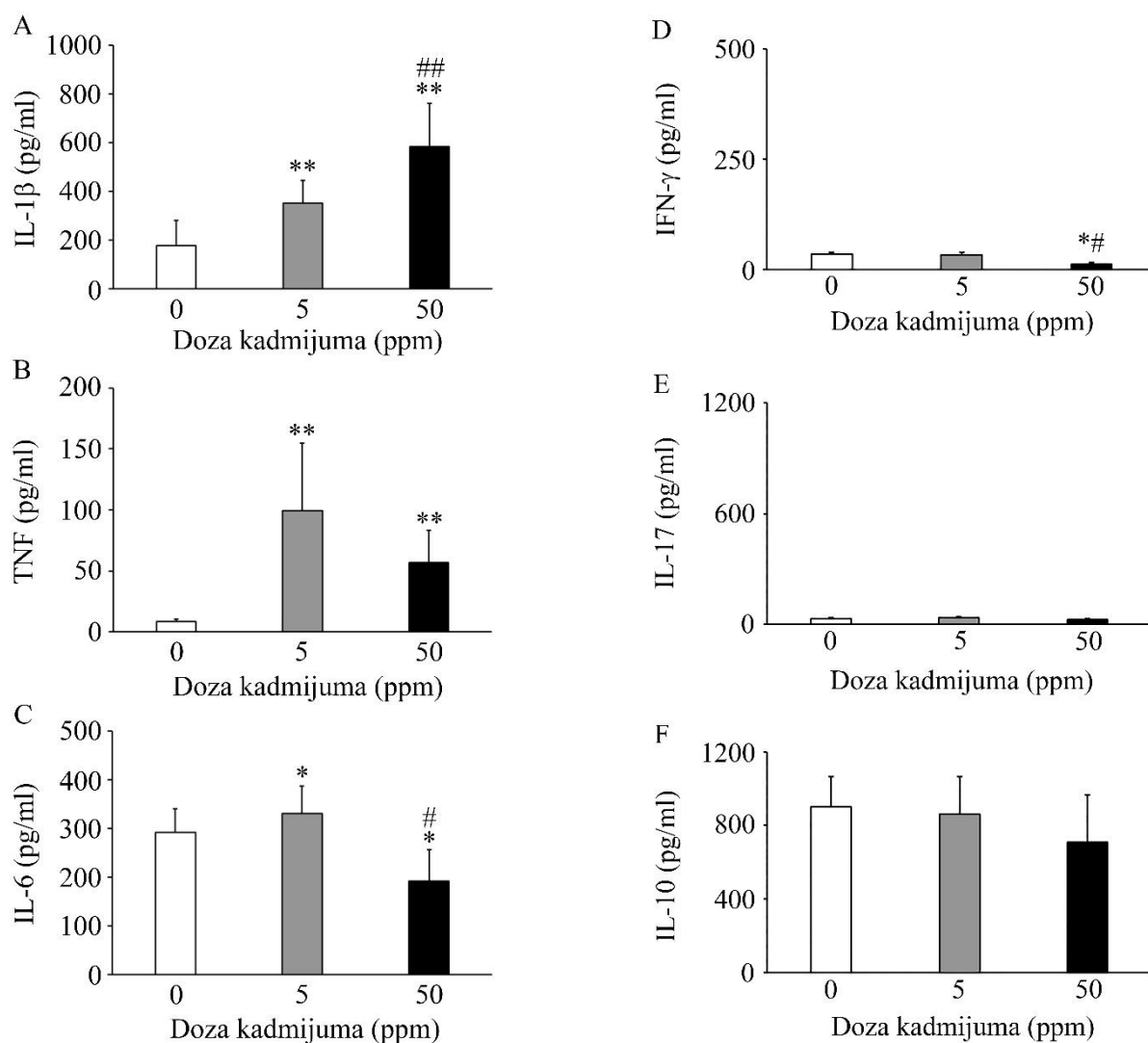
Značajno povećanje aktivnosti MPO uočeno je samo u odgovoru na višu dozu kadmijuma (Grafik 6).



**Grafik 6. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na nivo MPO u homogenatu pluća.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi ± SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05 vs. Cd 0 ppm.

Merenje koncentracija proinflamatornih citokina u homogenatu pluća je pokazalo dozno-zavisno povećanje IL-1β (Grafik 7A), povećanje nivoa TNF na obe doze kadmijuma (Grafik 7B) i povećanje nivoa IL-6 na nižoj dozi kadmijuma, dok je niži nivo IL-6 zabeležen na 50 ppm u poređenju sa kontrolom (Grafik 7C). Uočeno je i smanjenje nivoa IFN-γ kod jedinki izloženih višoj dozi metala (Grafik 7D), dok nivo IL-17 (Grafik 7E) i IL-10 (Grafik 7F) nije bio promenjen u odgovoru na prisustvo kadmijuma.

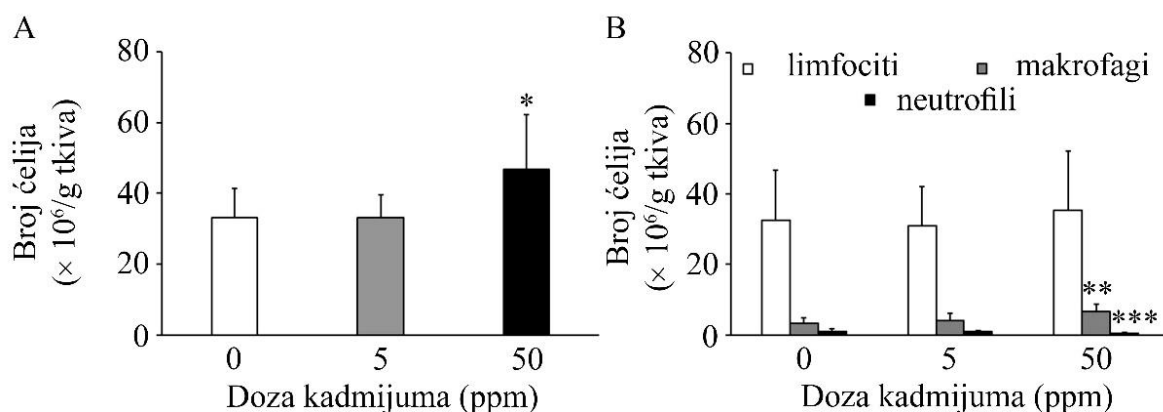




**Grafik 7. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na nivo citokina u homogenatu pluća.** (A) IL-1β. (B) TNF. (C) IL-6. (D) IFN-γ. (E) IL-17. (F) IL-10. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi ± SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 vs. Cd 0 ppm; #P < 0,05, ###P < 0,01 vs. Cd 5 ppm.

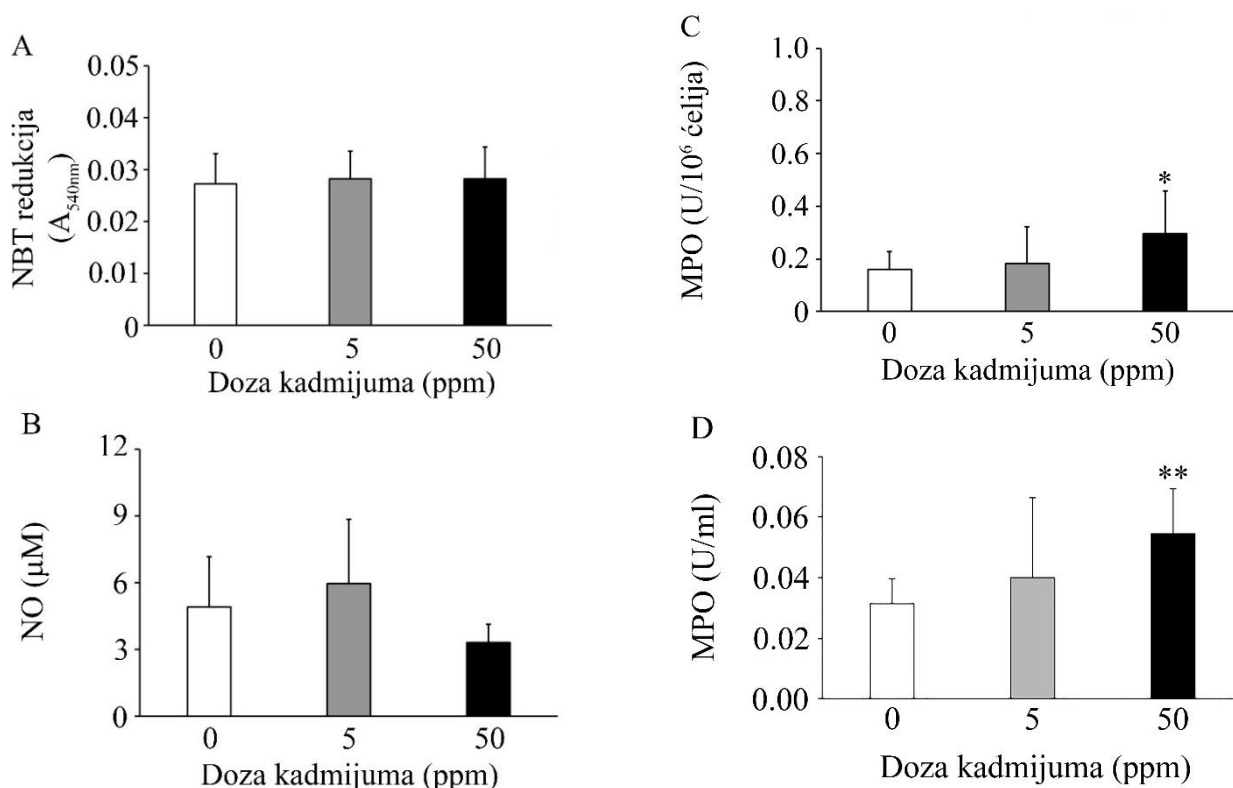
#### 4.1.4. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na leukocite izolovane iz pluća

Oralni unos više doze kadmijuma doveo je do povećanja broja leukocita izolovanih iz tkiva pluća enzimskom digestijom (Grafik 8A), što je posledica povećanja broja makrofaga u plućima (Grafik 8B). Nisu zabeležene značajne promene u broju izolovanih limfocita, dok se broj PMN smanjio nakon unosa više doze kadmijuma (Grafik 8B).



**Grafik 8. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na prinos i diferencijalni sastav leukocita pluća.** (A) Broj leukocita u plućima. (B) Apsolutni broj limfocita, makrofaga i neutrofila. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs. Cd 0 ppm.

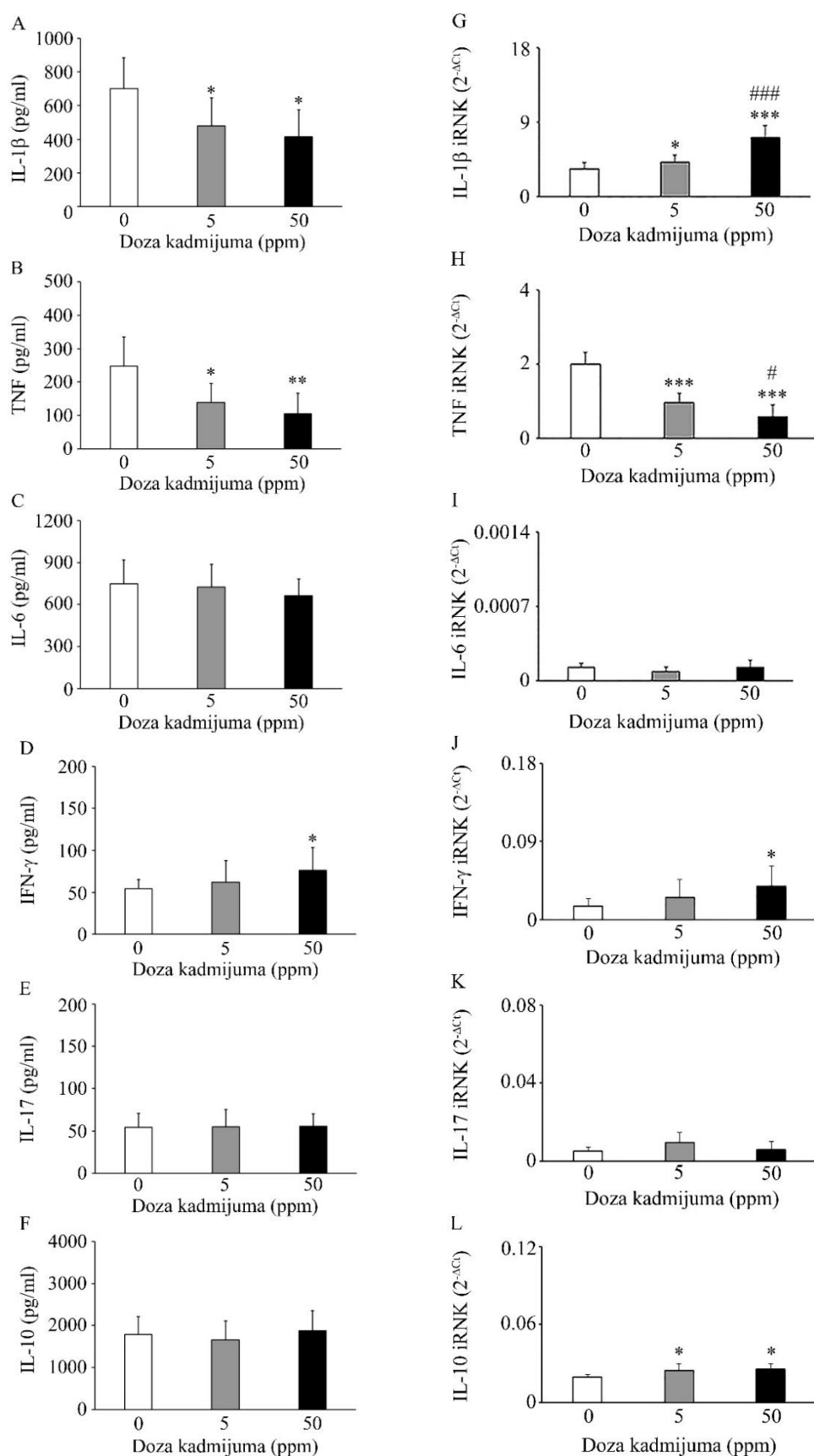
Ispitivanje aktivnosti leukocita izolovanih iz pluća pokazalo je da nema promena u produkciji ROK (mereno na osnovu stepena redukcije NBT) (Grafik 9A) ni azota (produkcija NO) (Grafik 9B) u odgovoru na kadmijum, ali se nivo kako unutarćelijske (Grafik 9C), tako i produkovane MPO (Grafik 9D) povećao u odgovoru na unos više doze kadmijuma.



**Grafik 9. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na aktivnost leukocita pluća.** (A) NBT redukcija. (B) Produkcija NO. (C) Nivo MPO u ćelijama. (D) Produkovana MPO. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  vs. Cd 0 ppm.

Merenje produkcije citokina i nivoa iRNK za citokine od strane leukocita izolovanih iz pluća pokazalo je da kadmijum dovodi do smanjenja produkcije IL-1 $\beta$  (Grafik 10A) ali dozno-zavisnog povećanja nivoa njegove iRNK (Grafik 10G). Produkcija TNF (Grafik 10B) i nivo iRNK za TNF (Grafik 10H) su smanjeni na obe doze kadmijuma, a IFN- $\gamma$  povećani na višoj dozi kadmijuma (Grafik 10D, J). Kadmijum ne dovodi do promena u IL-6 (Grafik 10C, I) i IL-17 (Grafik 10E, K) ni na nivou

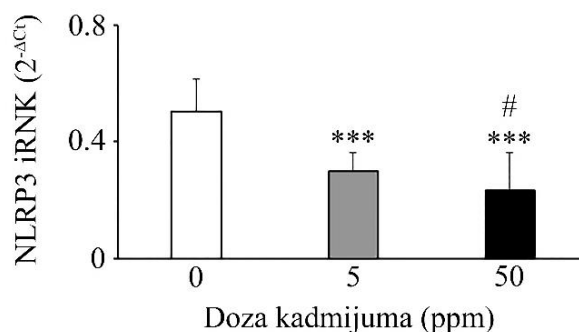
iRNK ni na proteinskom nivou. Promene u nivou produkcije IL-10 takođe nisu uočene (Grafik 10F), dok je na nivou iRNK zabeleženo povećanje (Grafik 10L).



**Grafik 10. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na produkciju citokina i nivo iRNK za citokine od strane leukocita pluća.** Produkcija citokina IL-1β (A) i nivo iRNK za IL-1β (G). Produkcija citokina TNF (B) i nivo iRNK za

TNF (H). Produkcija citokina IL-6 (C) i nivo iRNK za IL-6 (I). Produkcija citokina IFN- $\gamma$  (D) i nivo iRNK za IFN- $\gamma$  (J). Produkcija citokina IL-17 (E) i nivo iRNK za IL-17 (K). Produkcija citokina IL-10 (F) i nivo iRNK za IL-10 (L). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 vs. Cd 0 ppm; #P < 0,05, ###P < 0,001 vs. Cd 5 ppm.

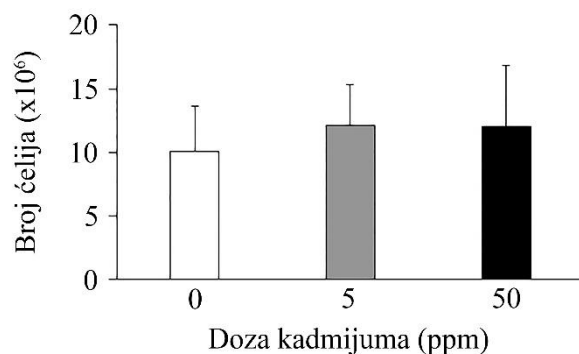
Objašnjenje razlika u IL-1 $\beta$  odgovoru na kadmijum na nivou produkcije citokina (smanjena) i nivoa iRNK (povećan), izvršeno je ispitivanjem nivoa iRNK za NLRP3 komponentu inflamazoma (molekula koji je odgovoran za obradu pro-IL-1 $\beta$  u IL-1 $\beta$ ). Kadmijum je doveo do dozno-zavisnog smanjenja nivoa iRNK za NLRP3 u ćelijama izolovanim iz pluća (Grafik 11).



**Grafik 11. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na nivo iRNK za NLRP3 komponentu inflamazoma.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike: \*\*\*P < 0,001 vs. Cd 0 ppm; #P < 0,05 vs. Cd 5 ppm.

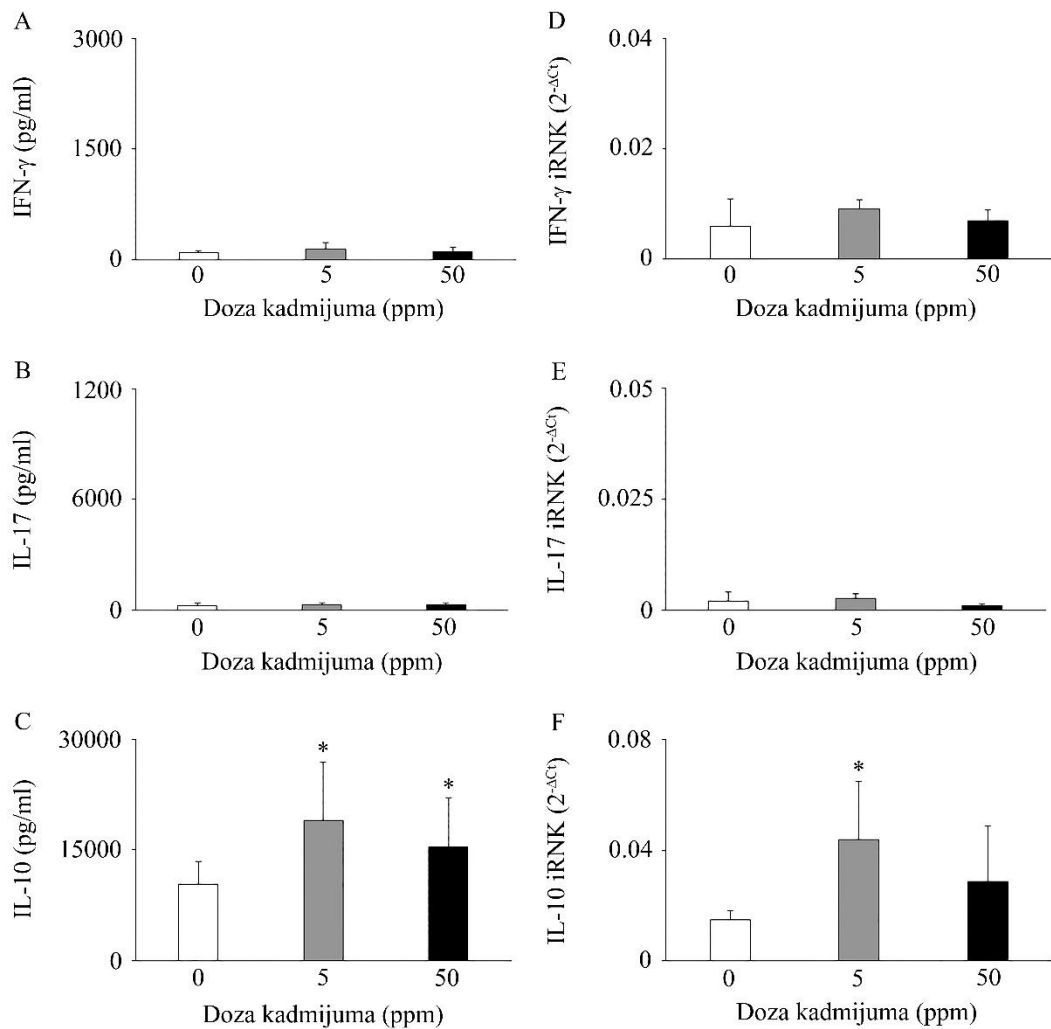
#### 4.1.5. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na odgovor limfnih čvorova medijastinuma

Ispitivanje efekta kadmijuma na regionalne limfne čvorove koji dreniraju tkivo pluća je pokazalo da ne dolazi do povećanja broja ćelija u ovim čvorovima u odgovoru na metal (Grafik 12).



**Grafik 12. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na celularnost limfnih čvorova medijastinuma.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi  $\pm$  SEM.

Analiza produkcije proinflamatornih citokina i nivoa iRNK za proinflamatorne citokine IFN- $\gamma$  i IL-17 pokazala je da kadmijum ne uzrokuje promene ni na nivou iRNK ni na nivou produkcije proteina u ćelijama limfnih čvorova medijastinuma. Nasuprot proinflamatornim citokinima, povećana je produkcija anti-inflamatornog/imunoregulatornog citokina IL-10 na obe doze kadmijum, dok je povećanje nivoa iRNK za ovaj citokin uočeno samo na nižoj dozi (Grafik 13).

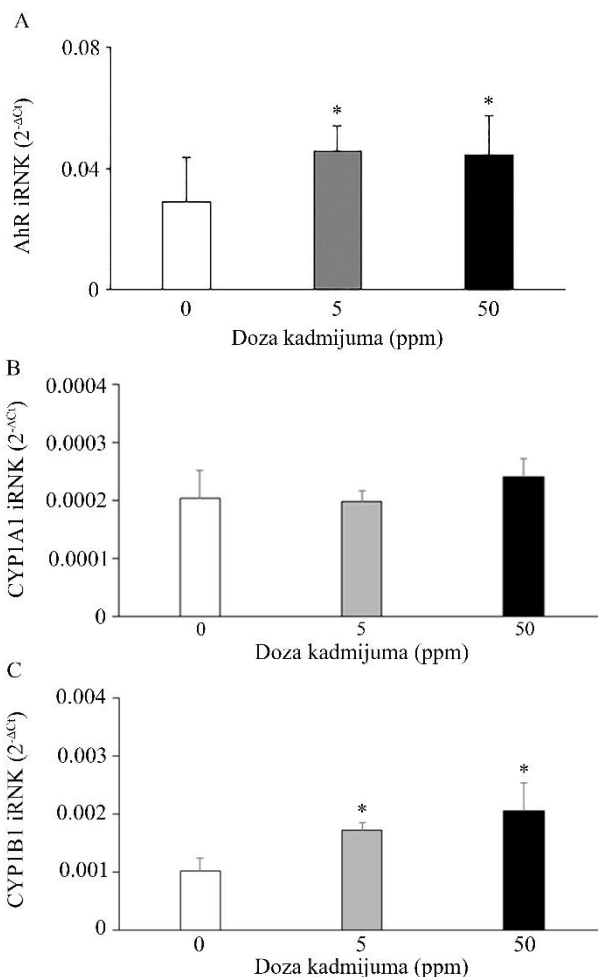


**Grafik 13. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na produkciju citokina i nivo iRNK za citokine u limfnim čvorovima medijastinuma.** Produkcija citokina IFN- $\gamma$  (A) i nivo iRNK za IFN- $\gamma$  (D). Produkcija citokina IL-17 (B) i nivo iRNK za IL-17 (E). Produkcija citokina IL-10 (C) i nivo iRNK za IL-10 (F). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost za osam životinja po grupi  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05 vs. Cd 0 ppm.

## 4.2. Uloga aril-ugljovodoničnog receptora u imunotoksičnosti izazvanoj kadmijumom

### 4.2.1. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na nivo iRNK za AhR, CYP1A1 i CYP1B1 u leukocitima pluća

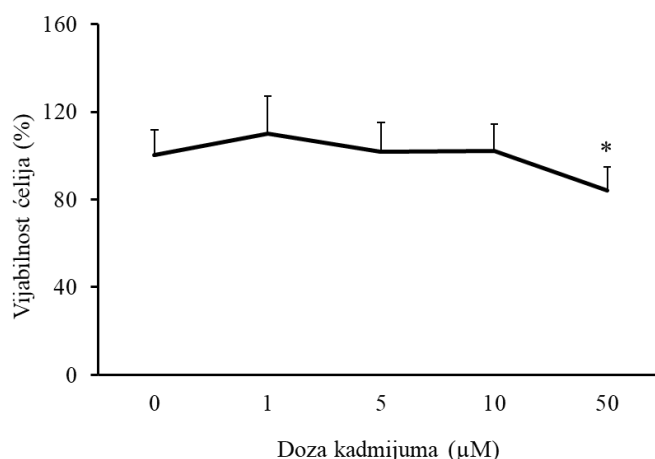
Ispitivanje aktiviranosti AhR signalnog puta u plućima jedinki izloženih dejstvu kadmijuma, izvršeno je određivanjem nivoa iRNK za ovaj molekul, kao i za CYP1A1 i CYP1B1 u leukocitima izolovanim iz pluća. Povećanje nivoa iRNK za AhR je zabeleženo u leukocitima pluća životinja koje su pile kadmijum (Grafik 14A). Nivo iRNK za CYP1A1 nije promenjen u odgovoru na prisustvo kadmijuma (Grafik 14B), dok se nivo iRNK za CYP1B1 povećao (Grafik 14C).



**Grafik 14. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na nivo iRNK za (A) AhR, (B) CYP1A1 i (C) CYP1B1 u leukocitima pluća.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike: \* $P < 0,05$  vs. Cd 0 ppm.

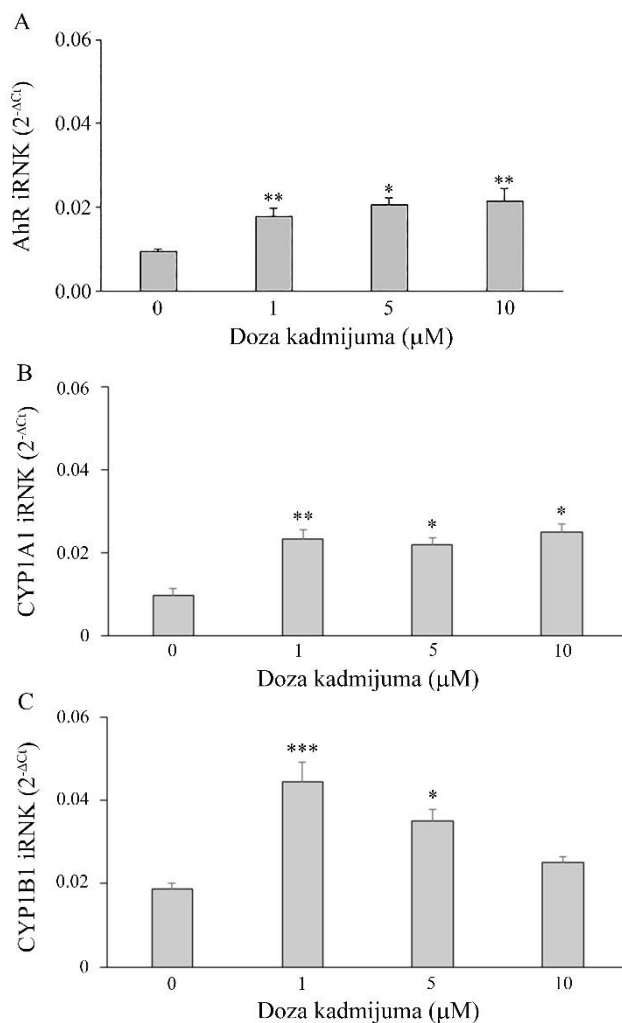
### 4.2.2. Efekat kadmijuma na nivo iRNK za AhR, CYP1A1 i CYP1B1 leukocita izolovanih iz pluća zdravih netretiranih jedinki *in vitro*

Detaljnije ispitivanje uloge AhR u toksičnosti kadmijuma na pluća, izvršeno je izlaganjem leukocita izolovanih iz pluća zdravih netretiranih životinja kadmijumu *in vitro* i merenjem nivoa iRNK za AhR i CYP-ove. Vijabilnost ćelija određena nakon stimulacije rastućim koncentracijama kadmijuma (1, 5, 10 i 50  $\mu$ M) je pokazala da najviša primenjena koncentracija dovodi do smrti 15,6% ćelija u kulturi (Grafik 15), tako da su za dalja ispitivanja korišćene samo neletalne doze.



**Grafik 15. Vijabilnost leukocita pluća izolovanih iz zdravih netretiranih životinja nakon *in vitro* izlaganja kadmijumu.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05 vs. Cd 0  $\mu$ M.

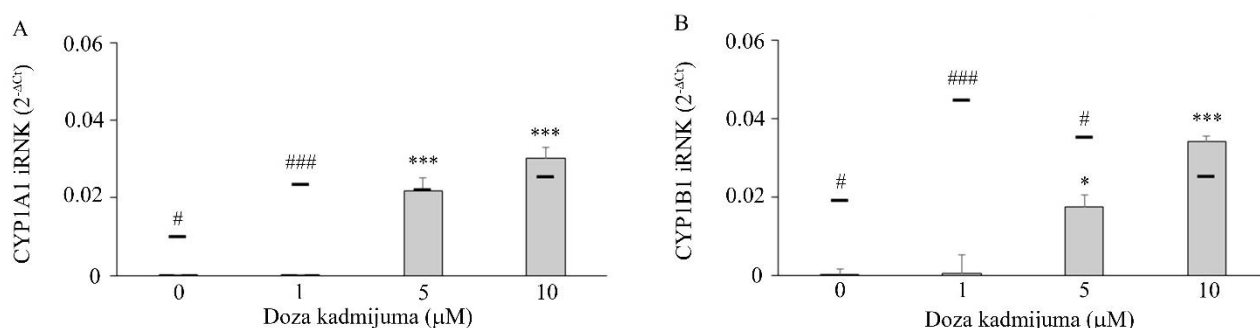
U leukocitima izolovanim iz pluća je zabeleženo povećanje nivoa iRNK za AhR (Grafik 16A) i CYP1A1 (Grafik 16B) nakon izlaganja svim ispitivanim dozama kadmijuma i povećanje nivoa iRNK za CYP1B1 nakon izlaganja 1 i 5  $\mu$ M kadmijuma (Grafik 16C).



**Grafik 16. Nivo iRNK za (A) AhR, (B) CYP1A1 i (C) CYP1B1 u leukocitima pluća izolovanim iz zdravih netretiranih životinja nakon *in vitro* izlaganja kadmijumu.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 vs. Cd 0  $\mu$ M.

Potvrda da je efekat kadmijuma na promenu nivoa iRNK za CYP-ove posledica aktivacije AhR izazvane ovim metalom, izvršena je određivanjem nivoa iRNK za CYP1A1 i CYP1B1 u prisustvu antagonista AhR, CH-223191.

U prisustvu CH-223191 došlo je do smanjenja (u poređenju sa nivoom zabeleženim u ćelijama koje su gajene u odsustvu antagonista) iRNK za CYP1A1 kod ćelija tretiranih sa 0 i 1  $\mu\text{M}$  kadmijuma i iRNK za CYP1B1 kod ćelija tretiranih sa 0, 1 i 5  $\mu\text{M}$  kadmijuma (Grafik 17). Pošto je efekat antagonista uočen u ćelijama tretiranim sa 1 i 5  $\mu\text{M}$  kadmijuma, te doze su korišćene u narednim eksperimentima.



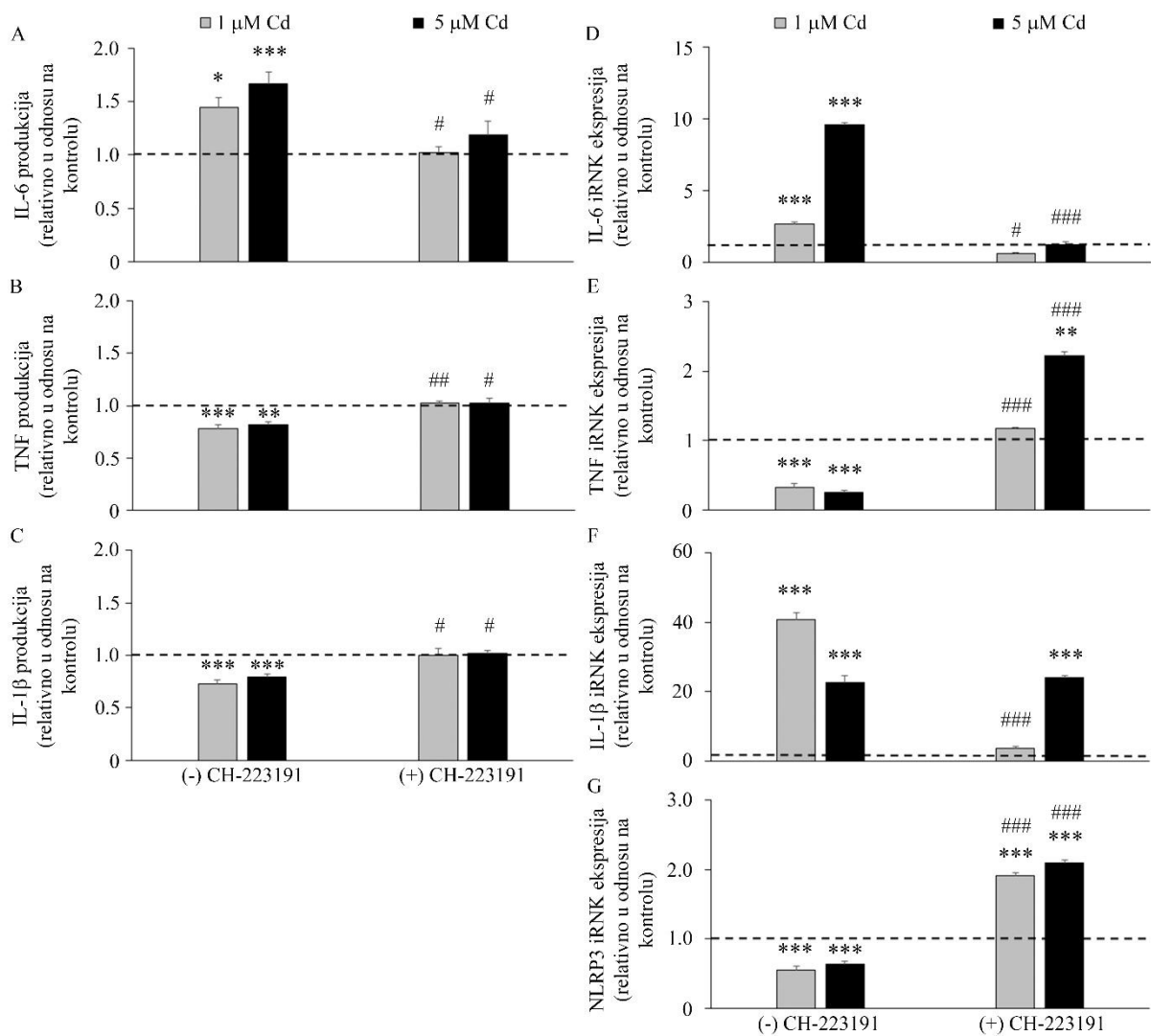
**Grafik 17. Nivo iRNK za (A) CYP1A1 i (B) CYP1B1 u leukocitima pluća tretiranim kadmijumom u prisustvu antagonista AhR.** Linije predstavljaju nivo iRNK određen u odsustvu antagonista. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05, \*\*\*P < 0,001 vs. Cd 0  $\mu\text{M}$ , #P < 0,05, ###P < 0,001 (+) CH-223191 vs. (-) CH-223191.

#### 4.2.3. Uloga AhR u produkciji citokina u leukocitima pluća u odgovoru na kadmijum

Ispitivanje efekta kadmijuma na inflamatorne citokine preko AhR, izvršeno je merenjem nivoa produkcije citokina i nivoa iRNK za IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF u kulturi ćelija tretiranoj samo sa kadmijumom, kao i u prisustvu antagonista CH-223191 (Grafik 18). Leukociti izolovani iz pluća su odgovorili na prisustvo kadmijuma povećanjem produkcije citokina i nivoa iRNK za IL-6 (Grafik 18A, D), a smanjenjem produkcije TNF i nivoa iRNK za TNF (Grafik 18B, E). U odgovoru na kadmijum u kulturi zabeleženo je smanjenje produkcije citokina IL-1 $\beta$  (Grafik 18C), dok se nivo njegove iRNK povećao nakon stimulacije kadmijumom (Grafik 18F). CH-223191 je poništio efekat kadmijuma i vratio produkciju citokina na nivoe zapažene u kulturi ćelija netretiranih kadmijumom (izuzev za TNF i IL-1 $\beta$  kod ćelija tretiranih sa 5  $\mu\text{M}$  kadmijuma gde je uočen viši nivo iRNK).

Kako bi se ustanovilo da li aktivacija AhR dovodi do smanjenja produkcije citokina IL-1 $\beta$  smanjenjem nivoa iRNK za NLRP3 komponentu inflamazoma, određen je nivo iRNK za NLRP3 u ćelijama tretiranim kadmijumom (Grafik 18G). Sam kadmijum doveo je do smanjenja nivoa iRNK za NLRP3, dok je u prisustvu antagonista AhR nivo iRNK za NLRP3 povećan u poređenju sa kontrolom.





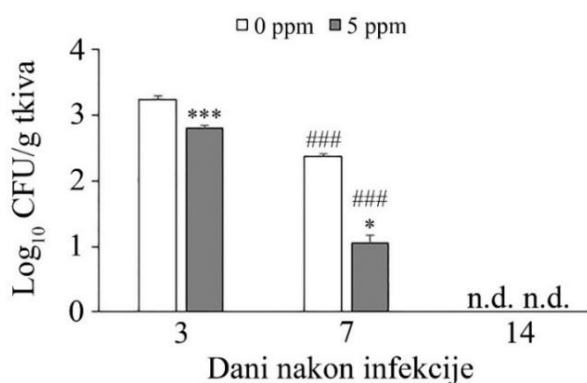
**Grafik 18. Produkcija citokina i nivo iRNK za citokine od strane leukocita pluća izolovanih iz zdravih netretiranih životinja nakon *in vitro* izlaganja kadmijumu (1 i 5 μM) u odsustvu ili prisustvu CH-223191.** (A) Produkcija citokina i (D) nivo iRNK za IL-6. (B) Produkcija citokina i (E) nivo iRNK za TNF. (C) Produkcija citokina i (F) nivo iRNK za IL-1β. (G) Nivo iRNK za NLRP3. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu (vrednost 1, predstavljena kao isprekidana linija na graficima) i predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 vs. kontrola (Cd 0 μM), #P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001 za (+) CH-223191 vs. (-) CH-223191.

### 4.3. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na pluća u patofiziološkim uslovima tokom infekcije izazvane oportunističkom gljivom *A. fumigatus*

Da bismo ispitali da li kadmijum koji u organizam dospeva oralnim putem utiče na reaktivnost pluća u patofiziološkim uslovima infekcije, jedinkama koje su pile destilovanu vodu i jedinkama koje su pile rastvor kadmijum-hlorida u koncentraciji od 5 ppm, tokom 30 dana, je intratrahealno ubrizgan fiziološki rastvor u kome se nalazilo  $10^7$  konidija *A. fumigatus*. Kontrolnim životinjama je ubrizgana ista zapremina fiziološkog rastvora ali bez konidija *A. fumigatus*. Karakteristike odgovora na gljivu su ispitivane 3. i 7. dana nakon infekcije.

#### 4.3.1. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na eliminaciju gljive *A. fumigatus* iz pluća

Ispitivanje stepena infekcije (određen brojanjem formiranih kolonija) u plućima je pokazalo progresivno smanjenje broja kolonija u plućima kako kod jedinki koje nisu bile izložene kadmijumu, tako i kod životinja koje su pile kadmijum (Grafik 19), ali efikasnije kod životinja koje su prethodno bile izložene kadmijumu (smanjenje CFU od 71,7 i 59,6% u poređenju sa životinjama koje nisu bile izložene ovom metalu 3. i 7. dana). Ni u jednoj grupi 14 dana nakon infekcije gljiva nije mogla da se detektuje u plućima.



**Grafik 19. Eliminacija gljive iz pluća životinja neizloženih i izloženih kadmijumu.** Rezultati su izraženi kao broj kolonija po gramu tkiva i predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za osam životinja po grupi. Statistički značajne razlike: \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$  za Cd 5 ppm vs. Cd 0 ppm; ### $P < 0,001$  vs. dan 3 n.i.

#### 4.3.2. Direktan efekat kadmijuma na gljivu *A. fumigatus*

Imajući na umu podatke da sam kadmijum može da suprimira stopu rasta *A. fumigatus*, određen je direktan efekat kadmijuma na klijanje konidija gljive i na vijabilnost hifa (merena MTT testom) *A. fumigatus*. Za ispitivanje je korišćena tečna podloga za gajenje gljive obogaćena sa  $10 \mu\text{g/l}$  kadmijuma (koncentracija koja je bliska koncentraciji zabeleženoj u plućima životinja izloženih 5 ppm kadmijuma, tj.  $7,9 \pm 0,1 \mu\text{g/kg}$  tkiva) i medijum obogaćen homogenatom tkiva pluća životinja neizloženih ili izloženih 5 ppm kadmijuma. Kadmijum ne ispoljava efekat na klijanje konidija, ali je niža vijabilnost hifa zabeležena u prisustvu kadmijuma, kao i u prisustvu homogenata pluća iz životinja izloženih metalu (Tabela 4).

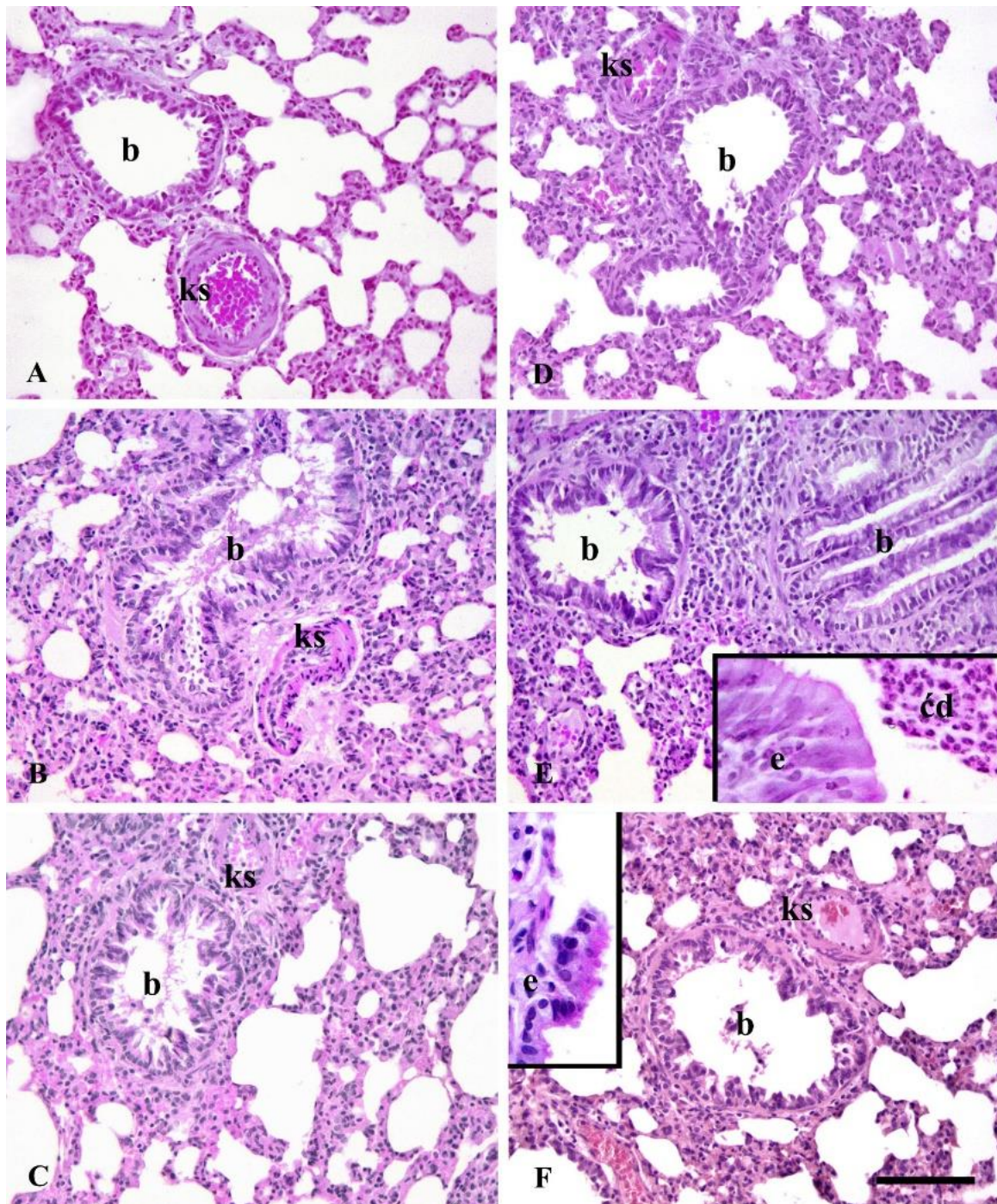
**Tabela 4. Klijanje konidija i vijabilnost hifa *A. fumigatus* (merena MTT testom) izloženih 10 µg/l kadmijuma na čistoj podlozi i podlozi obogaćenoj sa homogenatom tkiva pluća životinja neizloženih i izloženih kadmijumu (5 ppm).**

	<b>Klijanje konidija (%)</b>	<b>Vijabilnost hifa (A540nm); redukcija vijabilnosti hifa</b>
<b>Podloga sa Cd 0 µg/l</b>	4,2 ± 0,6	0,135 ± 0,004
<b>Podloga sa Cd 10 µg/l</b>	2,7 ± 0,6	0,104 ± 0,005; 33,4%, ***
<b>Podloga sa homogenatom tkiva pluća, Cd 0 ppm</b>	13,7 ± 1,6	0,086 ± 0,002
<b>Podloga sa homogenatom tkiva pluća, Cd 5 ppm</b>	12,3 ± 1,2	0,073 ± 0,001; 12,6%, ***

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM. Statistički značajne razlike: \*\*\*P < 0,001 Cd 10 µg/l (5 ppm) vs. Cd 0 µg/l (0 ppm)

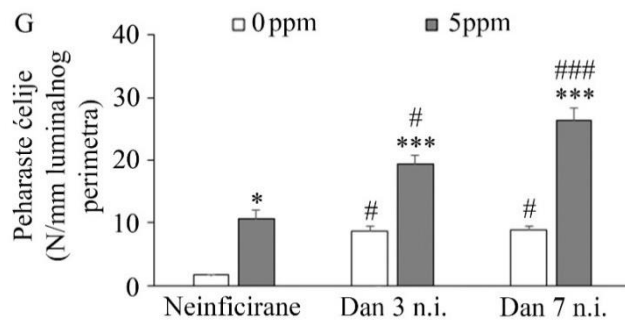
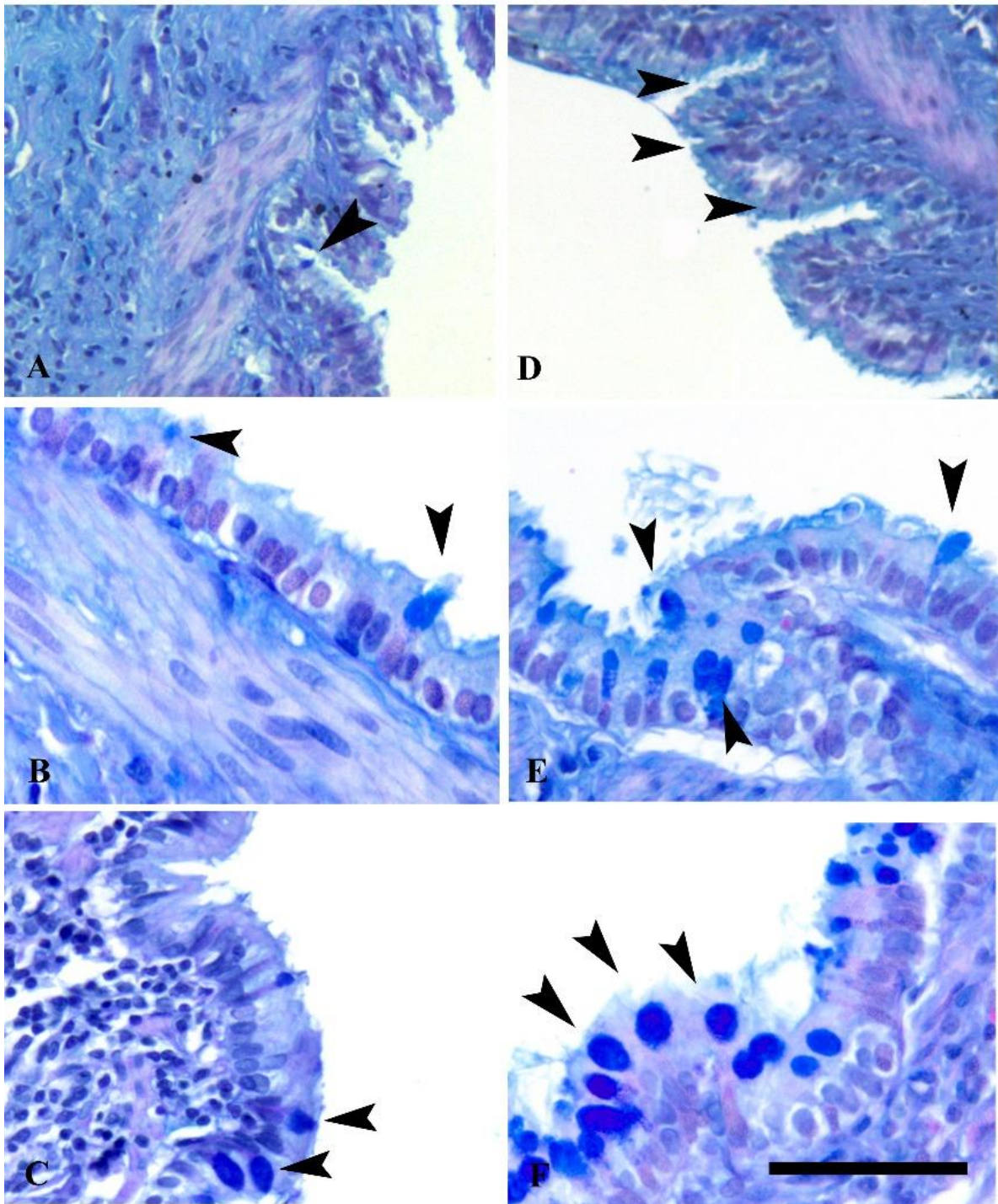
#### **4.3.3. Histološka analiza pluća inficiranih jedinki nakon produženog oralnog unosa kadmijuma**

Histološka analiza preseka tkiva pluća bojenih H&E pokazala je povećanu infiltraciju leukocita kod inficiranih jedinki (bez obzira na tretman kadmijumom) (Slika 10B, C, E, F) u poređenju sa neinficiranim (Slika 10A, D). U oba termina nakon infekcije zapažena je peribronhijalna, perivaskularna i intersticijalna inflamacija, s tim da je trećeg dana (Slika 29B, E) izraženija peribronhijalna, a sedmog (Slika 10C, F) perivaskularna infiltracija. U lumenu respiratornih vazdušnih puteva svih inficiranih životinja je primećen mukus pomešan sa ostacima inflamatornih ili epitelnih ćelija (Slika 10E, insert). Kod jedinki izloženih kadmijumu sedmog dana nakon infekcije zapaženi su prekidi i gubitak epitela u disajnim putevima (Slika 10F, insert).



**Slika 10.** Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na histologiju pluća tokom infekcije sa *A. fumigatus*. Histologija pluća neinficiranih životinja, neizloženih (A) i izloženih kadmijumu (D). Histologija pluća inficiranih životinja neizloženih kadmijumu 3. (B) i 7. (C) dana n.i. i histologija pluća inficiranih životinja izloženih kadmijumu 3. (E) i 7. (F) dana n.i. Čelijski debris u lumenu vazdušnog puta (insert na E) i prekid epitela koji oblaže vazdušni put (insert na F). b - bronhiola; ks - krvni sud; cd - čelijski debris u lumenu vazdušnog puta; e - respiratorni epitel. Bar = 100  $\mu$ m, izuzev za inserte gde je bar = 50  $\mu$ m.

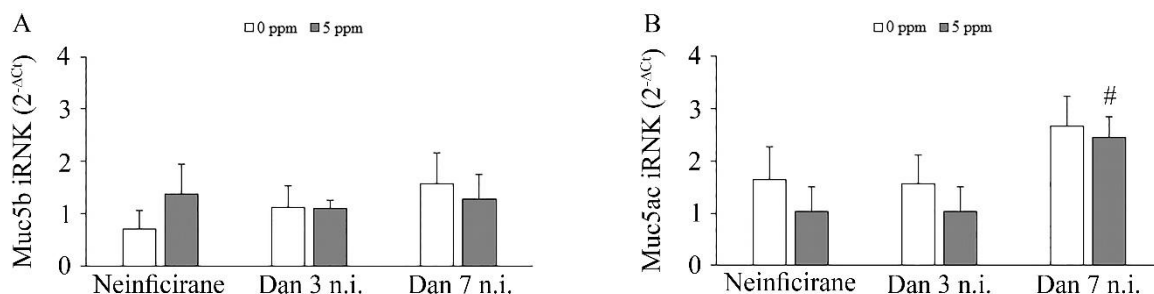
Određivanje broja peharastih ćelija u plućima je pokazalo povećanje broja peharastih ćelija kod životinja izloženih kadmijumu (Slika 11D) i tokom same infekcije gljivom *A. fumigatus* (Slika 11B, C), ali je njihov broj bio značajno veći kod inficiranih jedinki koje su unosile kadmijum (Slika 11E, F).



Slika 11. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na broj peharastih ćelija u respiratornom epitelu unutarplućnih vazdušnih puteva tokom infekcije gljivom *A. fumigatus*, procenjen na osnovu AB-PAS bojenja. Neinficirane životinje, neizložene (A) i izložene kadmijumu (D), inficirane životinje neizložene kadmijumu 3. (B) i 7. (C) i (E) i (F).

(C) dana n.i. i inficirane životinje izložene kadmijumu. 3. (E) i 7. (F) dana n.i. Strelice - peharaste ćelije. Bar = 100  $\mu\text{m}$  za A i D, 50  $\mu\text{m}$  za B, C, E i F. Rezultati kvantitativne analize (G) su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za osam životinja po grupi. Statistički značajne razlike: \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$  Cd 5 ppm vs. Cd 0 ppm; # $P < 0,05$ , ### $P < 0,001$  inficirane vs. odgovarajuće neinficirane životinje.

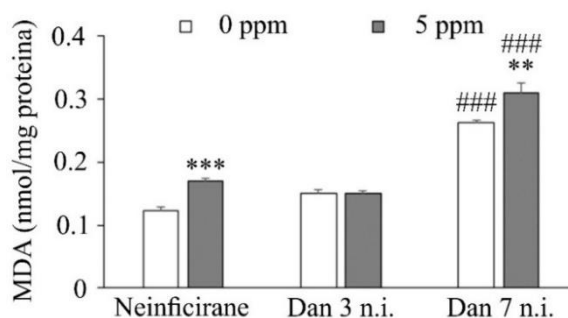
Bez obzira na povećanje broja peharastih ćelija u tkivu, nisu zapažene statistički značajne razlike u nivou iRNK za Muc5b ni Muc5ac, osim za Muc5ac 7. dana n.i. kod inficiranih jedinki koje su pile kadmijum u odnosu na odgovarajuće neinficirane životinje (Grafik 20).



**Grafik 20.** Nivo iRNK za mucine Muc5b (A) i Muc5ac (B) u tkivu pluća pacova nakon infekcije gljivom *A. fumigatus*. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za osam životinja po grupi. Statistički značajne razlike: # $P < 0,05$  inficirane vs. odgovarajuće neinficirane životinje.

#### 4.3.4. Oštećenje tkiva pluća nakon infekcije gljivom *A. fumigatus*

Ispitivanje oksidativnog oštećenja tkiva je pokazalo da iako kadmijum i *A. fumigatus* (statistički značajno 7. dana n.i.) *per se* mogu uzrokovati povećanje nivoa MDA u tkivu, 7. dana n.i. najviši nivo MDA zabeležen je kod inficiranih životinja koje su bile izložene kadmijumu (Grafik 21).

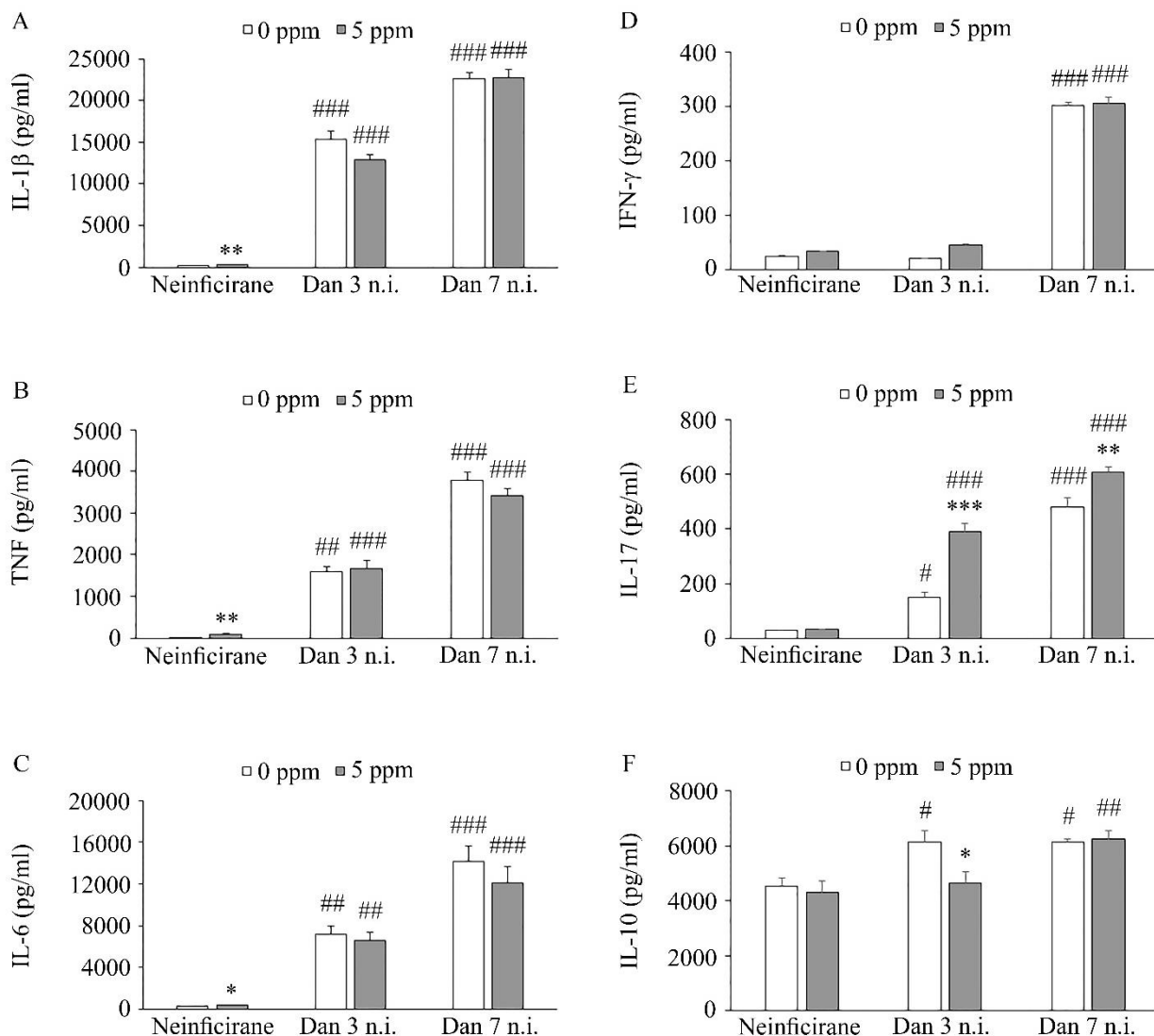


**Grafik 21.** Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na nivo MDA u tkivu pluća tokom infekcije gljivom *A. fumigatus*. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za osam životinja po grupi. Statistički značajne razlike: \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , za Cd 5 ppm vs. Cd 0 ppm; ### $P < 0,001$  za inficirane vs. odgovarajuće neinficirane životinje.

#### 4.3.5. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na odgovor pluća tokom infekcije izazvane gljivom *A. fumigatus*

Povećana produkcija IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 i IL-17 je zapažena u plućima tokom infekcije (u oba ispitivana termina) i kod jedinki koje nisu bile izložene kadmijumu i onih koje su pile kadmijum (Grafik 22) bez značajnih razlika u nivou citokina između ove dve grupe, osim za IL-17, gde je veća produkcija zabeležena kod pacova inficiranih i izloženih kadmijumu (Grafik 22E). Produkcija citokina IFN- $\gamma$  je bila povišena samo 7. dana nakon infekcije kod obe grupe pacova (Grafik 22D). Povećanje produkcije anti-inflamatornog citokina IL-10 je takođe zapaženo tokom infekcije, osim 3.

dana kod inficiranih pacova izloženih kadmijumu, kada je uočena niža produkcija u odnosu na životinje neizložene kadmijumu (Grafik 22F).



**Grafik 22. Nivo citokina u tkivu pluća nakon infekcije gljivom *A. fumigatus*.** (A) IL-1 $\beta$ . (B) TNF. (C) IL-6. (D) IFN- $\gamma$ . (E) IL-17. (F) IL-10. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za osam životinja po grupi. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001, Cd 5 ppm vs. Cd 0 ppm; #P < 0,05, ##P < 0,01, ####P < 0,001 inficirane vs. odgovarajuće neinficirane životinje.

#### 4.3.6. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na odgovor leukocita pluća na prisustvo gljive *A. fumigatus*

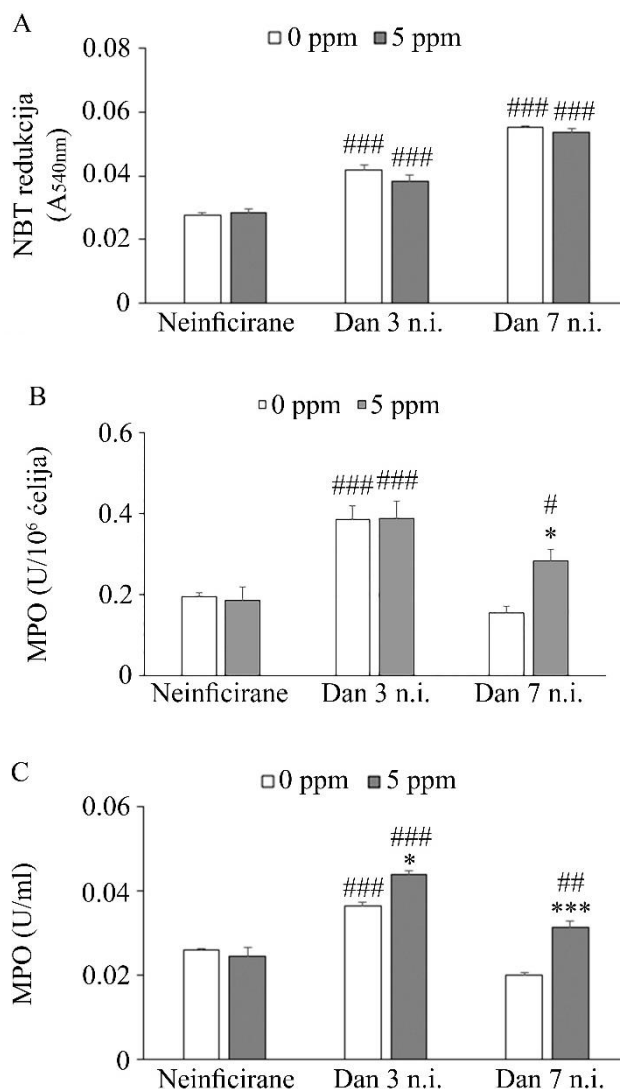
Aktivnost leukocita pluća, glavnih lokalnih efektorskih ćelija urođenog imunskog odgovora u plućima na infekciju gljivom, je sledeća ispitana. Infekcija gljivom je dovela do porasta leukocita u plućima životinja, dok kadmijum nije uticao na njihov broj (Tabela 5).

Tabela 5. Prinos i sastav leukocita u tkivu pluća tokom infekcije gljivom *A. fumigatus*.

	Neinficirane		Dan 3 n.i.		Dan 7 n.i.	
	0 mg Cd/l	5 mg Cd/l	0 mg Cd/l	5 mg Cd/l	0 mg Cd/l	5 mg Cd/l
Leukociti pluća (x10 <sup>6</sup> /g tkiva)						
Ukupno	24,0 ± 0,5	25,1 ± 0,6	36,6 ± 1,9 <sup>###</sup>	34,9 ± 1,3 <sup>###</sup>	31,2 ± 1,4 <sup>###</sup>	27,8 ± 1,7 <sup>#</sup>
Limfociti	21,0 ± 0,5	22,0 ± 0,5	32,0 ± 1,7 <sup>###</sup>	30,4 ± 1,1 <sup>###</sup>	26,1 ± 1,3 <sup>#</sup>	22,9 ± 1,4
Makrofagi	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,1	3,2 ± 0,3	3,4 ± 0,3	4,2 ± 0,2 <sup>###</sup>	4,1 ± 0,3 <sup>###</sup>
Neutrofili	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,03 <sup>###</sup>	1,1 ± 0,02 <sup>#</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>#</sup>	0,8 ± 0,1

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM za osam životinja po grupi. Značajnost: <sup>#</sup>P < 0,05, <sup>###</sup>P < 0,001 inficirane vs. neinficirane životinje.

Ispitivanje aktivnosti ćelija pluća je pokazalo da dolazi do povećanja produkcije ROK (mereno na osnovu NBT redukcije) tokom infekcije kod obe grupe pacova (Grafik 23A). Infekcija gljivom dovodi do povećanog (u poređenju sa neinficiranim jedinkama) oslobađanja MPO od strane ćelija izolovanih iz pluća (Grafik 23B) kao i povećane aktivnosti unutarćelijske MPO (Grafik 23C) (kod jedinki koje nisu bile izložene kadmijumu samo trećeg dana, a kod jedinki koje su pile kadmijum i 3. i 7. dana n.i.) pri čemu je veća aktivnost zapažena kod jedinki koje su pre infekcije bile izložene teškom metalu.

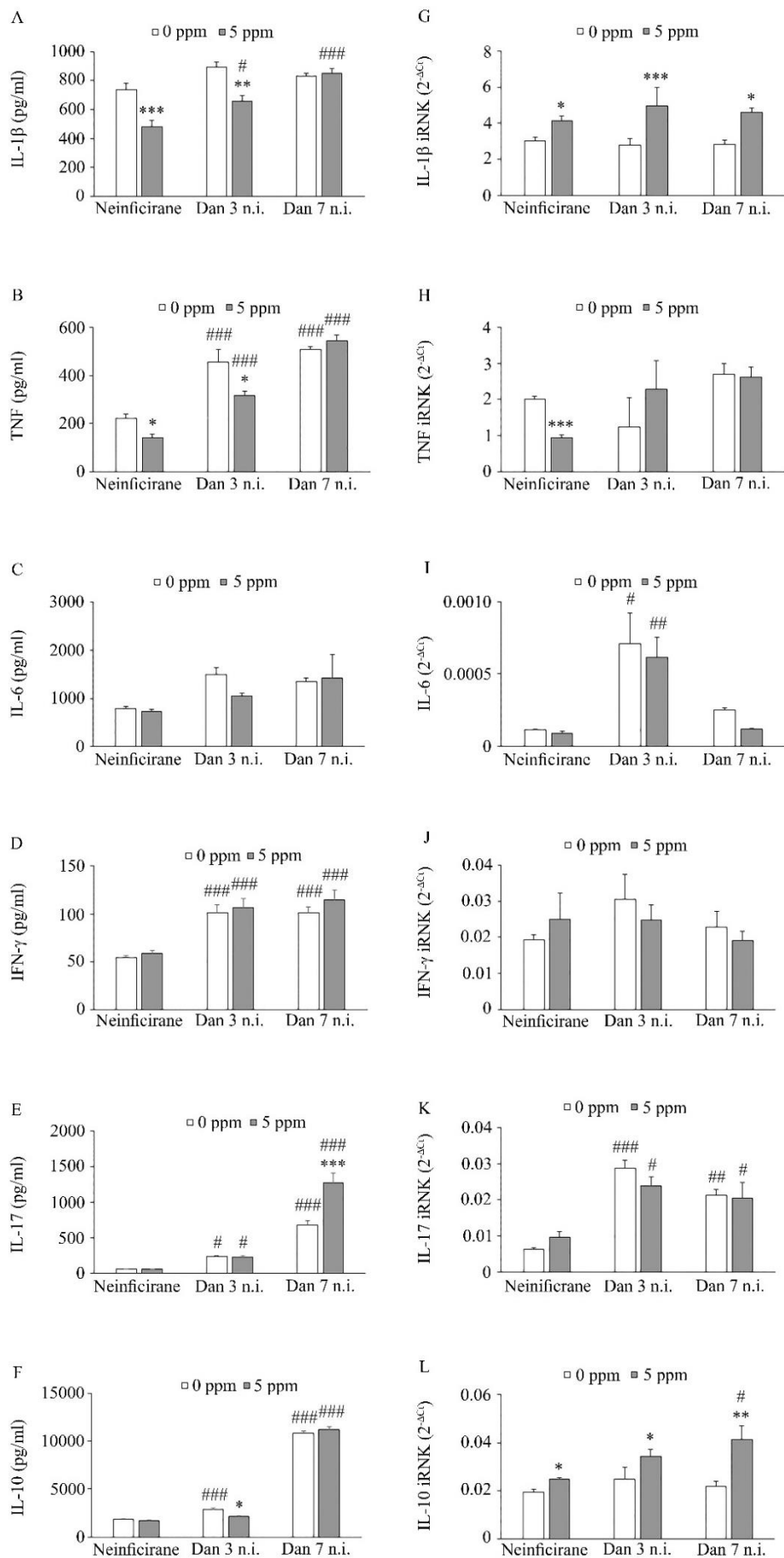


Grafik 23. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na aktivnosti leukocita izolovanih iz pluća relevantne za uklanjanje gljive. (A) NBT redukcija. (B) Nivo MPO u ćelijama. (C) Produkovana MPO. Rezultati su predstavljani



kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za osam životinja po grupi. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05, \*\*\*P < 0,001, Cd 5 ppm vs. Cd 0 ppm; #P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001 inficirane vs. odgovarajuće neinficirane životinje.

Kod inficiranih jedinki koje nisu bile izložene kadmijumu ne zapažaju se promene ni na nivou produkcije citokina ni na nivou iRNK za IL-1 $\beta$  (Grafik 24A, G), dok je kod inficiranih jedinki koje su bile izložene metalu zapažen porast (u odnosu na neinficirane jedinke) u produkciji IL-1 $\beta$  u oba ispitivana termina nakon infekcije. Niža produkcija citokina (kod neinficiranih jedinki i 3. dana nakon infekcije) a viši nivo iRNK su detektovani kod jedinki koje su pile kadmijum u poređenju sa jedinkama koje nisu pile kadmijum. Nakon infekcije gljivom dolazi do povećanja samo produkcije TNF (nisu uočene promene na nivou iRNK) (Grafik 24B, H) i kod jedinki koje nisu pile i kod onih koje su pile kadmijum, pri čemu je niža produkcija zabeležena kod jedinki koje su pile kadmijum (neinficirane i 3. dana nakon infekcije). Određivanje produkcije citokina i nivoa iRNK za IL-6 (Grafik 24C, I) je pokazalo da generalno ne postoje promene u IL-6 odgovoru (izuzev povećanja nivoa iRNK 3. dana nakon infekcije), kao i da kadmijum nema efekta na produkciju ovog citokina tokom infekcije. Povećana produkcija citokina IFN- $\gamma$  (Grafik 24D), IL-17 (Grafik 24E) i IL-10 (Grafik 24F) se zapaža tokom infekcije kod obe grupe jedinki (i onih koje nisu pile i onih koje su pile kadmijum) pri čemu je kod jedinki koje su pile kadmijum detektovan viši nivo IL-17 (7. dana nakon infekcije) a niži IL-10 (3. dana nakon infekcije). Na nivou iRNK nisu primećene statistički značajne promene u IFN- $\gamma$  (Grafik 24J), dok je nivo iRNK za IL-17 povećan tokom infekcije (bez obzira na tretman kadmijumom) (Grafik 24K), a za IL-10 samo kod jedinki koje su pile kadmijum 7. dana nakon infekcije (pri čemu su primećeni generalno viši nivoi iRNK za IL-10 kod jedinki koje su pile kadmijum u odnosu na jedinke koje nisu (Grafik 24L).

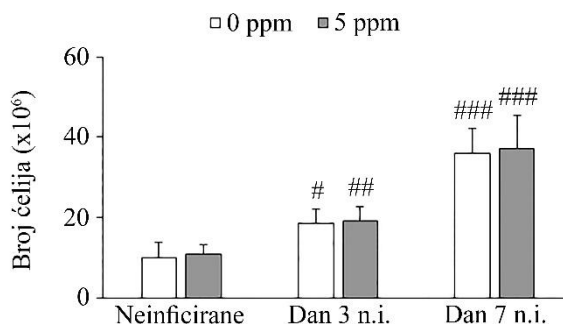


**Grafik 24. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na produkciju citokina i nivo iRNK za citokine od strane leukocita izolovanih iz pluća tokom infekcije gljivom *A. fumigatus*. Produkcija citokina IL-1 $\beta$  (A) i nivo iRNK za IL-**

1 $\beta$  (G). Produkcija citokina TNF (B) i nivo iRNK za TNF (H). Produkcija citokina IL-6 (C) i nivo iRNK za IL-6 (I). Produkcija citokina IFN- $\gamma$  (D) i nivo iRNK za IFN- $\gamma$  (J). Produkcija citokina IL-17 (E) i nivo iRNK za IL-17 (K). Produkcija citokina IL-10 (F) i nivo iRNK za IL-10 (L). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za osam životinja po grupi. Statistički značajne razlike: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001, Cd 5 ppm vs. Cd 0 ppm; #P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001 inficirane vs. odgovarajuće neinficirane životinje.

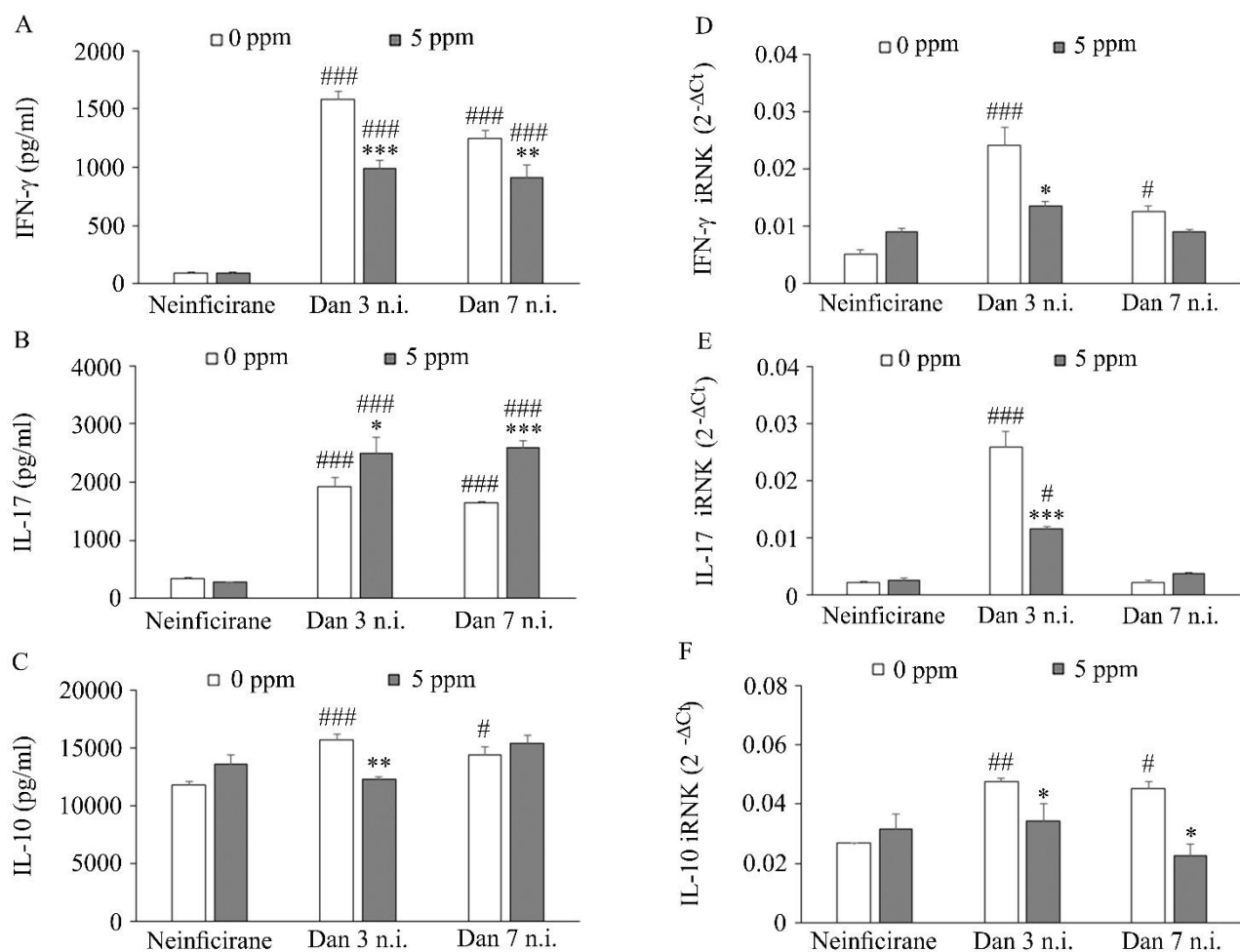
#### 4.3.7. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na odgovor limfnih čvorova medijastinuma na prisustvo gljive *A. fumigatus*

Povećanje broja ćelija u limfnim čvorovima medijastinuma je zabeleženo tokom infekcije, ali bez razlika između inficiranih i životinja inficiranih i izloženih kadmijumu (Grafik 25).



**Grafik 25. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na celularnost limfnih čvorova medijastinuma tokom infekcije gljivom *A. fumigatus*.** Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za osam životinja po grupi. Statistički značajne razlike: #P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001 inficirane vs. odgovarajuće neinficirane životinje.

Infekcija gljivom je dovela do povećanja produkcije citokina i nivoa iRNK od strane limfocita limfnih čvorova medijastinuma za IFN- $\gamma$  (Grafik 26A, D) i IL-17 (Grafik 26B, E) pri čemu je kod jedinki koje su pre infekcije pile kadmijum produkcija citokina IFN- $\gamma$  i nivo iRNK za oba proinflamatorna citokina bili niži, dok je produkcija IL-17 bila viša. Povećana i produkcija citokina i nivo iRNK za IL-10 (Grafik 26C, F) su zapaženi samo u odgovoru na infekciju jedinki koje nisu bile izložene kadmijumu što je rezultiralo nižom produkcijom IL-10 3. dana i nižim nivoom iRNK za ovaj citokin u oba ispitivana termina kod inficiranih pacova izloženim kadmijumu (u poređenju sa inficiranim jedinkama koje nisu pile kadmijum).



**Grafik 26. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na produkciju citokina i nivo iRNAK za citokine od strane limfnih čvorova medijastinuma tokom infekcije gljivom *A. fumigatus*.** Produkcija citokina IFN- $\gamma$  (A) i nivo iRNAK za IFN- $\gamma$  (D). Produkcija citokina IL-17 (B) i nivo iRNAK IL-17 (E). Produkcija citokina IL-10 (C) i nivo iRNAK za IL-10 (F). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  SEM za osam životinja po grupi. Statistički značajne razlike: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  Cd 5 ppm vs. Cd 0 ppm; # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  inficirane vs. odgovarajuće neinficirane životinje.

## **5. DISKUSIJA**

U doktorskoj disertaciji prikazani su rezultati dobijeni ispitivanjem efekta produžene (30 dana) oralne primene dve sredinski relevantne neletalne doze kadmijum-hlorida (5 i 50 ppm) na imunski odgovor u plućima pacova i regionalnim drenirajućim limfnim čvorovima medijastinuma, u fiziološkim i patofiziološkim uslovima infekcije izazvane gljivom *Aspergillus fumigatus*.

Kadmijum je jedan od najtoksičnijih metala prisutnih u životnoj sredini, a glavni put njegovog unosa kod opšte populacije je oralni, tj. preko zagađene hrane (Klaassen i drugi, 2009; Olsson i drugi, 2002). Brojna istraživanja produženog oralnog izlaganja kadmijumu su pokazala da on predstavlja veliku opasnost po zdravlje ljudi, jer su njegovi toksični efekti zapaženi u mnogim organskim sistemima (Friberg i drugi, 1986; Hiratsuka i drugi, 1999; Jonah i Bhattacharyya, 1989; Müller i drugi, 1986; Saygi i drugi, 1991; Sugawara i Sugawara, 1974). Za ovo istraživanje su odabrane doze koje odgovaraju koncentraciji kadmijuma iz životne sredine kojima ljudi mogu biti izloženi (Blanusa i drugi, 2002; Damek-Poprawa i Sawicka-Kapusta, 2004; Lukačínová i drugi, 2011). Niža doza odgovara koncentraciji kadmijuma koju su unosile žene kontaminiranom hranom, a koje su obolele od itai-itai bolesti (Bhattacharyya i drugi, 1988), a viša doza, koncentraciji kadmijuma prisutnoj u visoko zagađenim sredinama ili okruženjima gde su ljudi profesionalno izloženi kadmijumu (Wang i drugi, 2003). Iako su povećani nivoi kadmijuma zabeleženi u plućima glodara izloženih kadmijumu oralnim putem (Chandler i drugi, 2016; Jorge-Nebert i drugi, 2015; Lehman i Klaassen, 1986; Lei i drugi, 2015; Winiarska-Mieczan, 2014), efekti ovako unetog kadmijuma na imunski odgovor u plućima nisu ispitivani.

Eksperimenti su vršeni na mužjacima DA soja pacova, za koje je ranije bilo pokazano da su osetljiviji na imunomodulatorno dejstvo kadmijuma (Ninkov i drugi, 2016; Stosic i drugi, 2010). Pored osnovnih parametara toksičnosti (koncentracija kadmijuma deponovana u tkivima, telesna masa životinja i histološka analiza tkiva pluća) ispitani su i mehanizmi toksičnog dejstva kadmijuma - nivo oksidativnog stresa i inflamacija u tkivu pluća. Ispitan je i efekat kadmijuma na aktivnost leukocita izolovanih iz pluća i regionalnih limfnih čvorova koji dreniraju ovo tkivo (limfni čvorovi medijastinuma). Pored indukcije oksidativnog stresa i inflamacije, noviji literaturni podaci ukazuju da kadmijum može da dovede do aktivacije AhR (Tucović i drugi, 2020), receptora čija aktivacija dovodi do povećanja ekspresije gena za enzime uključene u metabolizam ksenobiotika, ali ispoljava efekat (kako stimulatorni tako i supresivni) i na ćelije imunskog sistema (Kimura i drugi, 2009; Li i drugi, 2019; Sekine i drugi, 2009). S obzirom na relativno visoku ekspresiju gena za AhR u tkivu pluća (Dolwick i drugi, 1993), ispitana je uloga ovog receptora u imunotoksičnosti kadmijuma. Potencijalna uključenost AhR u imunomodulatorne efekte kadmijuma ispitana je u leukocitima pluća izolovanih iz pacova izloženih oralnom tretmanu kadmijumom merenjem nivoa iRNK za ovaj receptor, kao i iRNK za enzime čija je ekspresija regulisana ovim receptorom. Uloga AhR u imunotoksičnosti izazvanoj kadmijumom je potvrđena u kulturi leukocita izolovanih iz pluća zdravih netretiranih jedinki. Efekat produžene oralne primene kadmijum-hlorida, kojem može biti izložena opšta populacija u zagađenoj sredini (5 ppm), ispitana je u plućima i limfnim čvorovima medijastinuma mužjaka DA pacova i u patofiziološkim uslovima infekcije izazvane oportunističkom gljivom *A. fumigatus*, čije su spore rasprostranjene širom sveta (Chang i drugi, 2004). Ispitan je efekat oralno unetog kadmijuma na eliminaciju gljive iz pluća i na aktivnost leukocita izolovanih iz pluća i limfnih čvorova medijastinuma za koje se na osnovu ranijih istraživanja zna da doprinose efikasnom uklanjanju gljive iz pluća imunokompetentnih jedinki (El-Muzghi i drugi, 2013; Mirkov i drugi, 2014, 2015).

### **5.1. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na pluća u fiziološkim uslovima meren promenama u ćelijskim i molekulskim mehanizmima imunskog odgovora**

Doze kadmijuma koje su korišćene u eksperimentima ne utiču na unos hrane i prinos telesne mase tokom eksperimentalnog perioda, kao osnovnih parametara toksičnog efekta ispitivane supstance (Ajani i drugi, 1990; OECD, 2018). Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim

istraživanjima u kojima su pacovi bili izloženi istom tretmanu kadmijumom (Ninkov i drugi, 2015; Tucovic i drugi, 2018).

Produženi oralni unos kadmijuma dovodi do dozno-zavisnog deponovanja ovog metala u organima, pri čemu su najveće koncentracije kadmijuma izmerene u bubrezima i jetri, ali se metal deponuje i u plućima. Istraživanja su pokazala da su bubreg i jetra ciljna mesta akumulacije kadmijuma u organizmu (Mezynska i Brzóška, 2018; Prankel i drugi, 2005; Satarug i drugi, 2010), kao i da se ovaj metal deponuje i u plućima (Jorge-Nebert i drugi, 2015; Lehman i Klaassen, 1986; Winiarska-Mieczan, 2014). Povećano deponovanje kadmijuma u plućima je verovatno dovelo do povećanja ekspresije gena za MT-1 i MT-2 kod jedinki koje su pile kadmijum u eksperimentu izvođenom u okviru ove doktorske disertacije, jer je poznato da se ovi molekuli sintetišu u odgovoru na prisustvo metala u tkivu, a u cilju detoksikacije jona  $Cd^{2+}$  (Hart i drugi, 1985, 1995, 1996).

Iako produženi oralni unos kadmijuma nije doveo do povećanja relativne mase pluća (što bi ukazalo na intenzivnu inflamaciju u tkivu), histopatološka analiza tkiva je pokazala da prisustvo kadmijuma u plućima dovodi do pojave edema i povećane infiltracije ćelija. Zapažene promene, kao i intenzivniji perivaskularni edem u poređenju sa peribronhijalnim edemom, sugerišu povećanu vaskularnu permeabilnost nakon oralnog izlaganja kadmijumu. U prilog ovome govori podatak da kadmijum ispoljava uticaj na vaskularni endotel i narušava adherentne veze između endotelskih ćelija (Pearson i drugi, 2003). Ovaj teški metal može da razori čvrste veze i između epitelnih ćelija, kao što je pokazano kod alveolarnih epitelnih ćelija miševa nakon tretmana kadmijumom (Pearson i drugi, 2003). Dozno-zavisna deskvamacija respiratornog epitela koja se zapaža kod jedinki izloženih kadmijumu je verovatno posledica narušavanje čvrstih veza između epitelnih ćelija pod dejstvom ovog metala. Osim edema i infiltracije ćelija u tkivo pluća, kadmijum je doveo i do povećanja broja peharastih ćelija u vazdušnim putevima. Glodari (miševi i pacovi) imaju veoma mali broj peharastih ćelija u plućima i to pretežno u disajnim putevima dijametra većeg od 300  $\mu m$  (Olesen i drugi, 1987), a broj ovih ćelija (kao i njihova pojava u disajnim putevima manjeg dijametra) raste u odgovoru na infekciju i/ili udahnute iritante (Rogers, 1994, 2007; National Toxicology Program). Povećano oslobađanje mukusa kao i njegovo smanjeno uklanjanje, može dovesti do formiranja mukusnih čepova i opstrukcije disajnih puteva, a zapaža se u različitim bolestima pluća i tokom infekcije (Fahy i Dickey, 2010). Glavne komponente ovog vanćelijskog gela su voda i mucini (glikozilovani proteini) od kojih su najzastupljeniji Muc5ac i Muc5b, a čija je produkcija visoko regulisana na nivou transkripcije (Fahy i Dickey, 2010). U našem eksperimentu kadmijum dovodi do povećanja nivoa iRNK za Muc5ac dok je nivo iRNK za Muc5b nepromenjen. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji pokazuju da u odgovoru na različite stimuluse dolazi do povećanja produkcije Muc5ac, dok produkcija Muc5b ostaje na bazalnom nivou (Currier i drugi, 2016; Fu i drugi, 1992; Kirkham i drugi, 2002; Koeppen i drugi, 2013; Ordóñez i drugi, 2001; Young i drugi, 2007). Povećan nivo iRNK za Muc5ac je verovatno posledica inflamacije prisutne u tkivu izazvane kadmijumom, jer je poznato da proinflatorni citokini mogu da dovedu do povećanja ekspresije gena za mucine (Fahy i Dickey, 2010).

Uočeno smanjenje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane SOD i CAT je najverovatnije rezultat njihove povećane potrošnje usled povećane produkcije ROK (marker toksičnog efekta kadmijuma) i pokušaja da se ograniči oštećenje tkiva (Morales i drugi, 2006). Ovaj odgovor, međutim, može biti i rezultat direktnog efekta kadmijuma na enzime antioksidativne zaštite, s obzirom na to da je utvrđeno da ovaj metal može da interaguje sa SOD i CAT (Hussain i drugi, 1987; Wang i drugi, 2015). Viši nivo MDA kod životinja izloženih kadmijumu (u poređenju sa životinjama neizloženim kadmijumu), ukazuje na veće oštećenje tkiva kod ovih životinja. Oštećenje tkiva je moglo nastati usled direktnog efekta kadmijuma na ćelije, npr. oštećenjem epitelnih ćelija (Xiong i drugi, 2019) ili stimulisanjem efektorskih aktivnosti infiltriranih leukocita, neutrofila na prvom mestu (Cohen, 2004; Sherwood i Toliver-Kinsky, 2004), u prilog čemu govori povećanje nivoa MPO koje se uočava u plućima jedinki izloženih kadmijumu.

Povećani nivoi inflamatornih citokina urođene imunosti zabeleženi u homogenatu pluća u skladu su sa rezultatima koji su pokazali da kadmijum nakon oralne administracije dovodi do inflamacije u različitim organima, uključujući creva (Ninkov i drugi, 2015) i jetru (Liu i drugi, 2015).

Povećani nivoi IL-1 $\beta$ , TNF i IL-6 (samo pri nižoj dozi) mogu dovesti do povećane sekrecije Muc5ac čime bi se olakšalo uklanjanje udahnutih ksenobiotika (Fahy i Dickey, 2010), ali mogu dovesti i do indukcije i/ili progresije imunološki relevantnih bolesti pluća. U ovom kontekstu, preterani odgovor vazdušnih puteva je uočen kod miševa izloženih dozi od 10 ppm kadmijuma tokom dužeg perioda (20 nedelja) (Chandler i drugi, 2016). Međutim, niži nivo TNF na 50 ppm u poređenju sa nivoom na 5 ppm, kao i niži nivo IL-6 i IFN- $\gamma$  (u poređenju sa kontrolom i sa 5 ppm) na 50 ppm, ukazuju da viša doza kadmijuma može takođe da ima i inhibitorne efekte na nivo citokina. Inflamatorni odgovor zapažen u plućima jedinki nakon oralnog unosa kadmijuma, verovatno predstavlja rezultat dejstva ovog metala ne samo na leukocite, već i na druge tipove ćelija prisutne u plućima (endotelske i epitelne ćelije). U prilog ovome idu literaturni podaci gde je povećana produkcija citokina od strane bronhijalnih epitelnih ćelija (IL-1 $\beta$ ) (Jeong i drugi, 2017), alveolarnih epitelnih ćelija (IL-1 $\alpha$  i IL-10) (Odeh i drugi, 2015) i vaskularnih endotelskih ćelija (TNF) (Szuster-Ciesielska i drugi, 2000) zabeležena u odgovoru na stimulaciju kadmijumom.

Kadmijum ispoljava diferencijalne efekte (stimulacija, supresija ili izostanak efekta) na aktivnost leukocita izolovanih iz pluća i regionalnih drenirajućih limfnih čvorova. Dok fagocitne ćelije nisu aktivirane nakon oralnog unosa kadmijuma sudeći po nepromenjenoj sposobnosti leukocita pluća da redukuju NBT i proizvode NO, aktivnost enzima MPO u ćelijama (kao i njegovo oslobađanje) je povećana. Diferencijalni efekti se zapažaju i u citokinskom odgovoru (na nivou produkcije i ekspresije gena) što je u saglasnosti sa prethodno publikovanim radovima koji pokazuju ovakav efekat kadmijuma na produkciju citokina od strane primarnih ćelija pluća (fibroblasta i makrofaga) (Lag i drugi, 2010) i leukocita (Hemdan i drugi, 2006; Villanueva i drugi, 2000). U leukocitima izolovanim iz pluća kadmijum dovodi do istovremene supresije IL-1 $\beta$  (na nivou produkcije) i TNF i povećanja IFN- $\gamma$  i IL-10 odgovora (uz nepromenjen IL-6 i IL-17), koji u širem kontekstu mogu biti relevantni za razvoj različitih bolesti pluća i uticati na karakteristike odgovora na dodatnu stimulaciju. Iako su efekti kadmijuma koji se zapažaju na nivou produkcije citokina uglavnom posledica efekta ovog metala na nivou ekspresije gena za ispitivane citokine, uočene su razlike u produkciji (smanjena u odgovoru na prisustvo kadmijuma u organizmu) i ekspresiji gena (povećanje) za IL-1 $\beta$ . Zapaženo neslaganje je posledica efekta kadmijuma na inflamazom (proteinski kompleks koji učestvuje u obradi pro-IL-1 $\beta$  u sekretovanu formu IL-1 $\beta$ ) sudeći po smanjenoj ekspresiji NLRP3 komponente inflamazoma koja je zapažena kod jedinki tretiranih kadmijumom.

## 5.2. Efekat kadmijuma delom je posredovan aktivacijom AhR

Dosadašnja istraživanja su pokazala da kadmijum ispoljava efekte na nekoliko signalnih puteva u ćelijama (Chakraborty i drugi, 2010; Chen i drugi, 2014). Povećana ekspresija AhR uočena u ćelijama pluća nakon oralnog unosa kadmijuma i u kulturi ćelija izloženoj ovom metalu, sugerise da kadmijum ispoljava svoje efekte i preko AhR. Dobijen rezultat je u saglasnosti sa povećanjem nivoa iRNK za AhR koje je zabeleženo u epidermalnim ćelijama pacova nakon oralnog tretmana kadmijumom (Tucovic i drugi, 2020). Povećanje nivoa iRNK za CYP1A1 (*in vitro*) i CYP1B1 (*in vivo* i *in vitro*) ukazuje da pored povećane sinteze AhR, kadmijum verovatno dovodi i do njegove aktivacije i pokretanja transkripcije AhR-regulisanih gena. Povećana ekspresija AhR-regulisanih gena uključujući CYP1A1, NAD(P)H: hinon oksidoreduktazu i glutation S-transferazu Ya zapažena je u odgovoru na ovaj teški metal u humanim i mišjim hepatoma ćelijama (Elbekai i El-Kadi, 2004; Anwar-Mohamed i drugi, 2009; Tully i drugi, 2000) i u jetri glodara izloženih kadmijumu (Wagstaff, 1973). Povećanje nivoa iRNK za CYP1B1 (ali ne i CYP1A1) koje se zapaža kod jedinki oralno izloženih kadmijumu je u skladu sa podacima koji pokazuju povećanje nivoa iRNK za CYP1B1 u epidermalnim ćelijama jedinki izloženih kadmijumu (Tucovic i drugi, 2020). Pored toga, prethodna istraživanja su pokazala veći odgovor CYP1B1 gena na AhR ligande u nekoliko ćelijskih linija (Döhr i drugi, 1995). U kulturi leukocita izolovanih iz pluća kadmijum dovodi do povećanja nivoa iRNK i za CYP1A1 i CYP1B1. U odgovoru na prisustvo AhR antagonista, nivo iRNK za CYP1A1 (na 1  $\mu$ mol/l kadmijuma) i CYP1B1 (na 1 i 5  $\mu$ mol/l kadmijuma) se smanjuje, što ukazuje da je zapaženi



efekat kadmijuma na CYP-ove posredovan AhR-om (makar pri nižim dozama metala). Izostanak efekta antagonista zapažen na dozi od 10  $\mu\text{mol/l}$  kadmijuma sugerije da kadmijum može da dovede do promene ekspresije CYP-ova i preko aktivacije drugih transkripcionih faktora, s obzirom na to da AhR nije jedini faktor koji reguliše ekspresiju CYP-ova (Santes-Palacios i drugi, 2016; Zordoky i El-Kadi, 2009).

Stimulacija leukocita izolovanih iz pluća sa kadmijumom dovela je do povećanja IL-6 (kako na proteinskom, tako i na nivou iRNK), a izostanak odgovora u prisustvu AhR antagonista ukazuje na uključenost AhR u IL-6 odgovor na kadmijum. Podaci o ulozi AhR u IL-6 odgovoru variraju od supresije do stimulacije u zavisnosti od tipa ćelija korišćenih u istraživanjima i/ili korišćenog AhR agonista. Supresija je zapažena u mišjim peritonealnim makrofagima nakon stimulacije sa 2, 3, 7, 8 - tetrahlorodibenzo-p-dioksinom (TCDD) i 6-formilindolo[3,2-b]karbazolom (FICZ) (Huai i drugi, 2014), kao i u liniji stromalnih ćelija kostne srži u odgovoru na TCDD (Jensen i drugi, 2003), dok je stimulacija uočena kod HaCaT ćelija u odgovoru na FICZ (Tanaka i drugi, 2018) i u humanim i u mišjim mastocitima (Sibilano i drugi, 2012).

Stimulacija leukocita izolovanih iz pluća sa kadmijumom dovela je do smanjenog TNF odgovora (na nivou proteina i iRNK), dok su i nivo proteina i iRNK za TNF dostigli nivoe slične kontrolnim (osim za 5  $\mu\text{mol/l}$  kadmijuma) (ćelije neizložene kadmijumu) u prisustvu antagonista, ukazujući na ulogu AhR u odgovoru TNF na kadmijum. Literaturni podaci o ulozi AhR u TNF odgovoru su kontradiktorni. Pokazano je da aktivacija AhR sa TCDD i FICZ suprimira TNF u mišjim peritonealnim makrofagima (Huai i drugi, 2014), dok efekat FICZ nije zabeležen na citokinski odgovor u HaCaT ćelijama (Tanaka i drugi, 2018). Nasuprot tome, povećanje TNF je uočeno u odgovoru na TCDD u diferenciranim THP-1 ćelijama (Cheon i drugi, 2007) i u plućima C57BL miševa (Wong i drugi, 2010). Povećan nivo iRNK za TNF u odgovoru na 5  $\mu\text{mol/l}$  kadmijuma u prisustvu AhR antagonista, ukazuje da više doze kadmijuma utiču na transkripciju iRNK dodatnim mehanizmima, ali odsustvo promena na proteinskom nivou ukazuje na ulogu AhR u posttranskripcionoj obradi iRNK za TNF ili stabilnosti same iRNK.

Efekat antagonista na produkciju IL-1 $\beta$  ukazuje na uključenost AhR i u odgovor ovog citokina na kadmijum. Smanjena produkcija IL-1 $\beta$  usled aktivacije AhR pokazana je u mišjim peritonealnim makrofagima nakon stimulacije sa TCDD i FICZ (Huai i drugi, 2014). U saglasnosti sa tim istraživanjem, naši podaci pokazuju da smanjena produkcija IL-1 $\beta$  nije posledica smanjenog nivoa iRNK za IL-1 $\beta$ , jer su viši nivoi zapaženi u ćelijama tretiranim kadmijumom u poređenju sa kontrolom. Uključenost aktivacije AhR u stimulaciju transkripcije IL-1 $\beta$  je pokazana i kod HaCaT ćelija tretiranim sa FICZ (Tanaka i drugi, 2018), iako ovi autori nisu uočili promene u produkciji citokina. Nepromenjen nivo iRNK za IL-1 $\beta$  u ćelijama tretiranim sa niskom dozom kadmijuma i AhR antagonistom, u poređenju sa ćelijama koje nisu izložene kadmijumu, nasuprot povećanom nivou iRNK zapaženom u ćelijama tretiranim samo sa kadmijumom, ukazuje na uključenost AhR u sintezi iRNK za IL-1 $\beta$ . Međutim, sličan nivo transkripcije IL-1 $\beta$  u odgovoru na višu dozu kadmijuma, bez obzira na prisustvo AhR antagonista, ukazuje na mogućnost postojanja nekih dodatnih mehanizama regulacije transkripcije citokina putem kadmijuma, i moguće je da efekat AhR na transkripciju IL-1 $\beta$  zavisi od primenjene doze kadmijuma. Neslaganje između produkcije i nivoa iRNK za IL-1 $\beta$  u odgovoru na kadmijum je, kao i u *in vivo* sistemu, posledica smanjenog nivoa iRNK za komponentu inflamazoma NLRP3. Povećanje nivoa iRNK za NLRP3 u ćelijama tretiranim sa kadmijumom i antagonistom naspram smanjenja nivoa u ćelijama tretiranim samo sa kadmijumom, ukazuje da je uočen efekat posledica aktivacije AhR. Ovu pretpostavku podržavaju rezultati dobijeni na mišjim peritonealnim makrofagima tretiranim sa TCDD i FICZ koji pokazuju da AhR, nakon aktivacije, inhibira ekspresiju gena za NLRP3, njegovu transkripciju kao i aktivaciju (Huai i drugi, 2014).

### 5.3. Efekat produženog oralnog unosa kadmijuma na pluća u patofiziološkim uslovima tokom infekcije izazvane oportunističkom gljivom *A. fumigatus*

Tokom prvih sedam dana infekcije kod životinja koje su bile izložene kadmijumu zapažen je niži stepen infekcije, na osnovu smanjenja broja kolonija, u poređenju sa životinjama koje nisu bile izložene ovom metalu što sugerise efikasnije uklanjanje gljive iz pluća jedinki nakon produženog oralnog tretmana kadmijumom. U literaturi nema podataka koji se odnose na gljivične infekcije, ali druga istraživanja su pokazala da kadmijum unet oralnim putem nema efekta na titar H1N1 virusa (Chandler i drugi, 2019), ili da čak dovodi do povećanja stepena infekcije RSV (Hu i drugi, 2019b) u plućima inficiranih životinja izloženih metalu u poređenju sa jedinkama neizloženim kadmijumu. Razlog za ovu razliku može biti sama priroda infektivnog agensa i specifičnog odgovora domaćina na njega. U slučaju H1N1 infekcije, kadmijum je doveo do supresije limfoidnih ćelija, koje su ključne za uklanjanje virusa, dok je u slučaju RSV kadmijum indukovao tešku inflamaciju u plućima koja je pogoršala bolest izazvanu samim virusom. Lokalna inflamacija posredovana urođenim imunskim odgovorom neophodna je za uklanjanje gljive i deluje zajedno sa citokinima produkovanim tokom adaptivnog ćelijskog imunskog odgovora (Cramer i drugi, 2011; Mirkov i drugi, 2019; Sales-Campos i drugi, 2013). Generalno gledano nije primećena inhibicija ni urođene ni adaptivne grane imunskog odgovora. Pored toga, sam kadmijum je mogao da utiče na niži stepen infekcije gljivom, jer je pokazano da ovaj teški metal može da suprimira stopu rasta različitih izolata *A. fumigatus* iz zemljišta (Al-Garni i drugi, 2009; Oladipo i drugi, 2016). Rezultati dobijeni nakon gajenja gljive u podlozi obogaćenoj kadmijumom govore u prilog ovoj pretpostavci. Međutim, smanjena vijabilnost gljive izložene kadmijumu ne može u potpunosti da objasni razlike u stepenu infekcije između jedinki koje nisu bile izložene kadmijumu i onih koje jesu.

Histopatološka analiza nije pokazala značajne razlike u inflamaciji tkiva pluća između životinja izloženih i neizloženih kadmijumu, ali prisustvo oštećenog respiratornog epitela kod inficiranih životinja prethodno izloženih kadmijumu (u poređenju sa životinjama neizloženim kadmijumu), ukazuje na veće oštećenje tkiva kod ovih životinja. Viši nivo MDA 7. dana kod inficiranih životinja prethodno izloženih kadmijumu (u poređenju sa životinjama neizloženim kadmijumu), takođe ukazuje na veće oštećenje tkiva kod ovih životinja. Oštećenje epitela respiratornog trakta nastalo tokom imunskog odgovora na gljivu kod životinja koje su pile kadmijum predstavlja rizik za dalje oštećenje tkiva u nekom narednom izlaganju štetnim agensima.

Povećanje broja peharastih ćelija bi moglo da ukaže na viši stepen produkcije mukusa koji predstavlja prvu liniju odbrane epitela vazdušnih puteva od udahnutih agenasa, uključujući čestice nošene vazduhom, iritante i mikrobe (Fahy i Dickey, 2010; Rogers, 2007). Veći broj peharastih ćelija kod inficiranih životinja koje su pile kadmijum (u poređenju sa neinficiranim životinjama koje su pile kadmijum i inficiranim životinjama koje nisu pile kadmijum) može biti posledica većeg intenziteta stimulusa kojem su pluća bila izložena (kadmijum i konidije gljive) i može doprineti bržem uklanjanju gljive iz pluća u ovoj grupi jer je poznato da mukocilijarni sistem odbrane ima zaštitnu ulogu tokom infekcije izazvane udahnutim konidijama gljive *A. fumigatus* (Latge, 1999). U prilog ovome govori i podatak o povećanoj sekreciji mukusa koja se zapaža u ćelijskoj liniji NCI-H292 poreklom iz bronhije čoveka u odgovoru na ekstrakte *A. fumigatus* (Oguma i drugi, 2011). Pored kadmijuma i konidija, produkcija mukusa može biti stimulisana i citokinima (uključujući IL-17) (Fahy i Dickey, 2010). Viši nivo IL-17 kod inficiranih životinja prethodno izloženih kadmijumu (u poređenju sa inficiranom grupom neizloženom kadmijumu) je možda doprineo porastu broja peharastih ćelija i njihovoj aktivnosti kod ovih životinja. Bez obzira na uočeno povećanje broja peharastih ćelija nisu zapažene promene u nivou iRNK za mucine, što sugerise da je mukus sintetisan i skladišten u vezikule peharastih ćelija u vremenskom periodu koji prethodi ispitivanim vremenskim tačkama.

Nepromenjen nivo produkcije ROK od strane leukocita izolovanih iz pluća tokom infekcije kod životinja koje su pile kadmijum u poređenju sa životinjama koje ga nisu unosile je verovatno posledica slične produkcije INF- $\gamma$  kod ove dve grupe jedinki, pošto se zna da ovaj citokin stimuliše oksidativnu aktivnost fagocita (Schroder i drugi, 2004). Nasuprot nepromenjenoj produkciji ROK,

veća aktivnost (i oslobađanje iz ćelija) MPO (aktivnost leukocita koja je takođe neophodna za uklanjanje *A. fumigatus*) (Aratani i drugi, 2002; Balloy i Chignard, 2009) je zapažena kod jedinki koje su prethodno pile kadmijum. Moguće je da je veće oslobađanje MPO doprinelo efikasnijem uklanjanju gljive iz pluća, ali i većem oštećenju tkiva kod inficiranih životinja izloženih kadmijumu. Imajući na umu ulogu IL-17 u aktivaciji neutrofila (Hoshino i drugi, 2000), može se pretpostaviti da je intenzivnije oslobađanje MPO od strane leukocita izolovanih iz pluća inficiranih životinja koje su pile kadmijum (u poređenju sa životinjama koje nisu unosile kadmijum) povezano sa većom produkcijom IL-17 zabeleženom kod ovih životinja.

Iako sam kadmijum u plućima dovodi do povećanja nivoa IL-1 $\beta$ , TNF i IL-6, a ne menja IFN- $\gamma$ , IL-17 i IL-10, izloženost kadmijumu pre infekcije generalno nema efekta na nivo citokina u homogenatu pluća, izuzev izraženijeg povećanja IL-17 i kasnijeg IL-10 odgovora (od 3. dana kod jedinki koje nisu bile izložene kadmijumu u odnosu na jedinke izložene metalu kod kojih je odgovor zapažen samo 7. dana). Može se pretpostaviti da konidije gljive dovode do intenzivnijeg odgovora u plućima u odnosu na kadmijum (sudeći po nivou citokina u plućima jedinki neizloženih metalu) i da je eventualni efekat kadmijuma suviše suptilan da bi bio detektovan na ovom nivou. U prilog ovoj pretpostavci govori i podatak da prisustvo konidija u plućima može da prevaziđe prvobitan inhibicioni efekat kadmijuma na produkciju IL-1 $\beta$  i TNF od strane leukocita izolovanih iz pluća. Najverovatniji izvor citokina u plućima su leukociti prisutni u ovom organu, sudeći po sličnom tipu odgovora u homogenatima i ćelijama izolovanim iz pluća enzimskom digestijom. Međutim, ne može se isključiti produkcija citokina i od strane drugih tipova ćelija prisutnih u plućima (posebno kada se radi o IL-1 $\beta$  i IL-6 odgovoru). U prilog ovome govori podatak da, isto kao i u slučaju odgovora na kadmijum, epitelne ćelije pluća mogu da proizvode citokine u odgovoru na prisustvo gljive (Jeong i drugi, 2018; Rowley i drugi, 2021). Intenzivniji IL-17 odgovor zapažen kod jedinki izloženih kadmijumu, kao i kasnija aktivacija anti-inflamatornog odgovora su verovatno doprineli formiranju inflamatorne sredine koja doprinosi efikasnijem uklanjanju gljive iz pluća ovih jedinki.

Niži nivoi produkcije IFN- $\gamma$  od strane ćelija limfnih čvorova medijastinuma inficiranih životinja izloženih kadmijumu u odnosu na inficirane neizložene životinje ukazuju na supresiju nastanka ćelija koje proizvode IFN- $\gamma$  u čvorovima. Ovaj nalaz je u skladu sa dobro poznatim efektom kadmijuma na inhibiciju produkcije citokina od strane limfocita (Boscalo i drugi, 2005). Diferencijalni efekat kadmijuma na nastanak ćelija u limfnim čvorovima medijastinuma koje proizvode IFN- $\gamma$  (inhibicija) i na produkciju ovog citokina od strane leukocita iz pluća (izostanak efekta) može biti posledica diferencijalne osetljivosti leukocita iz ovih sredina na kadmijum, pošto efekat ovog metala može da zavisi od aktivacionog statusa leukocita (Colombo i drugi, 2004; Hemdan i drugi, 2006; Turley i drugi, 2019). Drenirajući limfni čvorovi su mesta inicijalne aktivacije ćelija koje proizvode citokine u odgovoru na gljivu *A. fumigatus*, koje zahtevaju dodatnu stimulaciju nakon migracije u pluća da bi postale zrele efektorske ćelije koje proizvode IFN- $\gamma$  (Rivera i drugi, 2006). Nasuprot IFN- $\gamma$ , viša produkcija IL-17 je zabeležena u ćelijama limfnih čvorova medijastinuma, što ukazuje na diferencijalni efekat kadmijuma na ispitivane citokine i u saglasnosti je sa poznatim efektom kadmijuma na produkciju IL-17 (Hemdan i drugi, 2013; Ninkov i drugi, 2015; Tucovic i drugi, 2018; Turley i drugi, 2019). Iako zahvaljujući svojoj proinflamatornoj aktivnosti IL-17 može da utiče na efikasnije uklanjanje gljive iz pluća, on takođe može da pokrene i/ili podstakne razvoj hroničnih inflamatornih bolesti (Hemdan i drugi, 2013).

## **6. ZAKLJUČAK**

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Produženi oralni unos kadmijuma u fiziološkim uslovima dovodi do dozno-zavisnog povećanja deponovanja ovog metala u jetri, bubrezima i plućima pacova.
2. U fiziološkim uslovima produženi oralni unos kadmijuma u plućima dovodi do:
  - a) Oštećenja tkiva pluća (edem, deskvamacija respiratornog epitela) i infiltracije imunskih ćelija.
  - b) Povećanja broja peharastih ćelija u vazdušnim putevima i povećane produkcije mukusa.
  - c) Inflammacije u tkivu pluća.
  - d) Povećanja nivoa oksidativnog stresa i smanjenja aktivnosti enzima antioksidativne odbrane.
  - e) Promene u aktivnosti leukocita izolovanih iz pluća, pri čemu efekat kadmijuma na aktivnost ćelija (stimulacija, supresija ili izostanak efekta) zavisi od ispitivane funkcije.
  - f) Povećanja anti-inflamatornog odgovora u ćelijama limfnih čvorova medijastinuma.
3. Kadmijum u fiziološkim uslovima ispoljava svoje imunomodulatorne efekte i aktivacijom aril-ugljovodoničnog receptora u leukocitima izolovanim iz pluća.
4. U patofiziološkim uslovima infekcije izazvane gljivom *A. fumigatus* kadmijum koji u organizam dospeva oralnim putem dovodi do nižeg stepena infekcije pluća tako što:
  - a) Direktno suprimira rast gljive.
  - b) Povećava broj peharastih ćelija i produkciju mukusa koji predstavlja prvu liniju odbrane od gljive.
  - c) Dovodi do intenzivnije diferencijacije T-ćelija u pravcu Th17 T-ćelija u limfnim čvorovima medijastinuma i njihove veće aktivnosti u tkivu pluća.

Duže trajanje inflamacije u plućima tokom eliminacije *A. fumigatus* kod životinja koje su pile kadmijum povećava oštećenje samog tkiva.

Kadmijum koji je u organizam dospeo oralnim putem ispoljava kako proinflamatorne tako i imunosupresivne efekte na inflamaciju u plućima i imunsku reaktivnost što ukazuje na složeno imunomodulatorno delovanje ovog metala. Proinflamatorno mikrokruženje u plućima koje uspostavlja kadmijum, čini ovaj teški metal faktorom rizika za razvoj hronične inflamacije niskog stepena u plućima što bi moglo da utiče na osetljivost organizma (naročito kod imunokompromitovanih osoba) u različitim patofiziološkim uslovima.

## **7. LITERATURA**

- Abbas, A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2017). Cellular and Molecular Immunology International Edition, 9th Edition. Elsevier Science.
- Abshire, M. K., Buzard, G. S., Shiraishi, N., & Waalkes, M. P. (1996). Induction of c-myc and c-jun proto-oncogene expression in rat L6 myoblasts by cadmium is inhibited by zinc preinduction of the metallothionein gene. *Journal of toxicology and environmental health*, 48(4), 359–377.
- Adams, S. V., & Newcomb, P. A. (2014). Cadmium blood and urine concentrations as measures of exposure: NHANES 1999-2010. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 24(2), 163–170.
- Afolabi, O. K., Oyewo, E. B., Adekunle, A. S., Adedosu, O. T., & Adedeji, A. L. (2012). Impaired lipid levels and inflammatory response in rats exposed to cadmium. *EXCLI journal*, 11, 677–687.
- Ajani, J. A., Welch, S. R., Raber, M. N., Fields, W. S., & Krakoff, I. H. (1990). Comprehensive criteria for assessing therapy-induced toxicity. *Cancer investigation*, 8(2), 147–159.
- Akesson, A., Berglund, M., Schütz, A., Bjellerup, P., Bremme, K., & Vahter, M. (2002). Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status. *American journal of public health*, 92(2), 284–287.
- Al-Garni, S., Ghanem, K., & Bahobail, A. (2009). Biosorption characteristics of *Aspergillus fumigatus* in removal of cadmium from an aqueous solution. *African Journal of Biotechnology*, 8(17).
- Alghasham, A., Salem, T. A., & Meki, A. R. (2013). 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: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 59, 160–164.
- Alloway, B. J. (1995). Heavy Metals in Soils. London, UK: Blackie Academic & Professional.
- Amamou, F., Nemmiche, S., Meziane, R. K., Didi, A., Yazit, S. M., & Chabane-Sari, D. (2015). Protective effect of olive oil and colocynth oil against cadmium-induced oxidative stress in the liver of Wistar rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 78, 177–184.
- Amoruso, M. A., Witz, G., & Goldstein, B. D. (1982). Enhancement of rat and human phagocyte superoxide anion radical production by cadmium in vitro. *Toxicology letters*, 10(2-3), 133–138.
- Annunziato, F., & Romagnani, S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis research & therapy*, 11(6), 257.
- Anwar-Mohamed, A., Elbekai, R. H., & El-Kadi, A. O. (2009). Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 5(5), 501–521.
- Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M. C., Maeda, N., & Koyama, H. (2002). Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Medical mycology*, 40(6), 557–563.
- Arora, M., Kiran, B., Rani, S., Rani, A., Kaur, B. and Mittal, N. (2008). Heavy Metal Accumulation in Vegetables Irrigated with Water from Different Sources. *Food Chemistry*, 111, 811-815.
- Asagba, S. O. (2009). Role of diet in absorption and toxicity of oral cadmium- A review of literature. *African Journal of Biotechnology*, 7428–7436.
- Assad, N., Sood, A., Campen, M. J., & Zychowski, K. E. (2018). Metal-Induced Pulmonary Fibrosis. *Current environmental health reports*, 5(4), 486–498.
- Baba, H., Tsuneyama, K., Yazaki, M., Nagata, K., Minamisaka, T., Tsuda, T., Nomoto, K., Hayashi, S., Miwa, S., Nakajima, T., Nakanishi, Y., Aoshima, K., & Imura, J. (2013). The liver in itai-itai disease (chronic cadmium poisoning): pathological features and metallothionein expression. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 26(9), 1228–1234.
- Balloy, V., & Chignard, M. (2009). The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and infection*, 11(12), 919–927.

- Berglund, M., Akesson, A., Nermell, B., & Vahter, M. (1994). Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. *Environmental health perspectives*, 102(12), 1058–1066.
- Bernard, A., & Lauwerys, R. (1986). Effects of cadmium exposure in humans. In: E.C. Foulkes (Ed.), *Cadmium* (pp.135–177). New York, USA: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bertin, G., & Averbeck, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88(11), 1549–1559.
- Bhattacharyya, M. H., Whelton, B. D., Stern, P. H., & Peterson, D. P. (1988). Cadmium accelerates bone loss in ovariectomized mice and fetal rat limb bones in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(22), 8761–8765.
- Blanusa, M., Mrković-Milić, R., & Durbesić, P. (2002). Lead and cadmium in soil and Isopoda woodlice in Croatia. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52(3), 198–202.
- Blum, J. L., Rosenblum, L. K., Grunig, G., Beasley, M. B., Xiong, J. Q., & Zelikoff, J. T. (2014). Short-term inhalation of cadmium oxide nanoparticles alters pulmonary dynamics associated with lung injury, inflammation, and repair in a mouse model. *Inhalation toxicology*, 26(1), 48–58.
- Booth, C. (1971). Chapter II fungal culture media. In *Methods in microbiology* (Vol. 4, pp. 49-94). Academic Press.
- Boscolo, P., Di Giampaolo, L., Qiao, N., Reale, M., Castellani, M. L., Lucci, I., Travaglini, P., Kouri, M., Verna, N., Volpe, A. R., Carmignani, M., Paganelli, R., & Di Gioacchino, M. (2005). Inhibitory effects of cadmium on peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine release are reversed by zinc and selenium salts. *Annals of clinical and laboratory science*, 35(2), 115–120.
- Boudreau, J., Vincent, R., Nadeau, D., Trottier, B., Fournier, M., Krzystyniak, K., & Chevalier, G. (1988). Toxicity of inhaled cadmium chloride: early responses of the antioxidant and surfactant systems in rat lungs. *Journal of toxicology and environmental health*, 23(2), 241–256.
- Bouley, G., Chaumard, C., Quero, A. M., Girard, F., & Boudene, C. (1982). Opposite effects of inhaled cadmium microparticles on mouse susceptibility to an airborne bacterial and an airborne viral infection. *The Science of the total environment*, 23, 185–188.
- Bozeman, P. M., Learn, D. B., & Thomas, E. L. (1990). Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Journal of immunological methods*, 126(1), 125–133.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*, 4(165), 165rv13.
- Brzoska, M. M., Rogalska, J., Roszczenko, A., Galazyn-Sidorczuk, M., & Tomczyk, M. (2016). The Mechanism of the Osteoprotective Action of a Polyphenol-Rich Aronia melanocarpa Extract during Chronic Exposure to Cadmium is Mediated by the Oxidative Defense System. *Planta medica*, 82(7), 621–631.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169–193.
- Carageorgiou, H., Katramadou, M. (2012). Aspects of Cadmium Neurotoxicity. In: Y.V. Li and J.H. Zhang (Eds.), *Metal Ion in Stroke* (pp.703-749). New York, NY: Springer.
- Castellino, F., & Germain, R. N. (2006). Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annual review of immunology*, 24, 519–540.
- Chakraborty, P. K., Lee, W. K., Molitor, M., Wolff, N. A., & Thévenod, F. (2010). Cadmium induces Wnt signaling to upregulate proliferation and survival genes in sub-confluent kidney proximal tubule cells. *Molecular cancer*, 9, 102.
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3), 527–605.
- Chandler, J. D., Hu, X., Ko, E. J., Park, S., Fernandes, J., Lee, Y. T., Orr, M. L., Hao, L., Smith, M. R., Neujahr, D. C., Uppal, K., Kang, S. M., Jones, D. P., & Go, Y. M. (2019). Low-dose



cadmium potentiates lung inflammatory response to 2009 pandemic H1N1 influenza virus in mice. *Environment international*, 127, 720–729.

- Chandler, J. D., Wongtrakool, C., Banton, S. A., Li, S., Orr, M. L., Barr, D. B., Neujahr, D. C., Sutliff, R. L., Go, Y. M., & Jones, D. P. (2016). Low-dose oral cadmium increases airway reactivity and lung neuronal gene expression in mice. *Physiological reports*, 4(13), e12821.
- Chang, L. Y., Slot, J. W., Geuze, H. J., & Crapo, J. D. (1988). Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *The Journal of cell biology*, 107(6 Pt 1), 2169–2179.
- Chang, Y. C., Tsai, H. F., Karos, M., & Kwon-Chung, K. J. (2004). THTA, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 41(9), 888–896.
- Chaumard, C., Forestier, F., & Quero, A. M. (1991). Influence of inhaled cadmium on the immune response to influenza virus. *Archives of environmental health*, 46(1), 50–56.
- Chaumard, C., Quero, A. M., Bouley, G., Girard, F., Boudene, C., & German, A. (1983). Influence of inhaled cadmium microparticles on mouse influenza pneumonia. *Environmental research*, 31(2), 428–439.
- Chen, C., Xun, P., Nishijo, M., & He, K. (2016). Cadmium exposure and risk of lung cancer: a meta-analysis of cohort and case-control studies among general and occupational populations. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 26(5), 437–444.
- Chen, P. C., Lai, Y. M., Wang, J. D., Yang, C. Y., Hwang, J. S., Kuo, H. W., Huang, S. L., & Chan, C. C. (1998). Adverse effect of air pollution on respiratory health of primary school children in Taiwan. *Environmental health perspectives*, 106(6), 331–335.
- Chen, Y. Y., Zhu, J. Y., & Chan, K. M. (2014). Effects of cadmium on cell proliferation, apoptosis, and proto-oncogene expression in zebrafish liver cells. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 157, 196–206.
- Cheon, H., Woo, Y. S., Lee, J. Y., Kim, H. S., Kim, H. J., Cho, S., Won, N. H., & Sohn, J. (2007). Signaling pathway for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced TNF-alpha production in differentiated THP-1 human macrophages. *Experimental & molecular medicine*, 39(4), 524–534.
- Choi, H. S., Kim, J. W., Cha, Y. N., & Kim, C. (2006). A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of immunoassay & immunochemistry*, 27(1), 31–44.
- Cohen, M. D. (2004). Pulmonary immunotoxicology of select metals: aluminum, arsenic, cadmium, chromium, copper, manganese, nickel, vanadium, and zinc. *Journal of immunotoxicology*, 1(1), 39–69.
- Colombo, M., Hamelin, C., Kouassi, E., Fournier, M., & Bernier, J. (2004). Differential effects of mercury, lead, and cadmium on IL-2 production by Jurkat T cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 111(3), 311–322.
- Cornet-Boyaka, E., Jolivet, K., Bonnegarde-Bernard, A., Rennolds, J., Hassan, F., Mehta, P., Tridandapani, S., Webster-Marketon, J., & Boyaka, P. N. (2012). An NF-κB-independent and Erk1/2-dependent mechanism controls CXCL8/IL-8 responses of airway epithelial cells to cadmium. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 125(2), 418–429.
- Cox, J. N., Rahman, M. A., Bao, S., Liu, M., Wheeler, S. E., & Knoell, D. L. (2016). Cadmium attenuates the macrophage response to LPS through inhibition of the NF-κB pathway. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 311(4), L754–L765.
- Cramer, R. A., Rivera, A., & Hohl, T. M. (2011). Immune responses against *Aspergillus fumigatus*: what have we learned? *Current opinion in infectious diseases*, 24(4), 315–322.
- Crapo, J. D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J. W., & Chang, L. Y. (1992). Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10405–10409.

- Crissman, J. W., Goodman, D. G., Hildebrandt, P. K., Maronpot, R. R., Prater, D. A., Riley, J. H., Seaman, W. J., & Thake, D. C. (2004). Best practices guideline: toxicologic histopathology. *Toxicologic pathology*, 32(1), 126–131.
- Currier, M. G., Lee, S., Stobart, C. C., Hotard, A. L., Villenave, R., Meng, J., Pretto, C. D., Shields, M. D., Nguyen, M. T., Todd, S. O., Chi, M. H., Hammonds, J., Krumm, S. A., Spearman, P., Plemper, R. K., Sakamoto, K., Peebles, R. S., Jr, Power, U. F., & Moore, M. L. (2016). EGFR Interacts with the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Strain 2-20 and Mediates Infection and Mucin Expression. *PLoS pathogens*, 12(5), e1005622.
- Czeczot, H., Skrzycki, M. (2010). Kadm – pierwiastek całkowicie zbedny dla organizmu. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*, 64, 38–49.
- Dai, S., Yin, Z., Yuan, G., Lu, H., Jia, R., Xu, J., Song, X., Li, L., Shu, Y., Liang, X., He, C., Lv, C., & Zhang, W. (2013). Quantification of metallothionein on the liver and kidney of rats by subchronic lead and cadmium in combination. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(3), 1207–1216.
- Damek-Poprawa, M., & Sawicka-Kapusta, K. (2004). 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*, 96(1), 72–78.
- Das, S. & Al-Naemi, H. (2019). Cadmium Toxicity: Oxidative Stress, Inflammation and Tissue Injury. *Occupational Diseases and Environmental Medicine*, 7, 144-163.
- Demenesku, J., Mirkov, I., Ninkov, M., Popov Aleksandrov, A., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., & Kataranovski, M. (2014). Acute cadmium administration to rats exerts both immunosuppressive and proinflammatory effects in spleen. *Toxicology*, 326, 96–108.
- Demenesku, J., Popov Aleksandrov, A., Mirkov, I., Ninkov, M., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Brceski, I., & Kataranovski, M. (2016). Strain differences of cadmium-induced toxicity in rats: Insight from spleen and lung immune responses. *Toxicology letters*, 256, 33–43.
- Descotes, J. (1992). Immunotoxicology of cadmium. *IARC scientific publications*, (118), 385–390.
- Djokic, J., Ninkov, M., Mirkov, I., Popov Aleksandrov, A., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., & Kataranovski, M. (2014). Differential effects of cadmium administration on peripheral blood granulocytes in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(1), 210–219.
- Djokic, J., Popov Aleksandrov, A., Ninkov, M., Mirkov, I., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., & Kataranovski, M. (2015). Cadmium administration affects circulatory mononuclear cells in rats. *Journal of immunotoxicology*, 12(2), 115–123.
- Dkhil, M. A., Al-Quraishy, S., Diab, M. M., Othman, M. S., Aref, A. M., & Abdel Moneim, A. E. (2014). The potential protective role of *Physalis peruviana* L. fruit in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 74, 98–106.
- Döhr, O., Vogel, C., & Abel, J. (1995). Different response of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 321(2), 405–412.
- Dolwick, K. M., Schmidt, J. V., Carver, L. A., Swanson, H. I., & Bradfield, C. A. (1993). Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Molecular pharmacology*, 44(5), 911–917.
- Dong, S., Shen, H. M., & Ong, C. N. (2001). Cadmium-induced apoptosis and phenotypic changes in mouse thymocytes. *Molecular and cellular biochemistry*, 222(1-2), 11–20.
- Dong, W., Simeonova, P. P., Gallucci, R., Matheson, J., Flood, L., Wang, S., Hubbs, A., & Luster, M. I. (1998). Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicology and applied pharmacology*, 151(2), 359–366.
- Driscoll, K. E., Maurer, J. K., Poynter, J., Higgins, J., Asquith, T., & Miller, N. S. (1992). Stimulation of rat alveolar macrophage fibronectin release in a cadmium chloride model of lung injury and fibrosis. *Toxicology and applied pharmacology*, 116(1), 30–37.
- EFSA. (2009). Cadmium in food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA journal. *European Food Safety Authority*, 112, 1099-103.

- Egan, S. K., Bolger, P. M., & Carrington, C. D. (2007). Update of US FDA's Total Diet Study food list and diets. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, *17*(6), 573–582.
- Elbekai, R. H., & El-Kadi, A. O. (2004). Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated gene expression by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology*, *202*(3), 249–269.
- El-Boshy, M. E., Risha, E. F., Abdelhamid, F. M., Mubarak, M. S., & Hadda, T. B. (2015). 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: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, *29*, 104–110.
- El-Muzghi, A. A., Mirkov, I., Djokic, J., Popov Aleksandrov, A., Miljkovic, D., Glamoclija, J., Kataranovski, D., & Kataranovski, M. (2013). Regional cytokine responses to pulmonary aspergillosis in immunocompetent rats. *Immunobiology*, *218*(12), 1514–1523.
- Enger, M. D., Hildebrand, C. E., & Stewart, C. C. (1983). Cd<sup>2+</sup> responses of cultured human blood cells. *Toxicology and applied pharmacology*, *69*(2), 214–224.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*, *1*(6), 529–539.
- Fahy, J. V., & Dickey, B. F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine*, *363*(23), 2233–2247.
- Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S., Tucker, P., Jenkins, K., Ingerman, L., & Rudisill, C. (2012). *Toxicological Profile for Cadmium*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US).
- Fasanya-Odewumi, C., Latinwo, L. M., Ikediobi, C. O., Gilliard, L., Sponholtz, G., Nwoga, J., Stino, F., Hamilton, N., & Erdos, G. W. (1998). The genotoxicity and cytotoxicity of dermally-administered cadmium: effects of dermal cadmium administration. *International journal of molecular medicine*, *1*(6), 1001–1006.
- FAWC. (1993). Second Report on Priorities for Research and Development in Farm Animal Welfare. Farm Animal Welfare Council (FAWC), Department of Environment, Food and Rural Affairs; London, UK.
- Filipic, M., Fatur, T., & Vudrag, M. (2006). Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Human & experimental toxicology*, *25*(2), 67–77.
- Fisher, C. E., Stevens, A. M., Leisenring, W., Pergam, S. A., Boeckh, M., & Hohl, T. M. (2013). The serum galactomannan index predicts mortality in hematopoietic stem cell transplant recipients with invasive aspergillosis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *57*(7), 1001–1004.
- Flanagan, P. R., McLellan, J. S., Haist, J., Cherian, G., Chamberlain, M. J., & Valberg, L. S. (1978). Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology*, *74*(5 Pt 1), 841–846.
- Fontani, M., Costa, M., Orna, M. V. (2015). *The Lost Elements, The Periodic Table's Shadow Side*. New York, NY: Oxford University Press.
- Freitas, M., & Fernandes, E. (2011). Zinc, cadmium and nickel increase the activation of NF-κB and the release of cytokines from THP-1 monocytic cells. *Metallomics: integrated biometal science*, *3*(11), 1238–1243.
- Friberg, L., Elinder, C., Kjellstrom, T. & Nordberg, G.F. (1986). *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal*, (pp. 103–178). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G., Kjellstrom, T. (1974). *Cadmium in the Environment*. Cleveland, Ohio: CRC Press.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, *64*, 97–112.
- Fu, Z., Costello, M. L., Tsukimoto, K., Prediletto, R., Elliott, A. R., Mathieu-Costello, O., & West, J. B. (1992). High lung volume increases stress failure in pulmonary capillaries. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *73*(1), 123–133.

- Fujimaki, H. (1985). In vitro effect of cadmium on primary antibody response to T-cell independent antigen (DNP-Ficoll). *Toxicology letters*, 24(1), 21–24.
- Fujimaki, H. (1987). Comparison of the effect of cadmium on lymphocytes of young and adult mice. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 7(4), 39–45.
- Fujimaki, H., Murakami, M., & Kubota, K. (1982). In vitro evaluation of cadmium-induced augmentation of the antibody response. *Toxicology and applied pharmacology*, 62(2), 288–293.
- Galazyn-Sidorczuk, M., Brzóška, M. M., Rogalska, J., Roszczenko, A., & Jurczuk, M. (2012). Effect of zinc supplementation on glutathione peroxidase activity and selenium concentration in the serum, liver and kidney of rats chronically exposed to cadmium. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 26(1), 46–52.
- Ganguly, K., Levänen, B., Palmberg, L., Åkesson, A., & Lindén, A. (2018). Cadmium in tobacco smokers: a neglected link to lung disease? *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society*, 27(147), 170122.
- Garcia-Mendoza, D., Han, B., van den Berg, H., & van den Brink, N. W. (2019). Cell-specific immune-modulation of cadmium on murine macrophages and mast cell lines in vitro. *Journal of applied toxicology: JAT*, 39(7), 992–1001.
- Gardner, D. E., Miller, F. J., Illing, J. W., & Kirtz, J. M. (1977). Alterations in bacterial defense mechanisms of the lung induced by inhalation of cadmium. *Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire*, 13(1), 157–174.
- Gautam, P. K., Gautam, R. K., Chattopadhyaya, M. C., Banerjee, S., Chattopadhyaya, M. C., Pandey, J. D. (2016). Heavy metals in the environment: fate, transport, toxicity and remediation technologies. In: D. Pathania (Ed.), *Heavy metals* (pp.1-29). Nava Science Publishers, Inc.
- Gavett, S. H., & Oberdörster, G. (1994). Cadmium chloride and cadmium metallothionein-induced pulmonary injury and recruitment of polymorphonuclear leukocytes. *Experimental lung research*, 20(6), 517–537.
- Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., & Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 57(9-10), 453-455.
- Gera, R., Singh, V., Sharma, A. K., & Ghosh, D. (2015). Immunomodulation by Environmental Chemicals: Insights into Mammalian Immune Responses to Arsenic, Cadmium, and Lead. In *Advances in Molecular Toxicology* (Vol. 9, pp. 109-159). Elsevier.
- Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological chemistry*, 398(10), 1095–1108.
- Goering, P. L., Kuester, R. K., Neale, A. R., Chapekar, M. S., Zaremba, T. G., Gordon, E. A., & Hitchins, V. M. (2000). Effects of particulate and soluble cadmium species on biochemical and functional parameters in cultured murine macrophages. *In vitro & molecular toxicology*, 13(2), 125–136.
- Grasseschi, R. M., Ramaswamy, R. B., Levine, D. J., Klaassen, C. D., & Wesselius, L. J. (2003). Cadmium accumulation and detoxification by alveolar macrophages of cigarette smokers. *Chest*, 124(5), 1924–1928.
- Grose, E. C., Richards, J. H., Jaskot, R. H., Ménache, M. G., Graham, J. A., & Dauterman, W. C. (1987). A comparative study of the effects of inhaled cadmium chloride and cadmium oxide: pulmonary response. *Journal of toxicology and environmental health*, 21(1-2), 219–232.
- Gross, S. B., Yeager, D. W., & Middendorf, M. S. (1976). Cadmium in liver, kidney, and hair of humans, fetal through old age. *Journal of toxicology and environmental health*, 2(1), 153–167.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., & Hediger, M. A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388(6641), 482–488.

- Gutierrez-Vazquez, C., & Quintana, F. J. (2018). Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*, 48(1), 19–33.
- Guzik, T. J., Korbust, R., & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 54(4), 469–487.
- Haase, H., Ober-Blöbaum, J. L., Engelhardt, G., Hebel, S., & Rink, L. (2010). Cadmium ions induce monocytic production of tumor necrosis factor-alpha by inhibiting mitogen activated protein kinase dephosphorylation. *Toxicology letters*, 198(2), 152–158.
- Hagino, N. (1957). About investigations on Itai-itai disease. *Japan Toyama Medical Association*, 21, 7.
- Hajjeh, R. A., Sofair, A. N., Harrison, L. H., Lyon, G. M., Arthington-Skaggs, B. A., Mirza, S. A., Phelan, M., Morgan, J., Lee-Yang, W., Ciblak, M. A., Benjamin, L. E., Sanza, L. T., Huie, S., Yeo, S. F., Brandt, M. E., & Warnock, D. W. (2004). Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *Journal of clinical microbiology*, 42(4), 1519–1527.
- Hanson, M. L., Brundage, K. M., Schafer, R., Tou, J. C., & Barnett, J. B. (2010). Prenatal cadmium exposure dysregulates sonic hedgehog and Wnt/beta-catenin signaling in the thymus resulting in altered thymocyte development. *Toxicology and applied pharmacology*, 242(2), 136–145.
- Harkema, J. R., Nikula, K. J., Haschek, W. M. (2018). Chapter 14: Respiratory System. In: Matthew A. Wallig, Wanda M. Haschek, Colin G. Rousseaux, Brad Bolon (Eds.), *Fundamentals of Toxicologic Pathology (Third Edition)*, (pp.351-39). Academic Press.
- Hart, B. A., Cherian, M. G., & Angel, A. (1985). Cellular localization of metallothionein in the lung following repeated cadmium inhalation. *Toxicology*, 37(1-2), 171–179.
- Hart, B. A., Gong, Q., & Eneman, J. D. (1996). Pulmonary metallothionein expression in rats following single and repeated exposure to cadmium aerosols. *Toxicology*, 112(3), 205–218.
- Hart, B. A., Gong, Q., Eneman, J. D., & Durieux-Lu, C. C. (1995). In vivo expression of metallothionein in rat alveolar macrophages and type II epithelial cells following repeated cadmium aerosol exposures. *Toxicology and applied pharmacology*, 133(1), 82–90.
- Hart, B. A., Lee, C. H., Shukla, G. S., Shukla, A., Osier, M., Eneman, J. D., & Chiu, J. F. (1999). Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology*, 133(1), 43–58.
- Hassan, F., Xu, X., Nuovo, G., Killilea, D. W., Tyrrell, J., Da Tan, C., Tarran, R., Diaz, P., Jee, J., Knoell, D., Boyaka, P. N., & Cormet-Boyaka, E. (2014). Accumulation of metals in GOLD4 COPD lungs is associated with decreased CFTR levels. *Respiratory research*, 15(1), 69.
- Hassoun, E. A., & Stohs, S. J. (1996). Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures. *Toxicology*, 112(3), 219–226.
- Hawksworth, D. L., & Lucking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology spectrum*, 5(4), 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
- Hemdan, N. Y., Abu El-Saad, A. M., & Sack, U. (2013). The role of T helper (TH)17 cells as a double-edged sword in the interplay of infection and autoimmunity with a focus on xenobiotic-induced immunomodulation. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 374769.
- Hemdan, N. Y., Emmrich, F., Sack, U., Wichmann, G., Lehmann, J., Adham, K., & Lehmann, I. (2006). The in vitro immune modulation by cadmium depends on the way of cell activation. *Toxicology*, 222(1-2), 37–45.
- Hernandez, M., & Macia, M. (1996). Free peripheral sulfhydryl groups, CD11/CD18 integrins, and calcium are required in the cadmium and nickel enhancement of human-polymorphonuclear leukocyte adherence. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 30(4), 437–443.
- Hibbs, J. B., Jr, Taintor, R. R., Vavrin, Z., & Rachlin, E. M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and biophysical research communications*, 157(1), 87–94.

- Hiratsuka, H., Satoh, S. i., Satoh, M., Nishijima, M., Katsuki, Y., Suzuki, J., Nakagawa, J. i., Sumiyoshi, M., Shibutani, M., Mitsumori, K., Tanaka-Kagawa, T., & Ando, M. (1999). Tissue distribution of cadmium in rats given minimum amounts of cadmium-polluted rice or cadmium chloride for 8 months. *Toxicology and applied pharmacology*, *160*(2), 183–191.
- Ho, C. C., Chang, H., Tsai, H. T., Tsai, M. H., Yang, C. S., Ling, Y. C., & Lin, P. (2013). Quantum dot 705, a cadmium-based nanoparticle, induces persistent inflammation and granuloma formation in the mouse lung. *Nanotoxicology*, *7*(1), 105–115.
- Hord, N. G., & Perdew, G. H. (1994). Physicochemical and immunocytochemical analysis of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: characterization of two monoclonal antibodies to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Molecular pharmacology*, *46*(4), 618–626.
- Horiguchi, H., Harada, A., Oguma, E., Sato, M., Homma, Y., Kayama, F., Fukushima, M., Matsushima, K. (2000). Cadmium-induced acute hepatic injury is exacerbated in human interleukin-8 transgenic mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *163*(3), 231–239.
- Hoshino, H., Laan, M., Sjöstrand, M., Lötval, J., Skoogh, B. E., & Linden, A. (2000). Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *105*(1 Pt 1), 143–149.
- Hosseini-Khannazer, N., Azizi, G., Eslami, S., Alhassan Mohammed, H., Fayyaz, F., Hosseinzadeh, R., Usman, A. B., Kamali, A. N., Mohammadi, H., Jadidi-Niaragh, F., Dehghanifard, E., & Noorisepehr, M. (2020). The effects of cadmium exposure in the induction of inflammation. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, *42*(1), 1–8.
- Hu, X., Chandler, J. D., Park, S., Liu, K., Fernandes, J., Orr, M., Smith, M. R., Ma, C., Kang, S. M., Uppal, K., Jones, D. P., & Go, Y. M. (2019a). Low-dose cadmium disrupts mitochondrial citric acid cycle and lipid metabolism in mouse lung. *Free radical biology & medicine*, *131*, 209–217.
- Hu, X., Kim, K. H., Lee, Y., Fernandes, J., Smith, M. R., Jung, Y. J., Orr, M., Kang, S. M., Jones, D. P., & Go, Y. M. (2019b). Environmental Cadmium Enhances Lung Injury by Respiratory Syncytial Virus Infection. *The American journal of pathology*, *189*(8), 1513–1525.
- Huai, W., Zhao, R., Song, H., Zhao, J., Zhang, L., Zhang, L., Gao, C., Han, L., & Zhao, W. (2014). Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates NLRP3 inflammasome activity by inhibiting NLRP3 transcription. *Nature communications*, *5*, 4738.
- Huang, Q., Lu, Q., Chen, B., Shen, H., Liu, Q., Zhou, Z., & Lei, Y. (2017). LncRNA-MALAT1 as a novel biomarker of cadmium toxicity regulates cell proliferation and apoptosis. *Toxicology research*, *6*(3), 361–371.
- Hussain, T., Shukla, G. S., & Chandra, S. V. (1987). Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: in vivo and in vitro studies. *Pharmacology & toxicology*, *60*(5), 355–358.
- Ibrahim, A. A., Khaledi, H., Hassandarvish, P., Mohd Ali, H., & Karimian, H. (2014). Indole-7-carbaldehyde thiosemicarbazone as a flexidentate ligand toward ZnII, CdII, PdII and PtII ions: cytotoxic and apoptosis-inducing properties of the PtII complex. *Dalton transactions (Cambridge, England: 2003)*, *43*(10), 3850–3860.
- Jamakala, O., & Rani, U. A. (2015). Amelioration Effect of Zinc and Iron Supplementation on Selected Oxidative Stress Enzymes in Liver and Kidney of Cadmium-Treated Male Albino Rat. *Toxicology international*, *22*(1), 1–9.
- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, *68*, 167–182.
- Jarup, L., & Akesson, A. (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and applied pharmacology*, *238*(3), 201–208.
- Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G., & Vahter, M. (1998). Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian journal of work, environment & health*, *24 Suppl 1*, 1–51.
- Jensen, B. A., Leeman, R. J., Schlezinger, J. J., & Sherr, D. H. (2003). Aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists suppress interleukin-6 expression by bone marrow stromal cells: an immunotoxicology study. *Environmental health: a global access science source*, *2*(1), 16.

- Jeong, E. M., Moon, C. H., Kim, C. S., Lee, S. H., Baik, E. J., Moon, C. K., & Jung, Y. S. (2004). Cadmium stimulates the expression of ICAM-1 via NF-kappaB activation in cerebrovascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 320(3), 887–892.
- Jeong, J. H., Kim, J., Kim, J., Heo, H. R., Jeong, J. S., Ryu, Y. J., Hong, Y., Han, S. S., Hong, S. H., Lee, S. J., & Kim, W. J. (2017). ACN9 Regulates the Inflammatory Responses in Human Bronchial Epithelial Cells. *Tuberculosis and respiratory diseases*, 80(3), 247–254.
- Jeong, J. S., Lee, K. B., Kim, S. R., Kim, D. I., Park, H. J., Lee, H. K., Kim, H. J., Cho, S. H., Kolliputi, N., Kim, S. H., & Lee, Y. C. (2018). Airway epithelial phosphoinositide 3-kinase- $\delta$  contributes to the modulation of fungi-induced innate immune response. *Thorax*, 73(8), 758–768.
- Jiang, J., McCool, B. A., & Parrish, A. R. (2002). Cadmium- and mercury-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in immortalized proximal tubule cells: evidence for a role of decreased transforming growth factor-beta1. *Toxicology and applied pharmacology*, 179(1), 13–20.
- Jonah, M. M., & Bhattacharyya, M. H. (1989). Early changes in the tissue distribution of cadmium after oral but not intravenous cadmium exposure. *Toxicology*, 58(3), 325–338.
- Jorge-Nebert, L. F., Gálvez-Peralta, M., Landero Figueroa, J., Somarathna, M., Hojyo, S., Fukada, T., & Nebert, D. W. (2015). Comparing gene expression during cadmium uptake and distribution: untreated versus oral Cd-treated wild-type and ZIP14 knockout mice. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 143(1), 26–35.
- Jose, R. J., & Brown, J. S. (2016). Opportunistic bacterial, viral and fungal infections of the lung. *Medicine (Abingdon, England: UK ed.)*, 44(6), 378–383.
- Kataranovski, M., Kataranovski, D., Savic, D., Jovicic, G., Bogdanovic, Z., & Jovanovic, T. (1998). Granulocyte and plasma cytokine activity in acute cadmium intoxication in rats. *Physiological research*, 47(6), 453–461.
- Kataranovski, M., Mirkov, I., Belij, S., Nikolic, M., Zolotarevski, L., Ciric, D., & Kataranovski, D. (2009). Lungs: remote inflammatory target of systemic cadmium administration in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 28(2), 225–231.
- Katirae, F., Khosravi, A. R., Khalaj, V., Hajiabdolbaghi, M., Khaksar, A., Rasoolinejad, M., & Yekaninejad, M. S. (2010). Oropharyngeal candidiasis and oral yeast colonization in Iranian Human Immunodeficiency Virus positive patients. *Journal de mycologie médicale*, 20(1), 8–14.
- Keller, G. A., Warner, T. G., Steimer, K. S., & Hallewell, R. A. (1991). Cu, Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7381–7385.
- Kenaga, C., Cherian, M. G., Cox, C., & Oberdörster, G. (1996). Metallothionein induction and pulmonary responses to inhaled cadmium chloride in rats and mice. *Fundamental and applied toxicology: official journal of the Society of Toxicology*, 30(2), 204–212.
- Khanna, S., & Khanna, P. (2011). Assessment of heavy metal contamination in different vegetables grown in and around urban areas. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5, 162–179.
- Kimura, A., Naka, T., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., & Kishimoto, T. (2009). Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *The Journal of experimental medicine*, 206(9), 2027–2035.
- Kippler, M., Ekström, E. C., Lönnerdal, B., Goessler, W., Akesson, A., El Arifeen, S., Persson, L. A., & Vahter, M. (2007). Influence of iron and zinc status on cadmium accumulation in Bangladeshi women. *Toxicology and applied pharmacology*, 222(2), 221–226.
- Kippler, M., Lönnerdal, B., Goessler, W., Ekström, E. C., Arifeen, S. E., & Vahter, M. (2009). Cadmium interacts with the transport of essential micronutrients in the mammary gland - a study in rural Bangladeshi women. *Toxicology*, 257(1-2), 64–69.
- Kippler, M., Nermell, B., Hamadani, J., Tofail, F., Moore, S., & Vahter, M. (2010). Burden of cadmium in early childhood: longitudinal assessment of urinary cadmium in rural Bangladesh. *Toxicology letters*, 198(1), 20–25.

- Kiremidjian-Schumacher, L., Stotzky, G., Dickstein, R. A., & Schwartz, J. (1981). Influence of cadmium, lead, and zinc on the ability of guinea pig macrophages to interact with macrophage migration inhibitory factor. *Environmental research*, 24(1), 106–116.
- Kirkham, S., Sheehan, J. K., Knight, D., Richardson, P. S., & Thornton, D. J. (2002). Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *The Biochemical journal*, 361(Pt 3), 537–546.
- Kirschvink, N., Martin, N., Fievez, L., Smith, N., Marlin, D., & Gustin, P. (2006). Airway inflammation in cadmium-exposed rats is associated with pulmonary oxidative stress and emphysema. *Free radical research*, 40(3), 241–250.
- Kirschvink, N., Vincke, G., Fiévez, L., Onclinx, C., Wirth, D., Belleflamme, M., Louis, R., Cataldo, D., Peck, M. J., & Gustin, P. (2005). Repeated cadmium nebulizations induce pulmonary MMP-2 and MMP-9 production and emphysema in rats. *Toxicology*, 211(1-2), 36–48.
- Kjellstrom, T. (1979). Exposure and accumulation of cadmium in populations from Japan, the United States, and Sweden. *Environmental health perspectives*, 28, 169–197.
- Klebanoff, S. J., Kettle, A. J., Rosen, H., Winterbourn, C. C., & Nauseef, W. M. (2013). Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *Journal of leukocyte biology*, 93(2), 185–198.
- Kluxen, F. M., Diel, P., Höfer, N., Becker, E., & Degen, G. H. (2013). The metalloenzyme cadmium modulates AhR-associated gene expression in the small intestine of rats similar to ethinyl-estradiol. *Archives of toxicology*, 87(4), 633–643.
- Knoflach, M., Messner, B., Shen, Y. H., Frotschnig, S., Liu, G., Pfaller, K., Wang, X., Matosevic, B., Willeit, J., Kiechl, S., Laufer, G., & Bernhard, D. (2011). Non-toxic cadmium concentrations induce vascular inflammation and promote atherosclerosis. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society*, 75(10), 2491–2495.
- Koeppen, M., McNamee, E. N., Brodsky, K. S., Aherne, C. M., Faigle, M., Downey, G. P., Colgan, S. P., Evans, C. M., Schwartz, D. A., & Eltzhig, H. K. (2013). Detrimental role of the airway mucin Muc5ac during ventilator-induced lung injury. *Mucosal immunology*, 6(4), 762–775.
- Korashy, H. M., & El-Kadi, A. O. (2004). Differential effects of mercury, lead and copper on the constitutive and inducible expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR)-regulated genes in cultured hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *Toxicology*, 201(1-3), 153–172.
- Korashy, H. M., & El-Kadi, A. O. (2005). Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 88(1), 39–51.
- Krocova, Z., Macela, A., Kroca, M., & Hernychova, L. (2000). The immunomodulatory effect(s) of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 14(1), 33–40.
- Kudo, N., Nakagawa, Y., & Waku, K. (1996). Biphasic effect of cadmium ions on the secretion of leukotriene B4 in rabbit alveolar macrophages. *Archives of toxicology*, 70(12), 801–808.
- Kundu, S., Sengupta, S., & Bhattacharyya, A. (2011). EGFR upregulates inflammatory and proliferative responses in human lung adenocarcinoma cell line (A549), induced by lower dose of cadmium chloride. *Inhalation toxicology*, 23(6), 339–348.
- Kundu, S., Sengupta, S., Chatterjee, S., Mitra, S., & Bhattacharyya, A. (2009). Cadmium induces lung inflammation independent of lung cell proliferation: a molecular approach. *Journal of inflammation (London, England)*, 6, 19.
- Kutzman, R. S., Drew, R. T., Shiotsuka, R. N., & Cockrell, B. Y. (1986). Pulmonary changes resulting from subchronic exposure to cadmium chloride aerosol. *Journal of toxicology and environmental health*, 17(2-3), 175–189.
- Lafuente, A., González-Carracedol, A., & Esquifino, A. I. (2004). Differential effects of cadmium on blood lymphocyte subsets. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 17(4), 451–456.



- Lag, M., Rodionov, D., Ovreivik, J., Bakke, O., Schwarze, P. E., & Refsnes, M. (2010). Cadmium-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: Expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages. *Toxicology letters*, *193*(3), 252–260.
- Lampe, B. J., Park, S. K., Robins, T., Mukherjee, B., Litonjua, A. A., Amarasinghwardena, C., Weisskopf, M., Sparrow, D., & Hu, H. (2008). Association between 24-hour urinary cadmium and pulmonary function among community-exposed men: the VA Normative Aging Study. *Environmental health perspectives*, *116*(9), 1226–1230.
- Larsen, E. H., Andersen, N. L., Moller, A., Petersen, A., Mortensen, G. K., & Petersen, J. (2002). Monitoring the content and intake of trace elements from food in Denmark. *Food additives and contaminants*, *19*(1), 33–46.
- Latge, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, *12*(2), 310–350.
- Latinwo, L. M., Ikediobi, C. O., Singh, N. P., Sponholtz, G., Fasanya, C., & Riley, L. (1997). Comparative studies of in vivo genotoxic effects of cadmium chloride in rat brain, kidney and liver cells. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, *43*(2), 203–210.
- Lauwerys, R., Buchet, J. P., Roels, H., & Bernard, A. (1982). La toxicité du cadmium: résumé d'études personnelles [Cadmium toxicity: summary of personal studies]. *Toxicological European research. Recherche europeenne en toxicologie*, *4*(1), 7–17.
- Leduc, D., de Francquen, P., Jacobovitz, D., Vandeweyer, R., Lauwerys, R., & De Vuyst, P. (1993). Association of cadmium exposure with rapidly progressive emphysema in a smoker. *Thorax*, *48*(5), 570–571.
- Lee, J., & Lim, K. T. (2011). Preventive effect of phytylglycoprotein (27 kDa) on inflammatory factors at liver injury in cadmium chloride-exposed ICR mice. *Journal of cellular biochemistry*, *112*(2), 694–703.
- Lee, K., Shen, X., & König, R. (2001). Effects of cadmium and vanadium ions on antigen-induced signaling in CD4(+) T cells. *Toxicology*, *169*(1), 53–65.
- Lee, M., Rey, K., Besler, K., Wang, C., & Choy, J. (2017). Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Results and problems in cell differentiation*, *62*, 181–207.
- Lehman, L. D., & Klaassen, C. D. (1986). Dosage-dependent disposition of cadmium administered orally to rats. *Toxicology and applied pharmacology*, *84*(1), 159–167.
- Lei, Y. X., Lu, Q., Shao, C., He, C. C., Lei, Z. N., & Lian, Y. Y. (2015). Expression profiles of DNA repair-related genes in rat target organs under subchronic cadmium exposure. *Genetics and molecular research: GMR*, *14*(1), 515–524.
- Levitz, S. M., & Diamond, R. D. (1985). A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *The Journal of infectious diseases*, *152*(5), 938–945.
- Li, H., Hong, W., Jin, X., Li, G., Zhou, G., & Fan, L. (2019). The aryl hydrocarbon receptor is a novel negative regulator of interleukin-17-mediated signaling and inflammation in vitro. *FEBS letters*, *593*(9), 952–961.
- Liao, Y., Chen, M., Hartmann, T., Yang, R. Y., & Liao, W. Q. (2013). Epidemiology of opportunistic invasive fungal infections in China: review of literature. *Chinese medical journal*, *126*(2), 361–368.
- Lide, D. R. (2005). Physical Constants of Organic Compounds. In: David R. Lide (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Liou, W., Chang, L. Y., Geuze, H. J., Strous, G. J., Crapo, J. D., & Slot, J. W. (1993). Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free radical biology & medicine*, *14*(2), 201–207.
- Littman, D. R., & Rudensky, A. Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, *140*(6), 845–858.
- Liu, L., Tao, R., Huang, J., He, X., Qu, L., Jin, Y., Zhang, S., & Fu, Z. (2015). Hepatic oxidative stress and inflammatory responses with cadmium exposure in male mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, *39*(1), 229–236.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.
- Lu, J., Jin, T., Nordberg, G., & Nordberg, M. (2005). Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes and renal dysfunction in a population environmentally exposed to cadmium. *Toxicology and applied pharmacology*, 206(2), 150–156.
- Lukačínová, A., Rácz, O., Lovásová, E., & Ništiar, F. (2011). Effect of lifetime low dose exposure to heavy metals on selected serum proteins of Wistar rats during three subsequent generations. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(6), 1747–1755.
- MacIntosh, D. L., Spengler, J. D., Ozkaynak, H., Tsai, L., & Ryan, P. B. (1996). Dietary exposures to selected metals and pesticides. *Environmental health perspectives*, 104(2), 202–209.
- Mackova, N. O., Leníková, S., Fedorocko, P., Brezáni, P., & Fedorocková, A. (1996). Effects of cadmium on haemopoiesis in irradiated and non-irradiated mice: 2. Relationship to the number of circulating blood cells and haemopoiesis. *Physiological research*, 45(2), 101–106.
- Mann, P. C., Vahle, J., Keenan, C. M., Baker, J. F., Bradley, A. E., Goodman, D. G., Harada, T., Herbert, R., Kaufmann, W., Kellner, R., Nolte, T., Rittinghausen, S., & Tanaka, T. (2012). International harmonization of toxicologic pathology nomenclature: an overview and review of basic principles. *Toxicologic pathology*, 40(4 Suppl), 7S–13S.
- Marklund, S. L., Bjelle, A., & Elmqvist, L. G. (1986). Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. *Annals of the rheumatic diseases*, 45(10), 847–851.
- Marklund, S. L., Holme, E., & Hellner, L. (1982). Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 126(1), 41–51.
- Marr, K. A., Carter, R. A., Crippa, F., Wald, A., & Corey, L. (2002). Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34(7), 909–917.
- Martin, Y. E., & Johnson, E. A. (2012). Biogeosciences survey: Studying interactions of the biosphere with the lithosphere, hydrosphere and atmosphere. *Progress in Physical Geography*, 36(6), 833–852.
- Masindi, V., & Muedi, K. L. (2018). Environmental contamination by heavy metals, in: Heavy Metals, Hosam El-Din M. Saleh and Refaat F. Aglan, IntechOpen.
- Matović, V., Buha, A., Bulat, Z., Đukić-Ćosić, D., Miljković, M., Ivanišević, J., & Kotur-Stevuljević, J. (2012). Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(3-4), 552–557.
- Matović, V., Buha, A., Đukić-Ćosić, D., & Bulat, Z. (2015). Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 78, 130–140.
- Mendez-Armenta, M., & Rios, C. (2007). Cadmium neurotoxicity. *Environmental toxicology and pharmacology*, 23(3), 350–358.
- Messner, B., & Bernhard, D. (2010). Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 23(5), 811–822.
- Messner, B., Türkcan, A., Ploner, C., Laufer, G., & Bernhard, D. (2016). Cadmium overkill: autophagy, apoptosis and necrosis signalling in endothelial cells exposed to cadmium. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 73(8), 1699–1713.
- Meyerholz, D. K., Suarez, C. J., Dintzis, S. M., Frevert, C. W. (2018). 9 - Respiratory System. In: Piper M. Treuting, Suzanne M. Dintzis, Kathleen S. Montine (Eds.), *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*, (pp.147-162). Academic Press.
- Mezynska, M., & Brzóska, M. M. (2018). Environmental exposure to cadmium-a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. *Environmental science and pollution research international*, 25(4), 3211–3232.

- Mirkov, I., Demenesku, J., Popov Aleksandrov, A., Ninkov, M., Glamoclija, J., Kataranovski, D., & Kataranovski, M. (2015). Strain differences in the immune mechanisms of resistance of immunocompetent rats to pulmonary aspergillosis. *Immunobiology*, 220(9), 1075–1084.
- Mirkov, I., Popov Aleksandrov, A., Ninkov, M., Tucovic, D., Kulas, J., Zeljkovic, M., Popovic, D., & Kataranovski, M. (2021). Immunotoxicology of cadmium: Cells of the immune system as targets and effectors of cadmium toxicity. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 149, 112026.
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, 247(10), 3170–3175.
- Mohammadi-Bardbori, A., Vikström Bergander, L., Rannug, U., & Rannug, A. (2015). NADPH Oxidase-Dependent Mechanism Explains How Arsenic and Other Oxidants Can Activate Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling. *Chemical research in toxicology*, 28(12), 2278–2286.
- Morales, A. I., Vicente-Sánchez, C., Sandoval, J. M., Egido, J., Mayoral, P., Arévalo, M. A., Fernández-Tagarro, M., López-Novoa, J. M., & Pérez-Barriocanal, F. (2006). Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 44(12), 2092–2100.
- Morselt, A. F., Leene, W., De Groot, C., Kipp, J. B., Evers, M., Roelofsen, A. M., & Bosch, K. S. (1988). Differences in immunological susceptibility to cadmium toxicity between two rat strains as demonstrated with cell biological methods. Effect of cadmium on DNA synthesis of thymus lymphocytes. *Toxicology*, 48(2), 127–139.
- Mostert, M. M. R., Ayoko, G. A., Kokot, S. (2010). Application of chemometrics to analysis of soil pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(5), 430–445.
- Müller, L., Abel, J., & Ohnesorge, F. K. (1986). 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*, 39(2), 187–195.
- Napolitano, J. R., Liu, M. J., Bao, S., Crawford, M., Nana-Sinkam, P., Cormet-Boyaka, E., & Knoell, D. L. (2012). Cadmium-mediated toxicity of lung epithelia is enhanced through NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional activation of the human zinc transporter ZIP8. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 302(9), L909–L918.
- National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services. Lung-Metaplasia Goblet Cell. <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/respiratory/lung/metapgc/index.htm>
- Nauseef, W. M. (2014). Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cellular microbiology*, 16(8), 1146–1155.
- Ninkov, M., Popov Aleksandrov, A., Demenesku, J., Mirkov, I., Mileusnic, D., Petrovic, A., Grigorov, I., Zolotarevski, L., Tolinacki, M., Kataranovski, D., Brceski, I., & Kataranovski, M. (2015). Toxicity of oral cadmium intake: Impact on gut immunity. *Toxicology letters*, 237(2), 89–99.
- Ninkov, M., Popov Aleksandrov, A., Mirkov, I., Demenesku, J., Mileusnic, D., Jovanovic Stojanov, S., Golic, N., Tolinacki, M., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Brceski, I., & Kataranovski, M. (2016). Strain differences in toxicity of oral cadmium intake in rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 96, 11–23.
- Nordberg, M., Nuottaniemi, I., Cherian, M. G., Nordberg, G. F., Kjellström, T., & Garvey, J. S. (1986). Characterization studies on the cadmium-binding proteins from two species of New Zealand oysters. *Environmental health perspectives*, 65, 57–62.
- Oberdörster, G. (1986). Airborne cadmium and carcinogenesis of the respiratory tract. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 12(6), 523–537.
- Odewumi, C., Latinwo, L. M., Sinclair, A., Badisa, V. L., Abdullah, A., & Badisa, R. B. (2015). Effect of cadmium on the expression levels of interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-10 cytokines in human lung cells. *Molecular medicine reports*, 12(5), 6422–6426.

- OECD Guideline for testing of chemicals (2018). The Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris, France, pp. 1-18.
- Oguma, T., Asano, K., Tomomatsu, K., Kodama, M., Fukunaga, K., Shiomi, T., Ohmori, N., Ueda, S., Takihara, T., Shiraiishi, Y., Sayama, K., Kagawa, S., Natori, Y., Lilly, C. M., Satoh, K., Makimura, K., & Ishizaka, A. (2011). Induction of mucin and MUC5AC expression by the protease activity of *Aspergillus fumigatus* in airway epithelial cells. *The Journal of Immunology*, *187*(2), 999-1005.
- Oh, C. M., Oh, I. H., Lee, J. K., Park, Y. H., Choe, B. K., Yoon, T. Y., & Choi, J. M. (2014). Blood cadmium levels are associated with a decline in lung function in males. *Environmental research*, *132*, 119–125.
- Ohsawa, M., Sato, K., Takahashi, K., & Ochi, T. (1983). Modified distribution of lymphocyte subpopulation in blood and spleen from mice exposed to cadmium. *Toxicology letters*, *19*(1-2), 29–35.
- Oladipo, O. G., Awotoye, O. O., Olayinka, A., Ezeokoli, O. T., Maboeta, M. S., & Bezuidenhout, C. C. (2016). Heavy metal tolerance potential of *Aspergillus* strains isolated from mining sites. *Bioremediation Journal*, *20*(4), 287-297.
- Olesen, K. L., Cerkez, V., & Tos, M. (1987). Quantitative features of goblet cells in the rat tracheobronchial tree. *Anatomischer Anzeiger*, *164*(5), 345–354.
- Olsen, G. W., Butenhoff, J. L., & Zobel, L. R. (2009). Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: an epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *27*(3-4), 212–230.
- Olsson, I. M., Bensryd, I., Lundh, T., Ottosson, H., Skerfving, S., & Oskarsson, A. (2002). Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects. *Environmental health perspectives*, *110*(12), 1185–1190.
- Olszowski, T., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Chlubek, D. (2012). Pro-inflammatory properties of cadmium. *Acta Biochimica Polonica*, *59*(4), 475-482.
- Ordonez, C. L., Khashayar, R., Wong, H. H., Ferrando, R., Wu, R., Hyde, D. M., Hotchkiss, J. A., Zhang, Y., Novikov, A., Dolganov, G., & Fahy, J. V. (2001). Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *163*(2), 517–523.
- Orisakwe, O. E. (2012). Other heavy metals: antimony, cadmium, chromium and mercury. In: F. Pacheco Torgal, S. Jalali, A. Fucic (Eds.), *Toxicity of Building Materials*. Portugal, Minho, Woodhead Publishing.
- Paakko, P., Kokkonen, P., Anttila, S., & Kalliomäki, P. L. (1989). Cadmium and chromium as markers of smoking in human lung tissue. *Environmental research*, *49*(2), 197–207.
- Paithankar, J. G., Saini, S., Dwivedi, S., Sharma, A., & Chowdhuri, D. K. (2021). Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. *Chemosphere*, *262*, 128350.
- Pappas, S., Ginsburg, H. P., & Jiang, M. (2003). SES differences in young children's metacognition in the context of mathematical problem solving. *Cognitive Development*, *18*(3), 431-450.
- Pari, L., & Shagirtha, K. (2012). Hesperetin protects against oxidative stress related hepatic dysfunction by cadmium in rats. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, *64*(5), 513–520.
- Pathak, N., & Khandelwal, S. (2007). Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Toxicology letters*, *169*(2), 95–108.
- Pathak, N., & Khandelwal, S. (2008). Impact of cadmium in T lymphocyte subsets and cytokine expression: differential regulation by oxidative stress and apoptosis. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, *21*(2), 179–187.
- Pattison, D. I., Davies, M. J., & Hawkins, C. L. (2012). Reactions and reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants: differential biological effects of hypochlorous and hypothiocyanous acids. *Free radical research*, *46*(8), 975–995.

- Paul, W. E., & Zhu, J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nature reviews. Immunology*, 10(4), 225–235.
- Pearson, C. A., Lamar, P. C., & Prozialeck, W. C. (2003). Effects of cadmium on E-cadherin and VE-cadherin in mouse lung. *Life sciences*, 72(11), 1303–1320.
- Piade, J. J., Jaccard, G., Dolka, C., Belushkin, M., & Wajrock, S. (2014). Differences in cadmium transfer from tobacco to cigarette smoke, compared to arsenic or lead. *Toxicology reports*, 2, 12–26.
- Pope, C. A., 3rd, Burnett, R. T., Thurston, G. D., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., & Godleski, J. J. (2004). Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*, 109(1), 71–77.
- Prankel, S. H., Nixon, R. M., & Phillips, C. J. (2005). Implications for the human food chain of models of cadmium accumulation in sheep. *Environmental research*, 97(3), 348–358.
- Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., & Woods, J. M. (2006). The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life sciences*, 79(16), 1493–1506.
- Radwan, M. A., & Salama, A. K. (2006). Market basket survey for some heavy metals in Egyptian fruits and vegetables. *Food and chemical toxicology*, 44(8), 1273–1278.
- Ragan, H. A. (1977). Effects of iron deficiency on the absorption and distribution of lead and cadmium in rats. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 90(4), 700–706.
- Rahman, M. T., Vandingenen, A., & De Ley, M. (2000). Metallothionein biosynthesis in human RBC precursors. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 10(4), 237–242.
- Ramirez, D. C., & Gimenez, M. S. (2003). Induction of redox changes, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by chronic cadmium exposure in mouse peritoneal macrophages. *Toxicology letters*, 145(2), 121–132.
- Ramirez, D. C., Martinez, L. D., Marchevsky, E., & Gimenez, M. S. (1999). Biphasic effect of cadmium in non-cytotoxic conditions on the secretion of nitric oxide from peritoneal macrophages. *Toxicology*, 139(1-2), 167–177.
- Rayner, B. S., Love, D. T., & Hawkins, C. L. (2014). Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells. *Free radical biology & medicine*, 71, 240–255.
- Rennolds, J., Malireddy, S., Hassan, F., Tridandapani, S., Parinandi, N., Boyaka, P. N., & Cormet-Boyaka, E. (2012). Curcumin regulates airway epithelial cell cytokine responses to the pollutant cadmium. *Biochemical and biophysical research communications*, 417(1), 256–261.
- Riemschneider, S., Herzberg, M., & Lehmann, J. (2015). Subtoxic Doses of Cadmium Modulate Inflammatory Properties of Murine RAW 264.7 Macrophages. *BioMed research international*, 2015, 295303.
- Rivera, A., Ro, G., Van Epps, H. L., Simpson, T., Leiner, I., Sant'Angelo, D. B., & Pamer, E. G. (2006). Innate immune activation and CD4+ T cell priming during respiratory fungal infection. *Immunity*, 25(4), 665–675.
- Robert, V. A., & Casadevall, A. (2009). Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. *The Journal of infectious diseases*, 200(10), 1623–1626.
- Rogalska, J., Pilat-Marcinkiewicz, B., & Brzóška, M. M. (2011). Protective effect of zinc against cadmium hepatotoxicity depends on this bioelement intake and level of cadmium exposure: a study in a rat model. *Chemico-biological interactions*, 193(3), 191–203.
- Rogers, D. F. (1994). Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. *The European respiratory journal*, 7(9), 1690–1706.
- Rogers, D. F. (2007). Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respiratory care*, 52(9), 1134–1149.
- Rowley, J., Namvar, S., Gago, S., Labram, B., Bowyer, P., Richardson, M. D., & Herrick, S. E. (2021). Differential Proinflammatory Responses to *Aspergillus fumigatus* by Airway Epithelial Cells In Vitro Are Protease Dependent. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(6), 468.

- Russell, W. M. S., & Burch, R. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, UK: Methuen.
- Sabolić, I., Breljak, D., Skarica, M., & Herak-Kramberger, C. M. (2010). Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biomaterials: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 23(5), 897–926.
- Sales-Campos, H., Tonani, L., Cardoso, C. R., & Kress, M. R. (2013). The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. *BioMed research international*, 2013, 693023.
- Santes-Palacios, R., Ornelas-Ayala, D., Cabañas, N., Marroquín-Pérez, A., Hernández-Magaña, A., Del Rosario Olguín-Reyes, S., Camacho-Carranza, R., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2016). Regulation of Human Cytochrome P4501A1 (hCYP1A1): A Plausible Target for Chemoprevention? *BioMed research international*, 2016, 5341081.
- Satarug, S., & Moore, M. R. (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental health perspectives*, 112(10), 1099–1103.
- Satarug, S., Baker, J. R., Reilly, P. E., Moore, M. R., & Williams, D. J. (2001). Changes in zinc and copper homeostasis in human livers and kidneys associated with exposure to environmental cadmium. *Human & experimental toxicology*, 20(4), 205–213.
- Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., & Sens, D. A. (2010). Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental health perspectives*, 118(2), 182–190.
- Satarug, S., Vesey, D. A., & Gobe, G. C. (2017a). Health Risk Assessment of Dietary Cadmium Intake: Do Current Guidelines Indicate How Much is Safe? *Environmental health perspectives*, 125(3), 284–288.
- Satarug, S., Vesey, D. A., & Gobe, G. C. (2017b). Current health risk assessment practice for dietary cadmium: Data from different countries. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 106(Pt A), 430–445.
- Saygi, S., Deniz, G., Kutsal, O., & Vural, N. (1991). Chronic effects of cadmium on kidney, liver, testis, and fertility of male rats. *Biological trace element research*, 31(3), 209–214.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75(2), 163–189.
- Sekine, H., Mimura, J., Oshima, M., Okawa, H., Kanno, J., Igarashi, K., Gonzalez, F. J., Ikuta, T., Kawajiri, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (2009). Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Molecular and cellular biology*, 29(24), 6391–6400.
- Seok, S. M., Park, D. H., Kim, Y. C., Moon, C. H., Jung, Y. S., Baik, E. J., Moon, C. K., & Lee, S. H. (2006). COX-2 is associated with cadmium-induced ICAM-1 expression in cerebrovascular endothelial cells. *Toxicology letters*, 165(3), 212–220.
- Shaikh, Z. A., & Smith, L. M. (1986). Biological indicators of cadmium exposure and toxicity. *Experientia. Supplementum*, 50, 124–130.
- Sharma, B., Singh, S., & Siddiqi, N. J. (2014). Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. *BioMed research international*, 2014, 640754.
- Sharma, R. K., Agrawal, M., & Marshall, F. M. (2009). Heavy metals in vegetables collected from production and market sites of a tropical urban area of India. *Food and chemical toxicology*, 47(3), 583–591.
- Sheppard, D. C., Marr, K. A., Fredricks, D. N., Chiang, L. Y., Doedt, T., & Filler, S. G. (2006). Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(4), 376–380.
- Sherwood, E. R., & Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology*, 18(3), 385–405.

- Sibilano, R., Frossi, B., Calvaruso, M., Danelli, L., Betto, E., Dall'Agnes, A., Tripodo, C., Colombo, M. P., Pucillo, C. E., & Gri, G. (2012). The aryl hydrocarbon receptor modulates acute and late mast cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *189*(1), 120–127.
- Singh, A., Sharma, R. K., Agrawal, M., & Marshall, F. M. (2010). Health risk assessment of heavy metals via dietary intake of foodstuffs from the wastewater irrigated site of a dry tropical area of India. *Food and chemical toxicology*, *48*(2), 611–619.
- Smith, T. J., Petty, T. L., Reading, J. C., & Lakshminarayan, S. (1976). Pulmonary effects of chronic exposure to airborne cadmium. *The American review of respiratory disease*, *114*(1), 161–169.
- Souza, V., Escobar Md, M., Gómez-Quiroz, L., Bucio, L., Hernández, E., Cossio, E. C., & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2004). Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology*, *197*(3), 213–228.
- Sovet, A. (1858). Empoisonnement par une poudre à récurer l'argenterie. *Presse Med Belge*, *10*, 69–71.
- Stejskalova, L., Dvorak, Z., & Pavek, P. (2011). Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Current drug metabolism*, *12*(2), 198–212.
- Stelzer, K. J., & Pazdernik, T. L. (1983). Cadmium-induced immunotoxicity. *International journal of immunopharmacology*, *5*(6), 541–548.
- Stosic, J., Mirkov, I., Belij, S., Nikolic, M., Popov, A., Kataranovski, D., & Kataranovski, M. (2010). Gender differences in pulmonary inflammation following systemic cadmium administration in rats. *Biomedical and environmental sciences: BES*, *23*(4), 293–299.
- Stuehler, C., Kuenzli, E., Jaeger, V. K., Baettig, V., Ferracin, F., Rajacic, Z., Kaiser, D., Bernardini, C., Forrer, P., Weisser, M., Elzi, L., Battegay, M., Halter, J., Passweg, J., & Khanna, N. (2015). Immune Reconstitution After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Association With Occurrence and Outcome of Invasive Aspergillosis. *The Journal of infectious diseases*, *212*(6), 959–967.
- Sugawara, N., & Sugawara, C. (1974). Cadmium accumulation in organs and mortality during a continued oral uptake. *Archives of toxicology*, *32*(4), 297–306.
- Sugiura, T., & Nakamura, H. (1994). Metallothionein in platelets. *International archives of allergy and immunology*, *103*(4), 341–348.
- Sundblad, B. M., Ji, J., Levänen, B., Midander, K., Julander, A., Larsson, K., Palmberg, L., & Lindén, A. (2016). Extracellular cadmium in the bronchoalveolar space of long-term tobacco smokers with and without COPD and its association with inflammation. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, *11*, 1005–1013.
- Surolia, R., Karki, S., Kim, H., Yu, Z., Kulkarni, T., Mirov, S. B., Carter, A. B., Rowe, S. M., Matalon, S., Thannickal, V. J., Agarwal, A., & Antony, V. B. (2015). Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against pulmonary endothelial cell death and development of emphysema in cadmium-treated mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, *309*(3), L280–L292.
- Szczyglowska, M., Konieczka, P., Namiesnik, J., Baczek-Kwinta, R., Antonkiewicz, J. (2011). Wykorzystanie kapusty bia lej (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) do fitoekstrakcji metali ciezkich (Zn, Cd, Cu, Pb) zgleby. *Nauka Przyroda Technologie*, *5*, 1–9.
- Szuster-Ciesielska, A., Lokaj, I., & Kandefer-Szerszeń, M. (2000). The influence of cadmium and zinc ions on the interferon and tumor necrosis factor production in bovine aorta endothelial cells. *Toxicology*, *145*(2-3), 135–145.
- Takenaka, S., Oldiges, H., König, H., Hochrainer, D., & Oberdörster, G. (1983). Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in W rats. *Journal of the National Cancer Institute*, *70*(2), 367–373.
- Tanaka, Y., Uchi, H., Hashimoto-Hachiya, A., & Furue, M. (2018). Tryptophan Photoproduct FICZ Upregulates IL1A, IL1B, and IL6 Expression via Oxidative Stress in Keratinocytes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2018*, 9298052.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Experientia supplementum* (2012), *101*, 133–164.

- Theocharis, S. E., Souliotis, V. L., Panayiotidis, P. G. (1994). Suppression of interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  biosynthesis by cadmium in in vitro activated human peripheral blood mononuclear cells. *Archives of Toxicology*, 69(2), 132-136.
- Theron, A.J., Tintinger, G.R., Anderson, R. (2012). Harmful interactions of non-essential heavy metals with cells of the innate immune system. *Journal of Clinical Toxicology*, 3, 1–10.
- Thevenod, F., & Lee, W. K. (2013). Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs. *Metal ions in life sciences*, 11, 415–490.
- Thomas, K. W., Pellizzari, E. D., & Berry, M. R. (1999). Population-based dietary intakes and tap water concentrations for selected elements in the EPA region V National Human Exposure Assessment Survey (NHEXAS). *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology*, 9(5), 402–413.
- Townshend, R. H. (1982). Acute cadmium pneumonitis: a 17-year follow-up. *British journal of industrial medicine*, 39(4), 411–412.
- Tracey, K. J. (2002). The Inflammatory Reflex. *Nature* 420 (6917), 853–859.
- Tucovic, D., Mirkov, I., Kulas, J., Zeljkovic, M., Popovic, D., Zolotarevski, L., Djurdjic, S., Mutic, J., Kataranovski, M., & Popov Aleksandrov, A. (2020). Dermatotoxicity of oral cadmium is strain-dependent and related to differences in skin stress response and inflammatory/immune activity. *Environmental toxicology and pharmacology*, 75, 103326.
- Tucovic, D., Popov Aleksandrov, A., Mirkov, I., Ninkov, M., Kulas, J., Zolotarevski, L., Vukojevic, V., Mutic, J., Tatalovic, N., & Kataranovski, M. (2018). Oral cadmium exposure affects skin immune reactivity in rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 164, 12–20.
- Tully, D. B., Collins, B. J., Overstreet, J. D., Smith, C. S., Dinse, G. E., Mumtaz, M. M., & Chapin, R. E. (2000). Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 168(2), 79–90.
- Turley, A. E., Zagorski, J. W., Kennedy, R. C., Freeborn, R. A., Bursley, J. K., Edwards, J. R., & Rockwell, C. E. (2019). Chronic low-level cadmium exposure in rats affects cytokine production by activated T cells. *Toxicology research*, 8(2), 227–237.
- Vahter, M., Akesson, A., Lidén, C., Ceccatelli, S., & Berglund, M. (2007). Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environmental research*, 104(1), 85–95.
- Verougstraete, V., Lison, D., & Hotz, P. (2003). Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 6(3), 227–255.
- Villacara, A., Kumami, K., Yamamoto, T., Mrsulja, B. B., & Spatz, M. (1989). Ischemic modification of cerebrocortical membranes: 5-hydroxytryptamine receptors, fluidity, and inducible in vitro lipid peroxidation. *Journal of neurochemistry*, 53(2), 595–601.
- Villanueva M. B. G., Koizumi, S., & Jonai, H. (2000). Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells after exposure to heavy metals. *Journal of health science*, 46(5), 358-362.
- Waalkes, M. P. (2000). Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of inorganic biochemistry*, 79(1-4), 241–244.
- Wagstaff, D. D. (1973). Stimulation of liver detoxication enzymes by dietary cadmium acetate. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 10(6), 328–332.
- Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., Peakall, D. B. (2012). Principles of Ecotoxicology. Group, T. And F., Ed.; 4th Edition, CRC Press.
- Wang, C., Wei, Z., Han, Z., Wang, J., Zhang, X., Wang, Y., Liu, Q., & Yang, Z. (2019). Neutrophil extracellular traps promote cadmium chloride-induced lung injury in mice. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 254(Pt A), 113021.
- Wang, H., Zhu, G., Shi, Y., Weng, S., Jin, T., Kong, Q., & Nordberg, G. F. (2003). Influence of environmental cadmium exposure on forearm bone density. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18(3), 553–560.



- Wang, J., Zhang, H., Zhang, T., Zhang, R., Liu, R., & Chen, Y. (2015). Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. *International journal of biological macromolecules*, 77, 59–67.
- Wang, J., Zhu, H., Liu, X., & Liu, Z. (2014). Oxidative stress and Ca<sup>(2+)</sup> signals involved on cadmium-induced apoptosis in rat hepatocyte. *Biological trace element research*, 161(2), 180–189.
- Webster, J. (1994). *Animal Welfare: A Cool Eye Towards Eden*. Assessment of animal welfare: The five freedoms, (pp.10–14). Oxford, UK: Blackwell Science.
- Webster, J. (2005). *Animal Welfare: Limping Towards Eden*. Chichester, UK: Wiley-Blackwell.
- Weisiger, R. A., & Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *The Journal of biological chemistry*, 248(13), 4793–4796.
- Wincent, E., Bengtsson, J., Mohammadi Bardbori, A., Alsberg, T., Luecke, S., Rannug, U., & Rannug, A. (2012). Inhibition of cytochrome P4501-dependent clearance of the endogenous agonist FICZ as a mechanism for activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), 4479–4484.
- Winiarska-Mieczan, A. (2014). Cumulative rate and distribution of Cd and Pb in the organs of adult male Wistar rats during oral exposure. *Environmental toxicology and pharmacology*, 38(3), 751–760.
- Wong, P. S., Vogel, C. F., Kokosinski, K., & Matsumura, F. (2010). Arylhydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 42(2), 210–217.
- Wu, J. P., Chang, L. W., Yao, H. T., Chang, H., Tsai, H. T., Tsai, M. H., Yeh, T. K., & Lin, P. (2009). Involvement of oxidative stress and activation of aryl hydrocarbon receptor in elevation of CYP1A1 expression and activity in lung cells and tissues by arsenic: an in vitro and in vivo study. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 107(2), 385–393.
- Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., & Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental science and pollution research international*, 23(9), 8244–8259.
- Xiong, R., Wu, Q., Trbojevich, R., Muskhelishvili, L., Davis, K., Bryant, M., Richter, P., & Cao, X. (2019). Disease-related responses induced by cadmium in an in vitro human airway tissue model. *Toxicology letters*, 303, 16–27.
- Xu, S., Pi, H., Chen, Y., Zhang, N., Guo, P., Lu, Y., He, M., Xie, J., Zhong, M., Zhang, Y., Yu, Z., & Zhou, Z. (2013). Cadmium induced Drp1-dependent mitochondrial fragmentation by disturbing calcium homeostasis in its hepatotoxicity. *Cell death & disease*, 4(3), e540.
- Yamada, H., Damiano, V. V., Tsang, A. L., Meranze, D. R., Glasgow, J., Abrams, W. R., & Weinbaum, G. (1982). Neutrophil degranulation in cadmium-chloride-induced acute lung inflammation. *The American journal of pathology*, 109(2), 145–156.
- Yang, G., Sun, T., Han, Y. Y., Rosser, F., Forno, E., Chen, W., & Celedón, J. C. (2019). Serum Cadmium and Lead, Current Wheeze, and Lung Function in a Nationwide Study of Adults in the United States. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*, 7(8), 2653–2660.e3.
- Yang, Z., Yang, S., Qian, S. Y., Hong, J. S., Kadiiska, M. B., Tennant, R. W., Waalkes, M. P., & Liu, J. (2007). Cadmium-induced toxicity in rat primary mid-brain neuroglia cultures: role of oxidative stress from microglia. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 98(2), 488–494.
- Yazihan, N., Koçak, M. K., Akçıl, E., Erdem, O., Sayal, A., Güven, C., & Akyürek, N. (2011). Involvement of galectin-3 in cadmium-induced cardiac toxicity. *Anadolu kardiyoloji dergisi: AKD = the Anatolian journal of cardiology*, 11(6), 479–484.
- Young, H. W., Williams, O. W., Chandra, D., Bellinghausen, L. K., Pérez, G., Suárez, A., Tuvim, M. J., Roy, M. G., Alexander, S. N., Moghaddam, S. J., Adachi, R., Blackburn, M. R., Dickey, B. F., & Evans, C. M. (2007). Central role of Muc5ac expression in mucous metaplasia and its

- regulation by conserved 5' elements. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 37(3), 273–290.
- Yusuf, A. A., Arowolo, T. A., & Bamgbose, O. (2003). Cadmium, copper and nickel levels in vegetables from industrial and residential areas of Lagos City, Nigeria. *Food and chemical toxicology*, 41(3), 375–378.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine*, 33(3), 337–349.
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*, 35(2), 161–168.
- Zhang, S., Hao, S., Qiu, Z., Wang, Y., Zhao, Y., Li, Y., Gao, W., Wu, Y., Liu, C., Xu, X., & Wang, H. (2019). Cadmium disrupts the DNA damage response by destabilizing RNF168. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 133, 110745.
- Zhang, Y., Yu, X., Sun, S., Li, Q., Xie, Y., Li, Q., Zhao, Y., Pei, J., Zhang, W., Xue, P., Zhou, Z., & Zhang, Y. (2016). Cadmium modulates hematopoietic stem and progenitor cells and skews toward myelopoiesis in mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 313, 24–34.
- Zhao, Z., Hyun, J. S., Satsu, H., Kakuta, S., & Shimizu, M. (2006). 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*, 164(2), 144–154.
- Zheng, N., Wang, Q., & Zheng, D. (2007a). Health risk of Hg, Pb, Cd, Zn, and Cu to the inhabitants around Huludao Zinc Plant in China via consumption of vegetables. *The Science of the total environment*, 383(1-3), 81–89.
- Zheng, N., Wang, Q., Zhang, X., Zheng, D., Zhang, Z., & Zhang, S. (2007b). Population health risk due to dietary intake of heavy metals in the industrial area of Huludao City, China. *The Science of the total environment*, 387(1-3), 96–104.
- Zhong, Z. J., Troll, W., Koenig, K. L., & Frenkel, K. (1990). Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer research*, 50(23), 7564–7570.
- Zoller, H., Koch, R. O., Theurl, I., Obrist, P., Pietrangelo, A., Montosi, G., Haile, D. J., Vogel, W., & Weiss, G. (2001). Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology*, 120(6), 1412–1419.
- Zordoky, B. N., & El-Kadi, A. O. (2009). Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes. *Current drug metabolism*, 10(2), 164–178.

## BIOGRAFIJA

Jelena B. Kulaš rođena je 1986. godine u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2005/2006. godine, na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija. Fakultet je završila u junu 2016. godine, sa prosečnom ocenom 8.94 i diplomskim radom pod nazivom „Gonadotropne ćelije hipofize pacova nakon traumatske povrede mozga” sa ocenom 10. Doktorske studije upisala je školske 2016/2017. godine na modulu Imunobiologija, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,xx. Od 10.01.2018. godine, Jelena je zaposlena na Odeljenju za ekologiju, Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković”-Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, gde je volontirala od oktobra 2016. godine do zasnivanja radnog odnosa. Zvanje istraživač pripravnik stiče u martu 2018. godine. Zvanje istraživač saradnik stiče u novembru 2020. godine. Jelena je do sada bila autor/koautor na 9 radova u časopisima međunarodnog značaja, ima tri saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i dva saopštenja na skupovima nacionalnog značaja. Iz doktorske disertacije proistekla su tri rada, u časopisima M21, M22 i M23 kategorije. Od 2019. godine, Jelena je aktivni član Društva imunologa Srbije.