



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU

Renata Kovač

**UTICAJ SUBHRONIČNOG TRETMANA AKRILAMIDOM NA
HISTOLOŠKE I BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE JETRE
JUVENILNIH MUŽJAKA PACOVA**

- doktorska disertacija -

Novi Sad, 2016. godina

Zahvaljujem se...

dr Milici Matavulj, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, koja je zaslužna za moj prvi susret i upoznavanje sa Histologijom. Svojim znanjem, bogatim iskustvom, pristupom punim razumevanja i podrškom, koja nikada nije izostajala, pružila mi je dragocenu pomoć i bila moj oslonac. Njoj dugujem što je Vesnin i moj posao, uprkos svemu, priveden kraju.

dr Vesni Rajković, kolegici i iskrenom prijatelju, čiji su mi profesionalni stav i mišljenje oduvek bili važni. Njeno znanje, sugestije, energičan pristup i nesebična podrška bili su ključna okosnica za moj naučno-istraživački rad, kao i za izradu ove doktorske disertacije. Bilo je zadovoljstvo poznavati je i imati za saradnika i prijatelja.

Kolegicama Željki Silađev na pomoći prilikom laboratorijskog rada, prenesenim znanjima i veštinama, i Ivani Koledin na sveprisutnoj podršci u svim situacijama i izazovima koji su nailazili.

Hvala svim mojim prijateljima koji su verovali u mene i bili moja ogromna podrška. Učinili su me svesnom koliko je važno biti okružen pravim i iskrenim osobama.

Hvala svim profesorima, kolegama i saradnicima, koji su na bilo koji način pružili podršku i doprineli da ova doktorska disertacija poprimi svoju finalnu formu.

Konačno, najveću zahvalnost dugujem članovima svoje najuže porodice, koji su mi oduvek pružali neograničenu ljubav, bili oslonac i glavno uporište moje snage. Hvala na bezuslovnoj podršci i ogromnom razumevanju. Ovu doktorsku disertaciju namenjujem njima u znak moje zahvalnosti i svega što mi oni znače!

Novi Sad, 29. februar 2016. godine

Renata Kovač

SADRŽAJ

POGLAVLJE	STRANA
I UVOD	1
I 1.1. Jetra	1
1.1.1 Embrionalni razvoj	1
1.1.2 Anatomija	2
1.1.3 Histologija	4
1.1.4 Osnovni tipovi ćelijskih populacija	11
1.1.5 Žučni putevi	18
1.1.6 Vaskularizacija	19
1.1.7 Limfni sistem	20
1.1.8 Inervacija	20
1.1.9 Funkcija	21
1.2. Akrilamid	24
1.2.1 Fizičko-hemijska svojstva	24
1.2.2 Primena	25
1.2.3 Spontano formiranje akrilamida u hrani	26
1.3. Izloženost akrilamidu	28
1.3.1 Radna sredina kao izvor akrilamida	28
1.3.2 Akrilamid u životnoj sredini	29
1.3.3 Akrilamid u hrani	30
1.3.4 Strategije za redukovanje količine akrilamida u hrani	33
1.4. Apsorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija akrilamida	35
1.4.1 Apsorpcija i distribucija	35
1.4.2 Metabolizam	37
1.4.3 Eliminacija	42
1.5. Biomarkeri izloženosti akrilamidu	44
1.6. Štetni efekti akrilamida	47
1.6.1 Stavovi relevantnih svetskih organizacija o štetnosti akrilamida	49
1.6.2 Interakcija akrilamida sa komponentama živog sistema	52
1.6.3 Neurotoksičnost	53
1.6.4 Kancerogenost	58
1.6.5 Genotoksičnost	66
1.6.6 Reproduktivna toksičnost	71
1.6.7 Hepatotoksičnost	74
II CILJEVI ISTRAŽIVANJA	79

III	MATERIJAL I METODE	80
	3.1 Eksperimentalne životinje	80
	3.2 Eksperimentalni protokol	80
	3.3 Uzorkovanje biološkog materijala za histološke i serološke analize	81
	3.4 Histohemijske i imunohistohemijske metode	81
	<i>Histohemijske metode</i>	82
	<i>Imunohistohemijske metode</i>	84
	3.5 Histološka i stereološka analiza	86
	<i>Opšta mikrostruktura jetre</i>	87
	<i>Glikogen</i>	87
	<i>Mastociti</i>	88
	<i>Proliferativne karakteristike hepatocita</i>	88
	<i>Apoptotičke karakteristike hepatocita</i>	89
	<i>Kupffer-ovih ćelije</i>	89
	3.6 Serološke analize	90
	3.7 Telesne mase životinja	90
	3.8 Statistička analiza	90
IV	REZULTATI	92
	4.1 Opšta mikroanatomska građa	92
	4.2 Količina glikogena	97
	4.3 Proliferativne karakteristike hepatocita	105
	4.4 Apoptotičke karakteristike hepatocita	110
	4.5 Kupffer-ove ćelije	115
	4.6 Mastociti	118
	4.7 Serološke analize	125
	4.8 Telesne mase životinja	129
V	DISKUSIJA	131
VI	ZAKLJUČCI	156
VII	LITERATURA	160
VIII	LISTA SKRAĆENICA	191

Uvod

1.1. JETRA

Jetra (lat. *hepar*) predstavlja najveću žlezdu, a posle kože, i drugi najveći organ u organizmu (Anđelković i sar., 2001; Standring, 2008). Smeštena je u gornjem desnom kvadrantu abdominalne duplje, ispod dijafragme. Spada u grupu žlezda pridodatih digestivnom traktu, zajedno sa pljuvačnim žlezdama, pankreasom i žučnom kesom (Anđelković i sar., 2001).

Jetra se kao organ karakteriše velikom funkcionalnom heterogenošću koja podrazumeva endokrinu i egzokrinu funkciju (Rhoades i Tanner, 2003; Krause, 2005). Ona je glavno mesto odvijanja najvećeg broja metaboličkih procesa važnih za održavanje homeostaze organizma, počevši od procesa koji imaju nutritivnu vrednost za organizam, pa do reakcija imunog odgovora (Standring, 2008). Ima izuzetnu sposobnost regeneracije (Michalopoulos, 2007), a kod fetusa služi i kao hematopoezni organ (Standring, 2008).

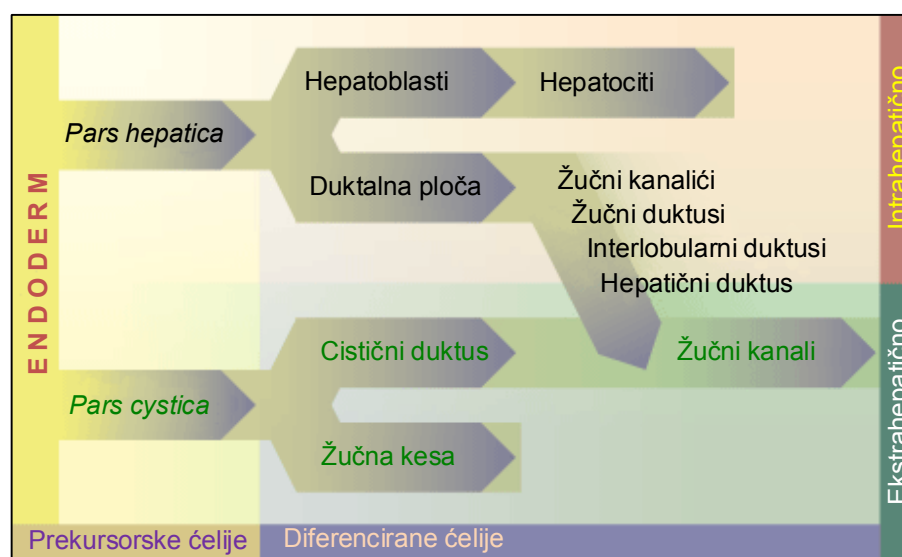
Na svežem preseku, unutrašnjost jetre je intenzivno crveno-braon boje, ali njena nijansa može varirati u zavisnosti od prisustva masnoća (Standring, 2008). Veličina jetre zavisi od pola, starosti i veličine samog organizma, a težina se menja tokom života, pa tako čini oko 5% ukupne telesne mase u detinjstvu, da bi u odraslom dobu činila oko 2% telesne mase (Standring, 2008). Kod odraslog čoveka, njena prosečna težina se kreće između 1.200-1.500 g (Dooley i sar., 2011).

1.1.1 Embrionalni razvoj

Jetra, odnosno njen parenhim (hepatociti) i ćelije izvodnih kanala (žučni putevi), su derivati endoderma i nastaju proliferacijom epitela digestivne cevi (Sadler, 2010; Dooley i sar., 2011). Kod čoveka, sredinom treće nedelje embrionalnog razvoja, na distalnom kraju prednjeg creva dolazi do stvaranja hepatopankreatičnog pupoljka. Proliferacijom endodermalnih ćelija prednjeg creva (duodenuma) dolazi do formiranja jetrinog divertikuluma odnosno, pupoljka (Sadler, 2010; Anđelković i sar., 2001; Dooley i sar., 2011). Jetrin pupoljak se potom deli na *pars hepatica* i *pars cystica* (Sl. 1.1.1).

Pars hepatica sadrži bipotentne progenitor ćelije koje se mogu diferencirati ili u hepatocite ili u ćelije izvodnih kanala, koje će dati intrahepatične izvodne kanale (Dooley i sar., 2011). *Pars cystica* se nalazi između hepatičnog dela pupoljka i duodenuma, i od njega će nastati žučna kesica i ekstrahepatični žučni kanali (Sl. 1.1.1) (Dooley i sar., 2011).

Ćelije endoderma pupoljka proliferacijom prodiru kroz susedno mezodermalno tkivo, odnosno, *septum transversum* (mezodermalna ploča između perikardijalne duplje i žumančane kese), nailaze na kapilani splet žumančanih i pupčanih vena, što će kasnije rezultirati formiranjem jetrinih sinusoida (Dooley i sar., 2011). Vezivno tkivo portalnih trijada se formira od mezoderma *septuma transversuma*. Kupffer-ove ćelije vode poreklo od cirkulišućih monocita, dok se za perisinusoidne (stelatne, Ito) ćelije pretpostavlja da su mezodermalni derivati submezotelijalnih ćelija lokalizovanih ispod površine jetre (Dooley i sar., 2011).



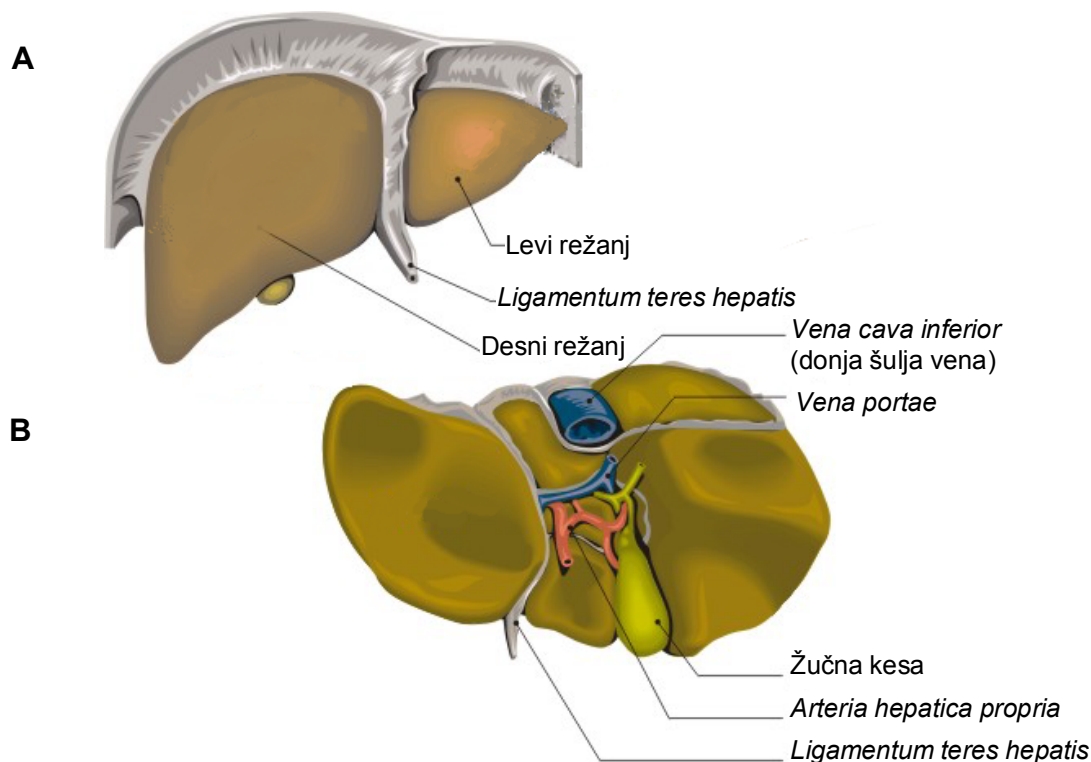
Slika 1.1.1. Dijagram embrionalnog razvoja jetre. (Preuzeto uz modifikacije: www.embryology.ch)

1.1.2 Anatomija

Površina jetre je obavijena fibroznom, Glisson-ovom, kapsulom, a na njenu površinu nalaže visceralni list peritoneuma, izuzev na mestima gde je kapsula fiksirana za abdominalni zid i susedne organe (Anđelković i sar., 2001).

Kod čoveka, jetra je levom sagitalnom fissurom i *ligamentumom falciforme* podeljena na dva velika i nejednaka *lobusa*, tj. reznja: levi, koji je manji i desni, koji je i do šest puta veći (Sl. 1.1.2) (Standring, 2008; Dooley i sar., 2011). U okviru desnog lobusa se mogu razlikovati još dva dodatna (akcesorna) lobusa: kvadratni (*lobus quadratus*) i kaudalni (*lobus caudatus*), a definiše ih region između leve i desne sagitalne fissure i *portae hepatis*. Pomenuti akcesorni lobusi se koriste sekundarno za opis unutrašnje arhitekture jetre.

Sa donje strane jetre nalazi se hilus ili *porta hepatis*. U ovom regionu smešteni su: portna vena (*vena portae*), hepatična arterija (*arteria hepatica propria*) i žučni kanal (Sl. 1.1.2). Vena i arterija, zajedno sa pratećim nervima, ulaze u jetru, dok žučni kanal i propratni limfni sudovi izlaze iz nje (Anđelković i sar., 2001).



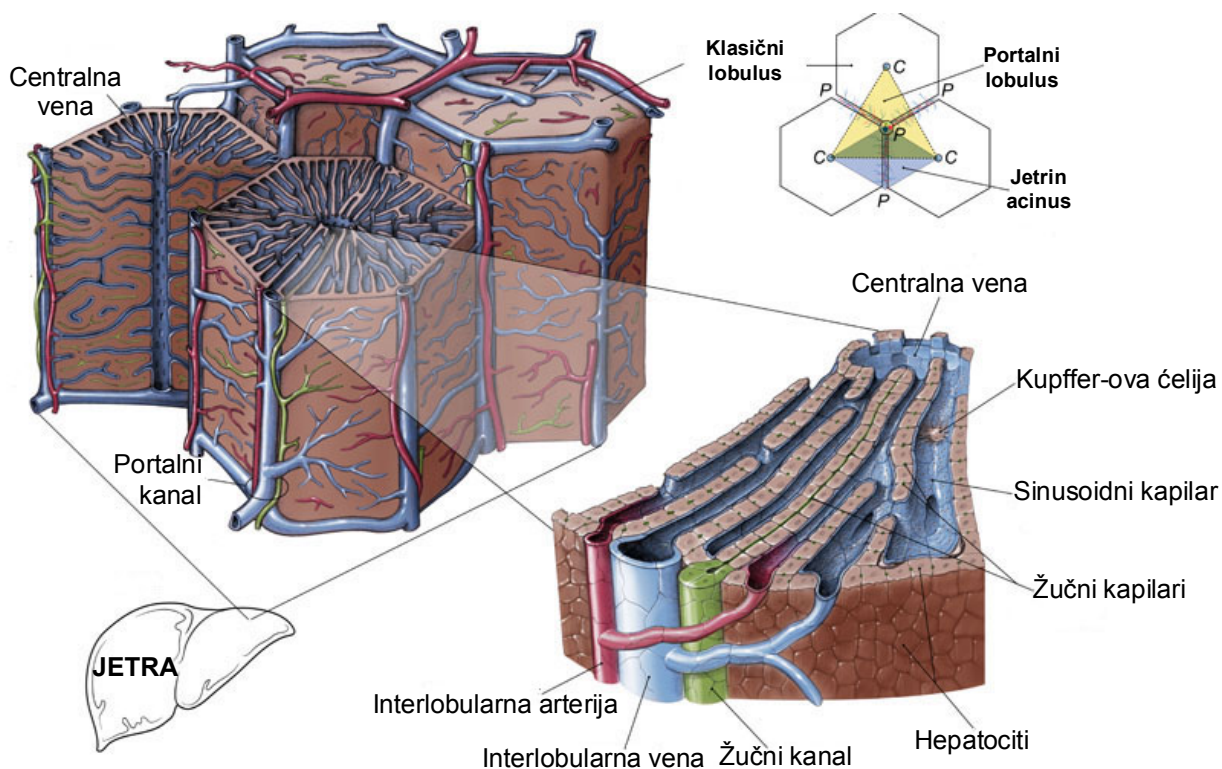
Slika 1.1.2. Shematski prikaz anatomske građe jetre. (A) Ventralna strane jetre. Leva sagitalna fissura (i *ligamentum falciforme*) odvajaju desni i levi režanj. Ligamentum teres hepatis predstavlja ostatak fetalne umbilikalne vene. (B) Dorzalna strana jetre. Region hilusa sa krvnim sudovima i žučnom kesom. (Preuzeto uz modifikacije: www.healthype.com)

Jetra pacova i miševa ima četiri lobusa: srednji, levi, desni i kaudalni, pri čemu se svi, sem levog, dalje dele na dva ili više manjih segmenata (Harada i sar., 1999; Kogure i sar., 1999). Lobusi jetre pacova pokazuju sličnost u fundamentalnom portalnom i venoznom sistemu sa ljudskim, što ih čini međusobno komparabilnim (Kogure i sar., 1999). Važna karakteristika vezana za pacove je da oni nemaju žučnu bešiku, dok je ona kod ljudi i miševa prisutna (Kogure i sar., 1999).

1.1.3 Histologija

Svaki jetrin lobus je dalje podeljen na manje *lobuluse*, odnosno režnjiće, koji se smatraju glavnom strukturnom i funkcionalnom jedinicom ovog organa (Rhoades i Tanner, 2003). Ujedno, lobulus se uzima i kao osnovna jedinica histološke građe jetre.

Jetrin lobulus je moguće opisati na tri načina, i to kao: klasični lobulus, portalni lobulus i jetrin acinus, u zavisnosti od posmatranja njegovog funkcionalnog aspekta (Sl. 1.1.3) (Anđelković i sar., 2001). Međutim, bez obzira na način opisivanja, kod svakog se kao glavne strukturne komponente navode: parenhimske ćelije (hepatociti), vezivno-vaskularna stroma (sačinjena iz krvnih i limfnih sudova, nerava i žučnih kanala), mreža sinusoidnih kapilara, Kupffer-ove ćelije i perisinusoidne (stelatne ili Ito) ćelije (Anđelković i sar., 2001).



Slika 1.1.3. Lobularna organizacija jetre: građa lobusa i lobulusa, sa Remak-ovim gredicama i sinusoidnim prostorima. Modeli lobulusa su predstavljeni dijagramom: bezbojno polje (klasični lobulus), žuto polje (portalni lobulus), plavo polje (jetrin acinus), zeleno polje (zajednički deo lobulusa kod sva tri modela); C-centralna vena, P-portalni kanal (Preuzeto uz modifikacije: www.illuminationstudios.com).

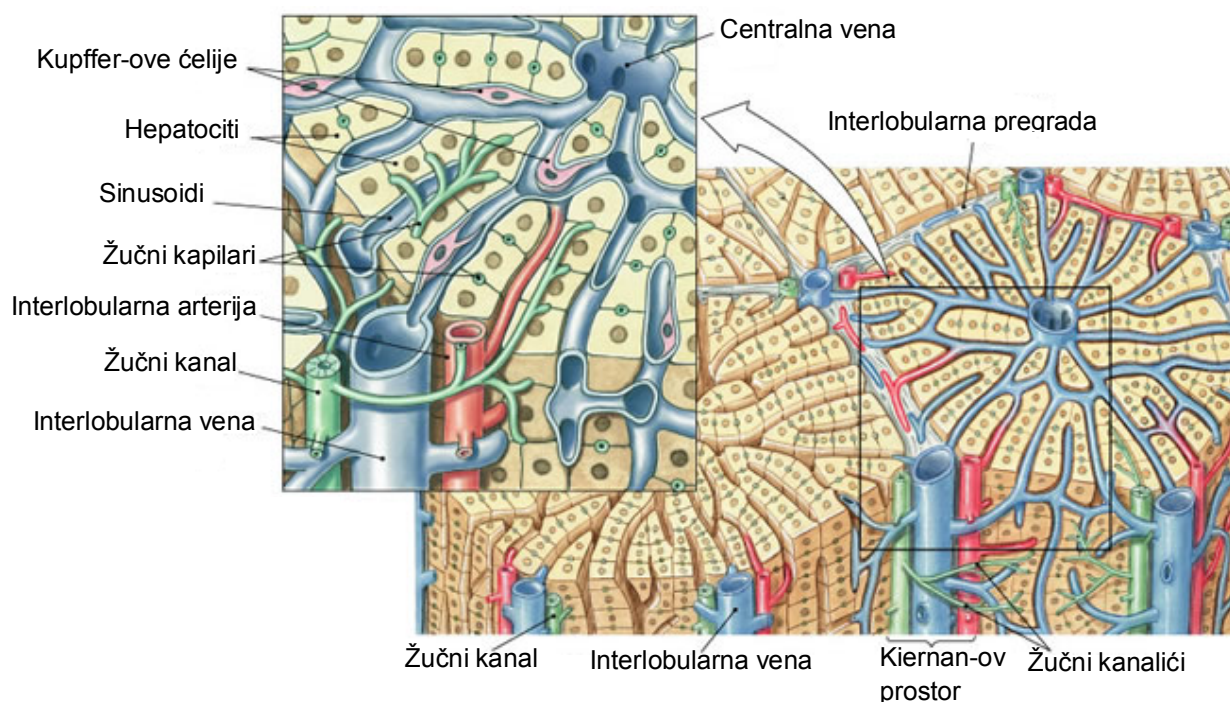
Klasični lobulus je najčešće korišćen model za opis morfoloških i funkcionalnih svojstava jetre, a predložio ga je Kiernan, 1933. godine. Ipak, koncept klasičnog lobulusa najpogodniji je za razumevanje vaskularne mreže, odnosno toka krvi u lobulusu. Procenjuje se da u jetri postoji oko 1.000.000 ovakvih lobulusa. Morfološki, klasični jetrin lobulus ima formu nepravilne poliedarne prizme, dimenzija oko 0,7 x 2 mm (Anđelković i sar., 2001), a čine ga (Sl. 1.1.4):

1. **Vena centralis** ili centralna vena - u središnjem delu lobulusa
2. **Remak-ove gredice** ili *laminae hepatis* - izgrađene iz jednog ili dva sloja hepatocita, prostiru se radijalno od centra ka periferiji, pri čemu se često granaju i međusobno spajaju, pa nemaju formu potpuno pravilnih gredica
3. **Jetrini sinusoidi** – između Remak-ovih gredica, predstavljaju kapilare sinusoidnog (diskontinuiranog) tipa, čije zidove oblažu endotelne ćelije; u lumenu sinusoida prisutne su Kupffer-ove ćelije, čija je specifičnost da zajedno sa endotelnim ćelijama učestvuju u izgradnji *tunicae intime* zida kapilara; svaki lobulus ima razvijen lavirint sinusoidnih prostora koji je definisan i ograničen Remak-ovim gredicama
4. **Perisinusoidni (Disse-ovi) prostori** – prisutni između hepatocita i sinusoidnih kapilara, u njima su smeštene perisinusoidne (stalatne ili Ito) ćelije, a ograničeni su bazalnim membranama hepatocita i bazalnim membranama endotelnih ćelija; u ove prostore se cedi krvna plazma, čime se obezbeđuje razmena materija između krvi i hepatocita; tečnost koja se drenira u ovim prostorima je ekvivalent limfnoj tečnosti, i smatra se da ona čini najveći deo limfe koja se stvara u jetri; na nivou Disse-ovih prostora se ostvaruje endokrina funkcija jetre pošto hepatociti sekretuju proteine i lipoproteine u plazmu, kao i preuzimanje različitih materija iz krvi za njihovu dalju biorazgradnju; u fetusnoj jetri se na nivou Disse-ovih prostora odvija hematopoeza
5. **Granična ploča** – izgrađena iz jednog reda hepatocita na samoj periferiji lobulusa; ovi hepatociti formiraju spoljašnju površinu koja graniči i odvaja svaki pojedinačni lobulus od susednih, kao i od okolnog veziva; granična ploča nije kompaktna, na njenoj površini postoje brojne perforacije (otvori) kroz koje krvni sudovi ulaze u lobulus
6. **Kiernan-ov prostor** ili **portalni kanal** - nalazi se na mestu susticanja tri susedna lobulusa i čini ga portalna trijada: interlobularna arterija (*arteria interlobularis*) i vena (*vena interlobularis*), žučni kanal (*ductus biliferus*) i okolno vezivno tkivo. Ovde su takođe prisutni limfni sudovi i nervi, koji prate krvne sudove.

7. **Žučni kapilari** – formiraju se spajanjem membrana dva susedna hepatocita u okviru Remak-ove gredice
8. Svaki lobulus je obavijen tankim slojem **retikularnog vezivnog tkiva** (kolagen tipa III)

Na histološkim presecima jetre, lobulusi najčešće imaju izgled relativno pravilnih, poligonalnih struktura sa 5 do 6 strana, a na svakoj od strana uočavaju se komponente portalnog kanala (Anđelković i sar., 2001).

Zavisno od vrste organizma, granice između lobulusa mogu biti više ili manje jasno uočljive (Anđelković i sar., 2001). Tako se na preparatima jetre čoveka ili pacova njihove granice teže uočavaju, obzirom da je vezivno tkivo između dva susedna lobulusa oskudno. Nasuprot njima, kod svinje su, zahvaljujući dobroj zastupljenosti interlobularnog veziva, njihove granice jasno definisane.



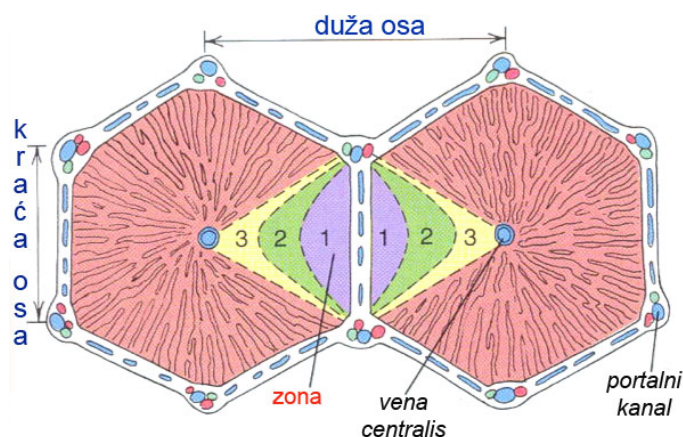
Slika 1.1.4. Shema građe klasičnog lobulusa jetre. (Preuzeto uz modifikacije: www.faculty.harford.edu.com)

Portalni lobulus se smatra najadekvatnijim modelom za opis egzokrine funkcije jetre, odnosno njene uloge u sintezi i sekreciji žuči (Anđelković i sar., 2001). Koncept je 1906. godine predložio Mall, gde se kao morfofunkcionalna jedinica smatra lobulus sa mrežom žučnih

kanalića. Predstavljen je u vidu trougla, čije uglove čine *venae centralis* tri susedna klasična lobulusa, dok mu centralni deo zauzima Kiernan-ov prostor, odnosno *ductus biliferus* u koji se skuplja žuč iz tri lobulusa koji formiraju zamišljen trougao (Sl. 1.1.6) (Anđelković i sar., 2001).

Jetrin acinus se uzima kao funkcionalna i metabolička jedinica jetre, obzirom da se njim, pored strukture, može objasniti i odgovor parenhima na normalne fiziološke, ali i patofiziološke uslove izazvane materijama koje krvotokom ulaze u jetru (Anđelković i sar., 2001; Malarkey i sar., 2005). Model je predložio patolog Rappaport 1954. godine (Rappaport i sar., 1954). Predstavljen je u formi romba, gde se razlikuju njegova kraća i duža osa (Sl. 1.1.5). Naspramni uglovi duže ose nalaze se u centralnim venama, dok se naspramni uglovi kraće ose nalaze u Kiernan-ovim prostorima dva susedna lobulusa (Sl. 1.1.5). Kraća osa romba se proteže duž granične ploče, odnosno duž distribuirajućih venula i arterija između posmatranih lobulusa (Sl. 1.1.5). Jetrin acinus obuhvata aproksimativno po 1/6 od dva klasična lobulusa (Anđelković i sar., 2001).

Metabolička funkcija jetre se objašnjava podelom jetrinog acinusa u tri metaboličke zone, zavisno od udaljenosti parenhimskih ćelija od distribuirajućih venula granične ploče (Sl. 1.1.5). Zoni I pripadaju hepatociti koji se nalaze neposredno uz samu granučnu ploču, dok zoni III pripadaju hepatociti koji su najudaljeniji od nje, odnosno koji su lokalizovani neposredno uz centralnu venu. Zona II se prostire između zone I i III (Sl. 1.5) (Anđelković i sar., 2001).



Slika 1.1.5. Model jetrinog acinusa sa metaboličkim zonama. (Preuzeto uz modifikacije: www.classconnection.s3.amazonaws.com)

Parenhim zone I prvi dolazi u kontakt sa krvlju koja ulazi u jetru, pa prema tome prvi i reaguje na komponente sadržane u njoj (Anđelković i sar., 2001). Položaj ovih ćelija u odnosu na krvotok je takav da one prve iz krvi primaju kako nutritivne sastojke, tako i sve štetne i toksične

materije (Anđelković i sar., 2001). Ovo podrazumeva da hepatociti zone I dobijaju najviše hranljivih materija, ali su ujedno izloženi i najvećoj količini štetnih molekula. Nasuprot tome, hepatociti III zone kontakt sa pristiglom krvlju ostvaruju tek pošto ona prođe zonu I i II i pritom već bude bitno izmenjena (Anđelković i sar., 2001). Naime, takva krv je siromašnija nutrijentima, ali i štetnim materijama.

Hepatociti I zone su najbliži vaskularnoj mreži, pa su time najrezistentniji na degenerativne promene i propadanje uzrokovano poremećajima cirkulacije. Takođe, ovi hepatociti se prvi regenerišu. Zona III je najudaljenija od krvotoka, nalazi se u najnepogodnijem položaju kada se radi o stanjima koja se karakterišu poremećajem krvotoka, pa hepatociti ove zone najviše podležu promenama uzrokovanim ishemijom, lakše podležu ishemičnoj nekrozi i pokazuju masnu akumulaciju (Anđelković i sar., 2001). Međutim, u stanjima koja se karakterišu začepljenjem žučnih puteva (žučna staza ili intoksikacija organizma sa žuči), hepatociti I zone prvi trpe promene i najviše su izloženi štetnim posledicama koje izazivaju ova stanja (Anđelković i sar., 2001).

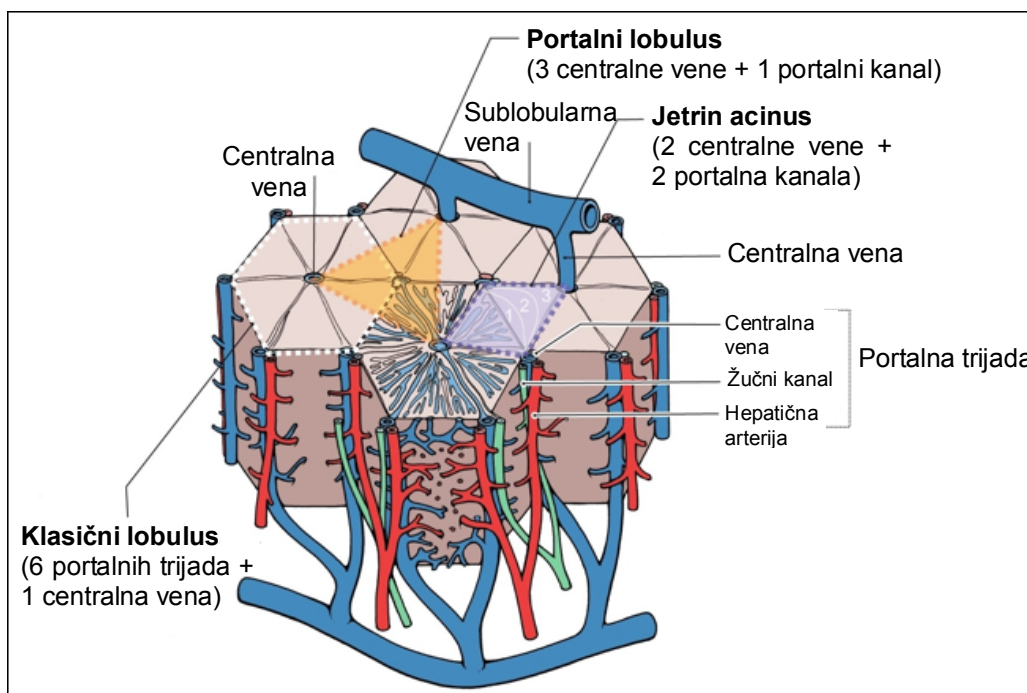
Tumačanje metaboličke funkcije jetre putem jetrinog acinusa pogodno je za razumevanje degenerativnih i regenerativnih procesa u lobulusu jetre, kao i specifičnih toksičnih posledica koji se dešavaju u parenhimu jetre (Rappaport i sar., 1954; Anđelković i sar., 2001). Ovakav koncept struktarno-funkcionalne jedinice jetre pruža mogućnost razumevanja stvaranja lezija, kao i pronalaženje veze između procesa nekroze i fibroze (Malarkey i sar., 2005).

Pokazano je da postoje razlike u ultrastrukturi i enzimskoj aktivnosti između hepatocita različitih zona, posebno između I i III zone (Anđelković i sar., 2001). Takođe se smatra da hepatociti periferije imaju niži stepen diferenciranosti u odnosu na one u centralnom delu lobulusa, koji se smatraju potpuno diferenciranim ćelijama (Anđelković i sar., 2001).

Istraživanja su zabeležila postojanje gradijenta razlika u kompoziciji ćelijske komponente i ekstracelularnog matriksa i to od perifernog ka centralnom regionu jetrinog lobulusa (Malarkey i sar., 2005). Razlike u funkcionalnim svojstvima između periportalnih i centrilobularnih ćelija, kao i razlike količini ekstracelularnog matriksa mogu bitno uticati na reakciju jetre kako u normalim, tako i u patofiziološkim uslovima, odnosno uslovima narušene homeostaze (Malarkey i sar., 2005).

Kod hepatocita postoji gradijent genske ekspresije i proteinske aktivnosti od periportalnog ka centrilobularnom regionu lobulusa (Gebhardt, 1992; MacSween i sar., 2002). Periportalni hepatociti u normalnim fiziološkim uslovima imaju i do 2 puta veću saturaciju kiseonikom u odnosu na centrilobularne hepatocite, veću količinu peroksizoma, veću aktivnost enzima glukoza-6-fosfataze, efikasnije preuzimanje žučnih kiselina, intenzivnije odvijanje ciklusa uree, kao i veći sadržaj GSH i sinteze glikogena (Gebhardt, 1992; MacSween i sar., 2002). Depo glikogena se prvo prazni iz hepatocita periportalnog regiona, ali se ujedno u ovom regionu prvo i obnovi. Glutamin sintaza je specifično ekspresovana u periportalnim hepatocitima, dok su glukokinaza, karboksilesteraza i etanol-inducibilni enzim CYP2E1 u većoj meri ekspresovani u centrilobularnim hepatocitima (Malarkey i sar., 2005).

Gradijent razlika je ustanovljen i kod ostalih strukturnih komponenti jetre, uključujući Kupffer-ove i Ito ćelije, endotelne ćelije sinusoida i količinu matriksa u Disse-ovim prostorima (Gebhardt, 1992; Lindros i sar., 1997; Braet i Wisse, 2002; MacSween i sar., 2002; Bykov i sar., 2004). Tako, endotelne ćelije sinusoida, koje se nalaze u blizini centralne vene, imaju veći broj fenestri, koje su ujedno i većeg dijametra (Braet i Wisse, 2002). Periportalne Kupffer-ove ćelije su krupnije i karakterišu se većim stepenom fagocitne aktivnosti (Bykov i sar., 2004). Svojstva Ito ćelija, takođe, variraju duž lobulusa, pa su tako one u periportalnim regionima manjih dimenzija, a citoplazma se karakteriše prisustvom lipidnih kapi manjeg volumena; one u središnjem regionu lobulusa su izdužene, deponovane lipidne kapi u citoplazmi su većeg volumena i prisutna je značajna količina desmina; dok one u centrilobularnom regionu imaju veću količinu vitamina A i manju količinu desmina (Ratziu i Friedman, 1997). Disse-ovi prostori u periportalnom regionu karakterišu se većom zastupljenošću laminina, kolagena tipa IV i heparin-sulfata (MacSween i sar., 2002). S druge strane, Disse-ovi prostori centrilobularnog regiona imaju veću količinu fibronektina, kolagena tipa III i dermatan-sulfata (MacSween i sar., 2002).



Slika 1.1.6. Morfofunkcionalne jedinice jetre: klasični lobulus (šestougao), portalni lobulus (trougao) i jetrin acinus (romb). U okviru jetrinog acinusa su definisane 3 metaboličke zone lobulusa zavisno od udaljenosti hepatocita od granične ploče.

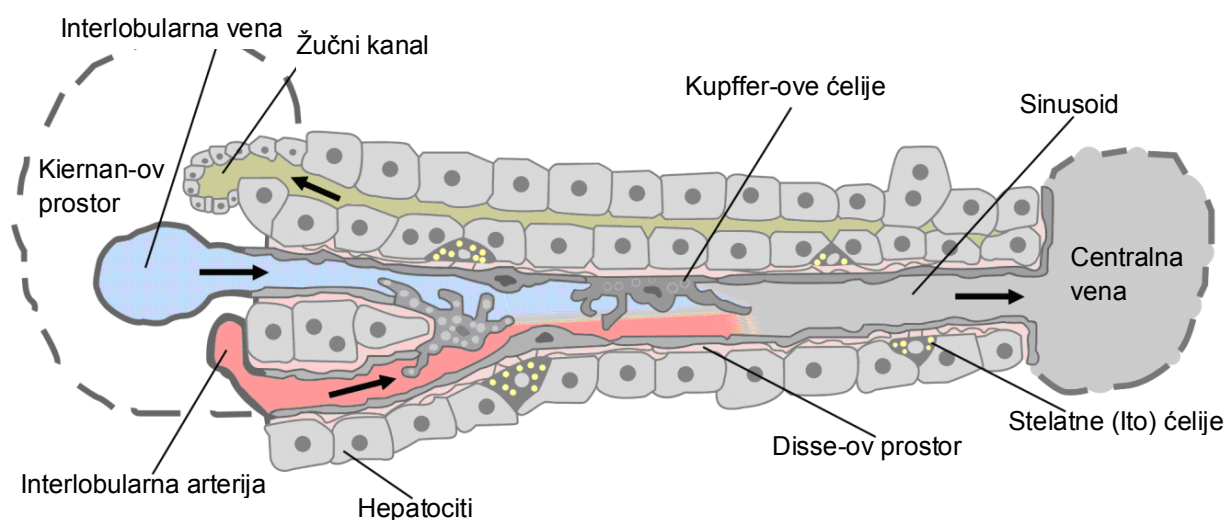
(Preuzeto uz modifikacije: www.classconnection.s3.amazonaws.com)

Pored toga, kod jetre je pokazana, za sada, još uvek neobjašnjena inter- i intralobularna varijabilnost u nastanku akutne hepatične nekroze, gde pojedini regioni lobulusa pokazuju masivne nekrotične promene, a da istovremeno susedni regioni istog lobulusa, ili susedni lobulusi, mogu biti potpuno očuvani, bez ikakvih znakova oštećenja i narušenosti strukturnog integriteta (Irwin i sar., 2005). Varijabilnost između lobulusa je uočena prilikom analize oštećenja nastalih usled toksičnosti acetaminofena, odnosno paracetamola (Irwin i sar., 2004; 2005), u distribuciji bakra (Haywood, 1981; Faa i sar., 1995), gvožđa i fosfora (Ambu i sar., 1995), hemijske i spontane kancerogeneze (Richardson i sar., 1986), ciroze (Matsuzaki i sar., 1997) i regeneracije (LaBrecque, 1994). Mehanizam ovakvih promena nije poznat, ali se pretpostavlja da bi priliv krvi u jetru (Duchen, 1961), kao i lobularni gradijent (Germain i sar., 1987) mogli imati važan udeo u nastanku zabeleženih varijabilnosti.

Prema tome, reakcija jetre na određeni tretman, ditribuciju lezija i osetljivost ćelija na pojedine hepatotoksine, se može posmatrati i u kontekstu navedenih svojstava, kako bi se obezbedila kompletnija slika metaboličkih procesa jetre.

1.1.4 Osnovni tipovi ćelijskih populacija

Lobulus jetre izgrađuju tri osnovna i specifična tipa ćelijske populacije: *hepatociti* (parenhimske ćelije), *Kupffer-ove ćelije* (rezidentni makrofagi jetre) i *perisinusoidne* (stelatne ili Ito) ćelije (Sl. 1.1.7). Endotelne ćelije sinusodinih kapilara poseduju specifične karakteristike kojima, takođe, značajno doprinose normalnoj fiziologiji jetre. Pored ovih, prisutne su i epitelne ćelije žučnih kanala, fibroblasti, glatko-mišićne ćelije, neuroendokrine ćelije, hematopoezne ćelije, eritrociti, leukociti, limfociti i dr. Procenjuje se da je u normalnoj jetri moguće identifikovati i do 15 različitih tipova ćelija (Malarkey i sar., 2005).



Slika 1.1.7. Shematski prikaz prostorne organizacije parenhimskih i neparenhimskih ćelija u Remak-ovoj gredici u lobulusa jetre. (Preuzeto uz modifikacije: www.plosbiology.org)

Hepatociti izgrađuju parenhim jetre, čine oko 60-70% ukupne ćelijske populacije i 80% ukupnog volumena jetre (Rhoades i Tanner, 2003; Malarkey i sar., 2005). Oni su glavni nosioci većine jetrinih funkcija, obzirom da većinu procesa koje ona vrši može obavljati svaki pojedinačni hepatocit (Rhoades i Tanner, 2003). Hepatociti su visoko specijalizovane, ali ujedno i funkcionalno heterogene ćelije, sa veoma dobro izraženom moći regeneracije (Rhoades i Tanner, 2003; Michalopoulos, 2007).

Prema morfologiji, hepatociti su mnogougaone i relativno krupne ćelije, dimenzija 20-30 μm (Anđelković i sar., 2001; Standring, 2008). Obzirom da se hepatociti karakterišu velikim regenerativnim kapacitetom, u parenhimu jetre su često prisutne dvojedane ćelije. Procenjuje se da je svaka četvrta ćelija dvojedana, a da je među jednojedanim 70% tetrapolidnih i 2%

oktaploidnih ćelija (Anđelković i sar., 2001). Ovakve ćelije imaju veću količinu DNK u nukleusu, pa su prema tome i srazmerno krupnije u odnosu na okolne jednojedarne, diploidne hepatocite. Hepatociti imaju krupna jedra i obično dva ili više dobro definisanih i uočljivih nukleolusa. Životni vek hepatocita se procenjuje na oko 5 meseci (Anđelković i sar., 2001).

Citoplazma hepatocita je bogata mitohondrijama i dobro razvijenim glatkim endoplazmatičnim retikulumom (glER), pa je zbog toga acidofilna (Sl. 1.1.8) (Anđelković i sar., 2001). Razvijenost glER zavisi od stepena metaboličke aktivnosti ćelije. glER sadrži enzime bitne za razgradnju i konjugaciju toksina i lekova, sintezu holesterola i lipidnih komponenti lipoproteina (Anđelković i sar., 2001). U slučaju izloženosti organizma toksičnim supstancama ili pojedinim lekovima, glER hipertrofiše i postaje dominantna organela u citoplazmi hepatocita. U citoplazmi se takođe uočavaju bazofilna telašca, koja predstavljaju nakupine granuliranog endoplazmatičnog retikuluma (grER) u čijim poliribozomima dolazi do sinteze proteina kao što su albumini i fibrinogen (Anđelković i sar., 2001). U normalnim uslovima, glER i grER zauzimaju oko 15% ukupnog ćelijskog volumena hepatocita (Malarkey i sar., 2005).

Hepatociti sadrže veći broj Golgi-evih aparata. Ove organele najčešće imaju 3-5 pet cisterni, a u svojoj blizini imaju brojne sekretorne vezikule i lizosome (Anđelković i sar., 2001). Golgi-evi aparati koji su lokalizovani u blizini žučnih kanalića učestvuju u sekreciji žuči. Cisterne i vezikule koje se nalaze u blizinu plazmaleme, okrenute su ka sinusoidima, veličine se između 25-80 nm i smatra se da sadrže lipoproteine i njihove prekursore (Sl. 1.1.8) (Anđelković i sar., 2001).

Peroksizomi hepatocita učestvuju u procesima glukoneogeneze, metabolizmu purina, alkohola i lipida, obzirom da poseduju enzime kao što su: katalaze, d-amino acid oksidaze i alkohol-dehidrogenaze (Anđelković i sar., 2001). Procenjuje se da hepatociti imaju 200-300, pa i do 500 peroksizoma, veličine između 0,2-1,0 μm (Anđelković i sar., 2001; Malarkey i sar., 2005).

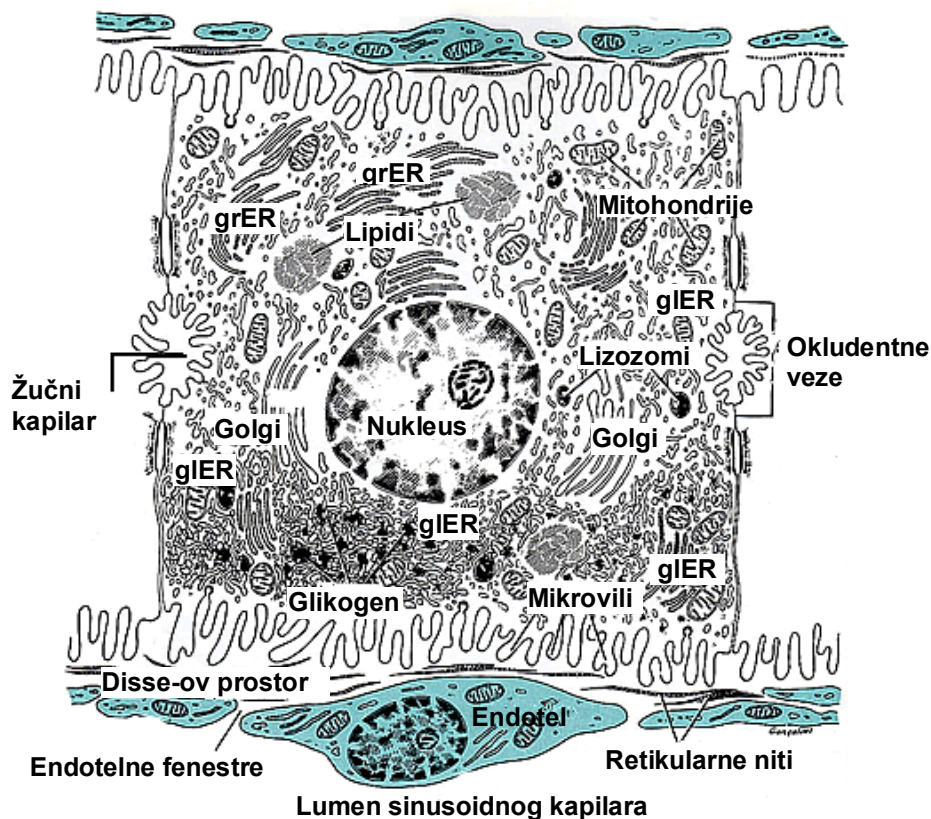
Lizozomi su po svom sastavu heterogeni, ima ih oko 30 u svakom hepatocitu (Malarkey i sar., 2005). Mogu sadržati pigmentne granulacije, kao što je lipofuscin, razorene ćelijske organele i gvožđe (Fe) u formi feritina (Anđelković i sar., 2001). U citoplazmi hepatocita se mogu naći i vakuole koje sadrže enzime kao što je ureaza, što dodatano ukazuje na kompleksne metaboličke

funkcije ovih ćelija, dok je prisustvo vakuola sa kristalima feritina i hemosiderina pokazatelj metabolizma gvožđa (Fe) (Standring, 2008).

Hepatociti su bogati mitohondrijama i procenjuje se da ih ima oko 1.000 po ćeliji (Malarkey i sar., 2005). U citoplazmi hepatocita se mogu naći i slobodni ribozomi, elementi citoskeleta (mikrofilamenti, intermedijarni filamenti i mikrotubuli), lipidne kapi i glikogen (Malarkey i sar., 2005).

Starenjem organizma, brojnost hepatocita opada, uporedo se povećava učestalost njihove hipertrofije, poliploidije, a kapacitet za metabolisanje lekova i drugih ksenobiotika se smanjuje (Malarkey i sar., 2005). Citoplazma hepatocita vremenom postaje bogatija lizozomima i većom količinom gLER, dok broj mitohondrija i peroksizoma ostaje konstantan (Malarkey i sar., 2005).

Ćelijska membrana hepatocita može biti u kontaktu sa Disse-ovim prostorima ili sa susednim hepatocitima (Sl. 1.1.8). Deo membrane koji je orijentisan ka perivaskularnom, Disse-ovom prostoru ima brojne mikrovile, dužine oko 0,5 μm , čime se i do šest puta povećava kontaktna površina ćelija sa krvnom plazmom (Anđelković i sar., 2001; Standring, 2008). Takođe, na ovom delu membrane su prisutni brojni receptori putem kojih se kontroliše unos materija iz krvi u hepatocit (Anđelković i sar., 2001). Pri kontaktu sa susednim hepatocitima, plazmalema može, ali ne mora formirati žučni kapilar (Sl. 1.1.8; Sl. 1.1.9) (Anđelković i sar., 2001). Ukoliko dva susedna hepatocita grade žučni kapilar, njihove membrane formiraju simetrične, naspramne žljebove, čijim se zatvaranjem formira kapilar. Deo membrane koji formira žučni kapilar, takođe poseduje mikrovile (Anđelković i sar., 2001). U regionu žljeba, membrane hepatocita su čvrsto povezane okludentnim i adherentim vezama, koje onemogućavaju izlivanje žuči van kanalića u ekstracelularni prostor. Hepatociti koji ne formiraju žučni kapilar međusobno su povezani pukotinskim vezama. Citoplazma hepatocita oko žučnog kapilara je bogata aktinskim i intermedijernim filamentima koji regulišu dijаметar kapilara, odnosno doprinose pokretanju žuči kroz žučne puteve (Anđelković i sar., 2001).



Slika 1.1.8. Shema ultrastrukture hepatocita. (Preuzeto uz modifikacije: www.3.bp.blogspot.com)

Kupffer-ove ćelije su rezidentni makrofagi jetre, vode poreklo od cirkulišućih monocita i pripadaju mononukleusnom fagocitnom sistemu (Malarkey i sar., 2005). Čine oko 15% njene ukupne ćelijske populacije (Anđelković i sar., 2001; Rhoades i Tanner, 2003). Kupffer-ove ćelije su lokalizovane u lumenu sinusodnih kapilara, i nisu fiksirane, tj. ne stvaraju spojne komplekse sa endotelnim ćelijama, što im omogućava kretanje duž kapilara (Sl. 1.1.7; Sl. 1.1.9) (Anđelković i sar., 2001; Rhoades i Tanner, 2003). Ipak, ove ćelije se mogu smatrati gradivnom komponentom kapilara, pošto zajedno sa endotelnim ćelijama izgrađuju njihovu *tunicu intimu* (Anđelković i sar., 2001; Rhoades i Tanner, 2003).

Kupffer-ove ćelije su zvezdastog oblika i imaju brojne citoplazmatične nastavke, pri čemu jedne šalju u lumen kapilara, a druge pružaju kroz otvore između endotelnih ćelija u Disse-ov prostor, izazivajući povremeno njihovu delimičnu okluziju (Anđelković i sar., 2001). Ove ćelije su specijalizovane za uklanjanje štetnih materija iz krvi, kao i ćelijskog i mikrobiloškog debrisa iz cirkulacije (Standring, 2008). U njihovoj citoplazmi se mogu naći ostaci starih i oštećenih

eritrocita ili gvožđa (Fe) u formi feritina (Anđelković i sar., 2001; Standring, 2008). Pored toga, one proizvode biološki aktivne materije, poput citokina i prostaglandina, koje su važni faktori u odbrambenim procesima organizma (Standring, 2008). Njihova citoplazma je bogata lizozomima, rezidualnim tjelesnim i dobro razvijenim sekretornim granulama Golgi-evog aparata i grER. Pretpostavlja se da Kupffer-ove ćelije mogu sprečiti nastanak i razvoj metastaza brojnih tumora koji metastaziraju u jetru (Anđelković i sar., 2001).

Populacija Kupffer-ovih ćelija ima ključnu ulogu pri akutnim i hroničnim reakcijama jetre na toksične supstance, kao i u prvoj liniji odbrane organizma prilikom invazije patogena (Roberts i sar., 2006). Takođe se sumnja i na njihovu parcijalnu kompetentnost kao antigen-prezentirajućih ćelija, kojom bi modifikovale aktivaciju i regulaciju aktivnosti T limfocita u adaptivnom imunom odgovoru (Roberts i sar., 2006). Studije sugerišu inhibitoran efekat ovih ćelija na proliferaciju T ćelija, verovatno oslobađanjem imunosupresivnih molekula u ekstracelularni prostor i prisustvom nedovoljne količine kostimulirajućih molekula ekspresovanih na membrani, što čini jedan od neophodnih signala u aktivaciji T limfocita (Roberts i sar., 2006).

Perisinusoidne (statalne ili Ito) ćelije su lokalizovane u perisinusoidnim prostorima lobulusa i čine oko 5% ukupne ćelijske populacije jetre (Sl. 1.1.7; Sl. 1.1.9) (Rhoades i Tanner, 2003; Malarkey i sar., 2005). Smatra se da su ove ćelije slabo diferencirane mezenhimske ili hematopoetske stem ćelije (Anđelković i sar., 2001). Ito ćelije su loptastog oblika i imaju brojne citoplazmatične nastavke preko kojih komuniciraju sa hepatocitima i sinusoidima, ali sa njima ne formiraju spojne komplekse (Anđelković i sar., 2001). Za ove ćelije je karakteristično da je njihova citoplazma ispunjena lipidnim kapljicama u kojima se nalazi vitamin A. Ito ćelije su aktivno angažovane u metabolizmu i deponovanju ovog vitamina, a njegovim oslobađanjem iz citoplazme, poprimaju oblik fibroblasta (Anđelković i sar., 2001). Takođe, ove ćelije mogu deponovati i metabolisati lipide (Malarkey i sar., 2005).

Ito ćelije imaju ključnu ulogu u procesima regeneracije, fibrogeneze i ciroze jetre (Malarkey i sar., 2005), i značajan su izvor faktora rasta koji doprinosi odražavanju homeostaze jetre i njenoj regeneraciji (Standring, 2008). Naime, ove ćelije imaju veoma dobru sposobnost sinteze i sekrecije ekstracelularnog matriksa, posebno retikulinskih vlakana (kolagen tipa III). U normalnim uslovima, manji broj retikulinskih niti je prisutan i u perisinusoidnim prostorima (Sl. 1.1.8) (Anđelković i sar., 2001).

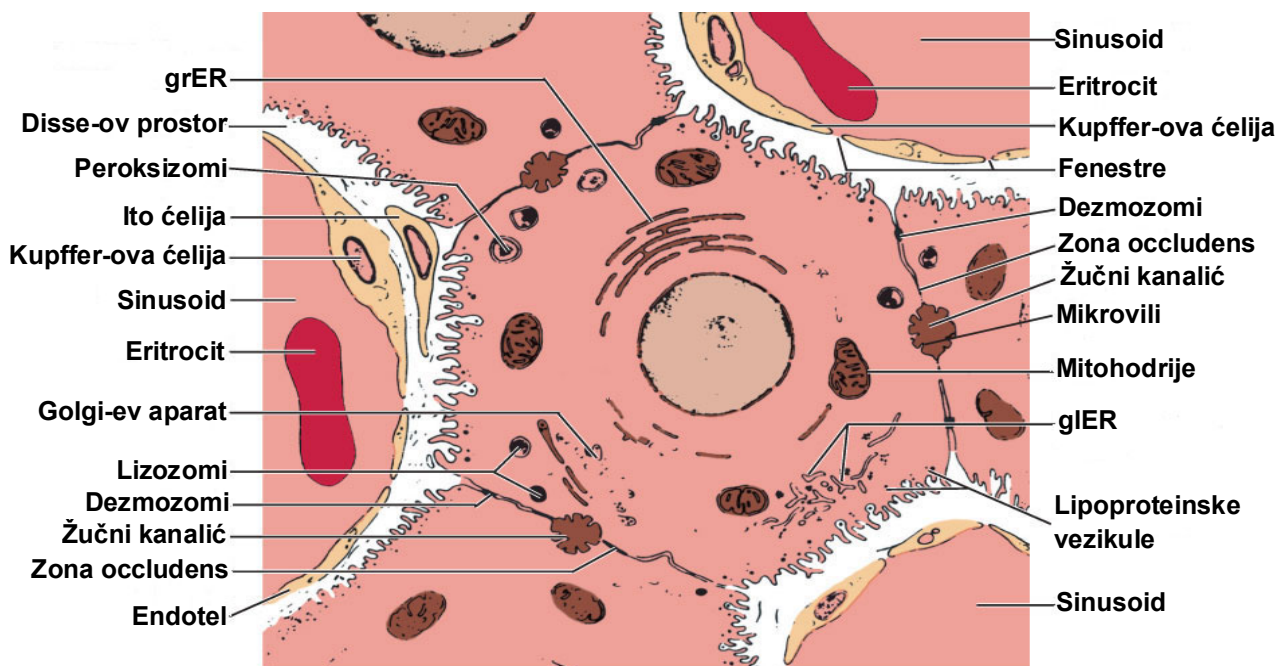
Uvećanje broja Ito ćelija je indikator reakcije jetre na toksične supstance, pri čemu ove ćelije svojom aktivnošću doprinose zameni oštećenih hepatocita ožiljčanim kolagenim vezivnim tkivom, što finalno može dovesti do fibroze organa (Anđelković i sar., 2001; Standring, 2008). Fibroza se inicijalno javlja u III zoni lobulusa, oko centralne vene, i može voditi cirozi, gde dolazi do narušavanja arhitekture parenhima i destrukcije mreže krvnih sudova, što ima ozbiljne sistemske posledice po kompletan organizam (Standring, 2008).

Pretpostavlja se da u patološkim uslovima, Ito ćelije imaju potencijal transformacije u krvne ćelije, miofibroblaste ili adipocite (Anđelković i sar., 2001). Tako, nakon aktivacije i transformacije u miofibroblaste, ove ćelije ekspresuju desmin i aktinske filamente glatko-mišićnih ćelija (Malarkey i sar., 2005).

Endotelne ćelije izgrađuju zid jetrinih sinusoida koji spadaju u tip sinusodinih (diskontinuiranih) kapilara (Sl. 1.1.7; Sl. 1.1.9) (Anđelković i sar., 2001). Čine do 20% ukupne ćelijske populacije jetre (Malarkey i sar., 2005). Prema morfologiji, ove ćelije su pločaste, imaju malo citoplazme, koja je siromašna organelama, ali ispunjena pinocitotičkim vezikulama. Imaju spljošten nukleus koji prominira u lumen sinusoida (Anđelković i sar., 2001). Bazalna lamina ispod ovih ćelija delimično ili potpuno nedostaje (Standring, 2008). Između samih endotelnih ćelija postoje pukotine koje u kombinaciji sa nedostatkom bazalne lamine čine zid sinusoida veoma poroznim (Anđelković i sar., 2001). Pored toga, i same endotelne ćelije imaju veliki broj perforacija (otvora) u svojoj citoplazmi, oko kojih su skoncentrirani aktinski i miozinski filamenti i regulišu dijаметar ovih otvora (Standring, 2008).

Prema tome, endotel jetrinih sinusoida se karakteriše prisustvom transcelularnih i intercelularnih pora, dijametra 0,5-3,0 μm , kao i fenestrama bez dijafragme (Anđelković i sar., 2001; Standring, 2008). Fenestre (otvori) se nalaze u klasterima, u vidu sitastih ploča, a njihov prosečni dijаметar iznosi oko 100 nm (Standring, 2008). Sve pomenute perforacije endotela imaju dijаметar manji od 3 μm , pa krvni elementi ne prolaze kroz njih, odnosno ostaju u cirkulaciji (Anđelković i sar., 2001). Ovakva velika poroznost sinusodnih kapilara omogućava da se krvna plazma lako i efikasno cedi u perisinusoidni prostor kroz inter- i intracelularne perforacije i doprema do hepatocita (Anđelković i sar., 2001).

Prema tome, endotelne ćelije jetrinih sinusoida imaju funkciju primarne barijere između krvi i hepatocita, i funkcionišu kao filtri tečnosti, rastvora i supstanci između krvi i Disse-ovih prostora (Malarkey i sar., 2005).



Slika 1.1.9. Lokalizacija i povezanost parenhimskih i neparenhimskih ćelija u lobulusu u jetre. grER-granulirani endoplazmatični retikulum, gIER-glatki endoplazmatični retikulum. (Preuzeto uz modifikacije: www.uni-plovdiv.bg)

Pored navedenih ćelija, značajnu strukturnu komponentu jetre čini ekstracelularni matriks, koji ima važnu ulogu pri regulaciji i modulaciji njenih funkcija. Procenjuje se da kolagen čini 5-10% jetre. U ekstracelularnom matriksu jetre se mogu naći matriks metaloproteinaze, glikoproteini: laminin, fibronektin, vitronektin, undulin, entaktin (nidogen) i proteoglikani poput heparan-sulfata (Malarkey i sar., 2005).

1.1.5 Žučni putevi

Sinteza i sekrecija žuči jeste najprominentnija egzokrina funkcija jetre, odnosno hepatocita. Žuč se u jetrinom lobulusu transportuje u centrifugalnom smeru, odnosno od centra ka periferiji, a pritom prolazi kroz sistem intrahepatičnih i ekstrahepatičnih žučnih kanala do žučne kese, gde se privremeno deponuje i prema potrebi izlučuje u duodenum (Anđelković i sar., 2001).

Sistem intrahepatičnih žučnih puteva počinje žučnim kapilarima (*canaliculi biliferi*), koji nastaju od membrana dva susedna hepatocita Remak-ove gredice, i imaju dijametar 0,5-1,5 μm (Sl. 1.1.3). Na mestu spajanja membrana nalaze se okludentne veze koje onemogućavaju oticanje žuči van kapilara, a time i njeno mešanje sa krvlju (Anđelković i sar., 2001). U nivou granične ploče žučni kapilari se ulivaju u žučne kanaliće (*ductuli biliferi*) ili Hering-ove kanale, a oni zatim u interlobularni žučni kanal (*ductus biliferus*), dijametra 15-40 μm (Anđelković i sar., 2001).

Iz sistema intrahepatičnih izvodnih kanala, žuč se odvodi u sistem ekstrahepatičnih žučnih kanala u koje spadaju: *ductus dexter et sinister*, *ductus hepaticus communis*, *ductus cysticus*, kojima se žuč dovodi do žučne kese, i konačno, *ductus choledocus*, kojim se žuč odovodi u duodenum. Na intraduodenalnom delu *ductusa choledocusa* nalaze se cirkulatorno raspoređeni snopovi mišića koji fomiraju Oddi-ev sfinkter kojim se reguliše dotok žuči u duodenum (Anđelković i sar., 2001).

Žučni kapilari nemaju sopstveni zid, već su definisani na mestima gde dolazi do spajanja ćelijskih membrana dva susedna hepatocita, dok se zid, kao definisani, strukturni deo, javlja kod Hering-ovih kanala (Anđelković i sar., 2001). Oni i interlobularni žučni kanali obloženi su kubičnim epitelom, koji postepeno postaje sve više cilindričan kako kanali postaju sve većeg dijametra i kako se približavaju hilusu jetre (Anđelković i sar., 2001). Žučni kanali većeg dijametra karakterišu se prizmatičnim ćelijama koje na svojoj apikalnoj površini imaju mikrovile, dok su lateralno povezane spojnim kompleksima. Idući prema hilusu, zid izvodnih kanala postepeno dobija sve deblji sloj veziva, pojavljuju se elastična vlakna, a u blizini hilusa su prisutne i glatkomišićne ćelije (Anđelković i sar., 2001).

Svi ekstrahepatični izvodni kanali imaju istu građu, koju čini samo *tunica mucosa* (sluznica) sa podslujevima: *lamina epithelialis*, *lamina propria* i *lamina muscularis* (Anđelković

i sar., 2001). Epitel je prost i izgrađen od jednog sloja prizmatičnih ćelija i stvara brojne uvrate (sakuluse) u koje se ulivaju žlezde mukoznog tipa, lokalizovane u *lamini propriae* (Anđelković i sar., 2001) Sama *lamina propria* je tanka, sadrži rastresito vezivo, elastična vlakna, krvne i limfne sudove, ganglijske ćelije i nerve, i glatkomišićne ćelije (Anđelković i sar., 2001). U početnim ekstrahepatičnim žučnim putevima *lamina muscularis* je nepotpuna, grade je glatkomišićne ćelije koje su orijentisane spiralno. Potpuni mišićni sloj je formiran samo u retropankreasnom i intraduodenalnom segmentu *ductusa choledocusa*, što će formirati Oddi-ev sfinkter (Anđelković i sar., 2001).

1.1.6 Vaskularizacija

Volumen krvi koji je prisutan u jetri, u svakom trenutku, aproksimativno je ekvivalentan 25% od ukupnog volumena krvi koje srce istisne u sistoli (Burt i Day, 2002). Jetra se snabdeva krvlju putem *arteriae hepaticae propriae* i *venae portae* koje u regionu hilusa ulaze u jetru, da bi se dalje granale na manje krvne sudove koji vaskularizuju svaki lobulus (Anđelković i sar., 2001). U okviru lobulusa, arterijska i venska krv kreću se u centripetalnom smeru, tj. od periferije lobulusa, kroz lavirint sinusoidnih prostora, i konačno, u centralnu venu (Anđelković i sar., 2001). Kod jetre postoji funkcionalni i nutritivni krvotok.

Funkcionalni krvotok se obezbeđuje portnom venom (*vena porta*), koja dovodi krv iz gastro-intestinalnog trakta, pankreasa i slezine, i čini oko 70-80% ukupnog volumena krvi koja dolazi u jetru (Anđelković i sar., 2001; Rhoades i Tanner, 2003). Ovakva krv je bogata hranljivim materijama, a siromašna kiseonikom (Anđelković i sar., 2001; Rhoades i Tanner, 2003). Nakon prolaska kroz hilus, portna vena daje manje ogranke koji ulaze u Kiernan-ov prostor i predstavljaju *vv. interlobulares*. Ove vene se dalje rasipaju na distribuirajuće venule koje obavijaju svaki pojedinačni lobulus, a zatim se od njih odvajaju ogranci ulaznih venula koje prolaze kroz graničnu ploču i prazne se u sinusoidnim prostorima lobulusa (Anđelković i sar., 2001; Rhoades i Tanner, 2003).

Nutritivni krvotok se obezbeđuje hepaticnom arterijom (*arteria hepatica propria*), inače granom celijačne arterije. Ovaj krvotok čini 20-30% ukupnog krvotoka jetre i snabdeva je oksigenisanom krvlju (Anđelković i sar., 2001; Rhoades i Tanner, 2003). Nakon prolaska kroz hilus, hepaticna arterija se grana na manje arterije koje ulaze u Kiernan-ov prostor, dajući *aa*.

interlobulares. Na nivou Kiernan-ovog prostora, oksigenisana krv se iz interlobularnih arterija raspoređuje delom kroz kapilare, a delom kroz ulazne arteriole (Anđelković i sar., 2001). Naime, interlobularne arterije se rasipaju u mrežu kapilara koji ishranjuju portalni kanal i kompletno interlobularno vezivno tkivo. Ova kapilarna mreža se potom nastavlja venulama koje odvođe krv u sinusoidne. Prema tome, deo arterijske krvi koja dospeva iz hepatične arterije u sinusoidne lobulusa dospeva kao venska krv (Anđelković i sar., 2001). Istovremeno, ostatak oksigenisane krvi iz interlobularnih arterija odvodi se njihovim ograncima, ulaznim arteriolama, kroz graničnu ploču gde se oksigenisana krv prazni direktno u sinusoidne prostore (Anđelković i sar., 2001). Prema tome, na nivou sinusoidnih prostora, u lobulusu jetre, dolazi do mešanja venske i arterijske krvi.

Sva prispela krv u lobulus iz portne vene i hepatične arterije se rasipa u lavirint sinusoida, a zatim sliva u centralnu venu, koja ujedno predstavlja i terminalnu hepatičnu venu. Prema svojoj građi, centralna vena je klasična venula, ima tanak zid, izgrađen iz endotelnih ćelija i tankog sloja kolagenih vlakana koja su spiralno orijentisana oko nje. Pri prolasku kroz lobulus, ona postaje sve šira, napušta ga na njegovoj bazi, ulivajući se u sublobularnu venu (Anđelković i sar., 2001). Više sublobularnih vena grade sabirne vene, koje spajanjem daju nekoliko hepatičnih vena i odvođe krv u donju šulju venu (Anđelković i sar., 2001).

1.1.7 Limfni sistem

U jetri ne postoje intralobularni limfni sudovi, već se limfa drenira u Disse-ove prostore, a potom dalje u Mall-ove prostore, koji predstavljaju pukotine između strome portalnog kanala i spoljašnje površine hepatocita granične ploče (Anđelković i sar., 2001). Iz Mall-ovih prostora, limfa se skuplja u limfne kapilare koji slepo počinju u Kiernan-ovom prostoru, zatim se kroz sistem sve većih limfatika odvodi do regiona hilusa, i konačno drenira u *ductus thoracicus* (Anđelković i sar., 2001).

1.1.8 Inervacija

Jetru inerviše hepatični plexus, derivat *plexusa celiacusa*, i sadrži simpatičku i parasimpatičku komponentu vegetativnog nervnog sistema (Standring, 2008). Simpatička vlakna dolaze iz celijačnog plexusa, a parasimpatička iz anteriornog i posteriornog vagusnog trunkusa (Standring, 2008). Hepatični plexus prati ogranke *aretie hepaticae propriae* i *vanae*

portae, u regionu hilusa ulazi u jetru, a zatim se grana prateći krvne sudove i žučne kanale ka portalnim kanalima (Anđelković i sar., 2001; Standring, 2008).

1.1.9 Funkcija

Jetra se, kao organ, karakteriše izuzetnom funkcionalnom heterogenošću. Ona učestvuje u brojnim procesima vezanim za varenje, metabolizam i detoksifikaciju, skladištenje hranljivih materija, sintezu proteina plazme, u imunim odgovorima i time značajno doprinosi održavanju homeostaze organizma (Rhoades i Tanner, 2003).

Parenhimske ćelije jetre, odnosno hepatociti, smatraju se glavnim nosiocima njenih funkcija, obzirom da ove ćelije poseduju specifičnu funkcionalnu sposobnost i kapacitet kojim obezbeđuju da se najveći broj procesa u jetri odvija upravo na nivou hepatocita (Anđelković i sar., 2001). Hepatociti obavljaju endokrinu i egzokrinu funkciju, sintetišu pojedine molekule, vrše biotransformaciju i neutralizaciju velikog broja endogenih i egzogenih supstanci koje mogu biti štetne po organizam, dok pojedine materije ove ćelije samo prenose (Anđelković i sar., 2001).

Funkcija jetre je velikim delom definisana njenom lokalizacijom u odnosu na venski krvotok gastro-intestinalnog trakta (Krause, 2005). Krv iz portalne vene, koja drenira ceo digestivni trakt i slezinu, prvo prolazi kroz jetru, a potom ulazi u sistemsku cirkulaciju (Krause, 2005). Prema tome, u jetru dospevaju sve materije apsorbavane u crevnom traktu, izuzev kompleksnih lipida (hilomikrona), koji se transportuju limfom (Anđelković i sar., 2001), a iz slezine dospevaju produkti razgradnje eritrocita, odnosno hemoglobina (Krause, 2005). Ovakav specifičan položaj jetre u odnosu na cirkulatorni sistem obezbeđuje joj aktivno učešće u preuzimanju i deponovanju hranljivih materija apsorbavanih iz creva, kao i transformaciju, neutralizaciju i eliminaciju lekova, toksičnih ili potencijalno toksičnih materija iz organizma (Anđelković i sar., 2001; Rhoades i Tanner, 2003). Dakle, krv koja će se iz creva i slezine transportovati do srca, a zatim i duž celog organizma, prethodno mora proći kroz jetru koja aktivno kontroliše njen sastav (Krause, 2005).

Jetra ima veoma dobar regenerativni kapacitet. Relativno brzo nadoknađuje deo oštećenog tkiva putem mitotskih deoba neoštećenih ćelija (Anđelković i sar., 2001). Proces je regulisan halonima, glikopeptidima koji inhibišu proliferaciju ćelija. Oštećenje parenhima izaziva pad

koncentracije halona, pa to pokreće proces regeneracije. Kako se izgubljeni deo tkiva nadoknađuje, količina halona raste, pa se i proliferacija zaustavlja (Anđelković i sar., 2001). Jetra prilično uspešno sanira oštećenja manjeg stepena u kvalitativnom i kvantitativnom smislu. Međutim, pri oštećenju većeg obima, može doći do nesrazmernog stvaranja vezivnog tkiva na štetu parenhima, koje finalno može imati za posledicu nastanak ciroze jetre (Anđelković i sar., 2001).

Najznačajnije funkcije jetre se mogu svrstati na sledeći način:

1. ENDOKRINA ULOGA - definisana jetrinom sposobnošću da sintetiše, a potom u krv sekretuje veliki broj molekula, kao što su: albumini, protrombin, fibrinogen i lipoproteini. Sinteza ovih proteina se dominantno odvija na nivou hepatocita, ali se oko 5% njih sintetiše i od strane Kupffer-ovih ćelija (Anđelković i sar., 2001). Jetra učestvuje i u modifikovanju aktivnosti hormona koji se sintetišu u drugim organima (Rhoades i Tanner, 2003).
2. EGZOKRINA ULOGA - podrazumeva sintezu i sekreciju žuči u duodenum, koja je važna za emulgovanje lipida (Rhoades i Tanner, 2003). Jetra odraslog čoveka, prosečno stvara oko 1 litar žuči dnevno (Anđelković i sar., 2001). Njeno lučenje u duodenum se odvija pod uticajem hormona kao što su: sekretin, holecistokinin (CCK) i gastrin, koje sekretuju neuroendokrine ćelije creva tokom digestije (Anđelković i sar., 2001). Žuč nastaje metabolizmom materija koje hepatociti preuzimaju iz krvi, a u njen sastav ulaze: voda i elektroliti (Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), žučne soli, žučne kiseline, žučni pigment (bilirubin), holesterol i fosfolipidi (Anđelković i sar., 2001). Žučne kiseline nastaju u gLER hepatocita u reakciji konjugacije žučnih soli sa glicinom ili taurinom. Veoma su značajan sastojak žuči, obzirom da doprinose emulgovanju lipida apsorbiranih iz creva, i time olakšavaju njihovu dalju razgradnju lipazom. Bilirubin nastaje razgradnjom hemoglobina u mononukleusnom fagocitnom sistemu, kome pripadaju i Kupffer-ove ćelije. Obzirom da je on liposolibilan, na nivou gLER u hepatocitima, vezuje se za glukuronsku kiselinu, obrazujući time hidrosolubilni bilirubin-glukuroid, koji se luči u žučne kanaliće (Anđelković i sar., 2001).
3. DEPONOVANJE METABOLITA - podrazumeva sposobnost jetre da stvara depoe lipida i ugljenih hidrata u formi triglicerida, odnosno glikogena, koji će služiti kao depoi energije

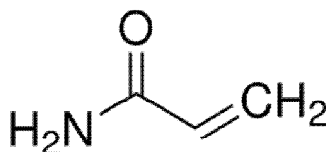
za potrebe organizma. Pored toga, u jetri se nalaze deponovani liposolubilni vitamini A, D, E, K, zatim vitamin B12, kao i gvožđe (Fe) u formi feritina (Rhoades i Tanner, 2003)

4. METABOLIČKE FUNKCIJE - učestvuje u razgradnji ili modifikaciji proteina i aminokiselina, reguliše nivo glukoze i lipida u krvi (Rhoades i Tanner, 2003). Jetra održava nivo glukoze u krvi i to posredstvom sinteze i razgradnje glikogena (glikogeneza i glikogenoliza), kao i putem glukoneogeneze - metaboličkog puta kojim se formira glukoza iz supstrata koji nisu ugljeni hidrati, tj. iz aminokiselina i lipida (Rhoades i Tanner, 2003). Jetra prva detektuje i reaguje na svaku promenu u nivou insulina u plazmi. Dalje, deaminacijom aminokiselina se formira urea, koja će se putem urina eliminisati iz organizma (Anđelković i sar., 2001). Takođe, jetra spada u ključne organe u sintezi masnih kiselina i eliminaciji holesterola iz organizma (Rhoades i Tanner, 2003).
5. DETOKSIFIKACIJA I NEUTRALIZACIJA - procesi koji se, pored sposobnosti stvaranja žuči, u najvećoj meri smatraju dominantnom karakteristikom jetre. Hepatociti imaju dobro razvijen sistem enzima koji omogućava efikasnu i brzu biotransformaciju većine štetnih supstanci i time njihovu inaktivaciju (Rhoades i Tanner, 2003). U hepatocitima, veliki broj lekova, poput steroida, antihistaminika, barbiturata i antikonvulziva, kao i toksičnih susptanci, podleže procesima oksidacije, metilacije ili konjugacije, što će ih najčešće inaktivirati. Ovi procesi uglavnom uključuju angažovanje enzima glER i peroksizoma (Anđelković i sar., 2001).
6. Jetra fetusa predstavlja važno mesto hematopoeze (Standring, 2008).

Obavljanje navedenih funkcija ističe značaj jetre kao organa čije je adekvatno funkcionisanje ključno u održavanju homeostaze organizma (Rhoades i Tanner, 2003; Standring, 2008), obzirom da svojom aktivnošću, ona snabdeva organizam nutrijentima i energijom neophodnim za metaboličke procese, dok nepotrebne i (potencijalno) toksične supstance eliminiše iz organizma (Rhoades i Tanner, 2003).

1.2. AKRILAMID

Akrilamid (AA) [CAS No. **79-06-01**, EC No. **201-173-7**] je do početka XXI veka prvenstveno bio poznat kao hemijska supstanca od industrijskog značaja. Dobijao se veštačkim putem, u reakciji hidratacije akrilonitrila, a početak njegove proizvodnje vezuje se za period '50.-tih godina XX veka. Monomer AA poznat je i pod sinonimima: *2-propenamid*, *amid propionske kiseline*, *vinil amid*, *etilenkarboksiamid* i *amid akrilne kiseline* (Sl. 1.2.1) (Carere, 2006).



Slika 1.2.1. Strukturna formula akrilamida (Preuzeto uz modifikacije: www.blogspot.com//acrylamide)

Ubrzo nakon početka njegove industrijske proizvodnje, usledila su istraživanja o biološkim manifestacijama vezanim za delovanje AA na ćelije, tkiva i organizme (McCollister i sar., 1964).

1.2.1 Fizičko-hemijska svojstva

Na sobnoj temperaturi, AA je čvrsta, bela kristalna supstanca, bez mirisa. Molekulska formula AA glasi: C_3H_5NO , a hemijska: $CH_2=CH-CO-NH_2$. Njegova molekulska težina iznosi: 71,08 g/mol, gustina: 1,27 g/l (25 °C), tačka topljenja: $84,5 \pm 3$ °C, a tačka ključanja oko 136 °C na 3,3 kPa/25 mm Hg (živinog stuba). AA je slabo isparljiv, pri čemu je njegova isparljivost: 0,007 mm Hg na 25 °C; 0,03 mm Hg na 40 °C; 0,07 mm Hg na 50 °C; 0,14 mm Hg na 55 °C (Norris, 1967; American Cyanamid, 1969; Habermann, 1991; German Federal Environment Agency, 2008). Veoma se dobro rastvara u vodi (2,155 g/l na 30 °C) i polarnim rastvaračima kao što su: aceton, metanol, dimetiletar i etanol, dok je u nepolarnim rastvaračima: ugljen tetrahlorid, benzen i heptan - praktično nerastvorljiv (Tab. 1.2.1) (American Cyanamid, 1969; Habermann, 1991).

Hemijski, AA predstavlja neutralan, visoko polaran, α,β -nezasićen amid sa dva reaktivna mesta: konjugovanom dvostrukom vezom i amidnom grupom, koje ga čine veoma reaktivnim (Sl. 1.2.1). Dvostruka veza u molekulu ima elektrofilni karakter i učestvuje u nukleofilnim reakcijama u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Sulfohidrilne ili tiol grupe (SH) i amino

grupe (NH₂) prisutne u aminokiselinama i proteinima predstavljaju funkcionalne grupe sa aktivnim vodonikom (H) i one su glavna ciljna mesta reakcije AA sa komponentama živog sistema (Friedman, 2003). Istraživanja su pokazala da AA može izvršiti alkilovanje SH i/ili NH₂ grupa proteina (Friedman, 1967).

Monomeri AA u velikoj meri polimerizuju pri temperaturama bliskim tački topljenja ili pod UV zracima. Čvrst AA je stabilan na sobnoj temperaturi, ali može naglo polimerizovati prilikom topljenja ili u kontaktu sa oksidujućim reagensima. Izlaganje AA ekstremnom pH ili njegovim zagrevanjem dolazi do njegove razgradnje i emisije akrilnih para i oksida azota (Friedman, 2003).

Tabela 1.2.1. Rastvorljivost AA u različitim rastvaračima
(American Cyanamid, 1969, Habermann, 1991)

RASTVARAČ	g/100 ml na 30 °C	RASTVARAČ	g/100 ml na 30 °C
Voda	215,5	Etilen glikol	31
Metanol	155	Dioksan	30
Dimetil sulfoksid	124	Etil acetat	12,6
Dimetil formamid	119	Hloroform	2,66
Etanol	86,2	1,2-Dihloroetan	1,50
Aceton	63,1	Benzen	0,35
Piridin	61,9	Ugljen tetrahlorid	0,038
Acetonitril	39,6	<i>n</i> -Heptan	0,0068

1.2.2 Primena

Primarna, i ujedno najčešća, namena AA je sinteza njegovih polimernih formi, odnosno poliakrilamida (PAM) i kopolimera AA. Od početka njegove proizvodnje pa do danas, primena AA se proširila na različite domene savremene industrije i nauke (JECFA, 2005; Carere, 2006).

PAM se najčešće upotrebljavaju kao flokulanti za prečišćavanje pijaće vode, tretman gradskih i industrijskih otpadnih voda, u procesu obrade ruda i minerala, kao hemijski zgušnjivači i stabilizatori zemljišta tokom konstrukcije tunela, pri izgradnji kanalizacija, rezervoara, u cementu: povećava snagu; čvrstoću, sprečava dehidrataciju, CH₃-poli-AA uz tretman radijacije daje vodootporan beton, kao gelirajući agensi u eksplozivima (Spencer i Schaumburg, 1974; Tilson, 1981; US EPA, 1988).

Monomer AA se koristi u uljnoj industriji kao agens za kontrolisanje protoka, a da bi se povećao stepen proizvodnje ulja (Friedman, 2008). Pored toga, AA i PAM se koriste u sintezi boja, organskih hemikalija, za produkciju herbicida, u tekstilnoj (engl. „*shrink-proof*“ materijali) i papirnoj industriji, za rafinisanje šećera, u vidu aditiva koji se dodaju prehrambenim proizvodima, kao kopolimeri pri izradi kontaktnih sočiva, dentalnih „*fixtura*“, kozmetičkih proizvoda, u preparatima za kosu, sredstvima za higijenu, losionima pre brijanja, vodenim repelentima, lateksnim zgušnjivačima, emulzionim stabilizatorima, u adhezivnim trakama itd. (IARC, 1994).

Savremene naučno-istraživačke, kliničke, forenzičke i biotehnoške laboratorije koriste PAM gelove kao čvrste matrikse za elektroforezu prilikom separacije proteina i nukleinskih kiselina (Carere, 2006). Sam monomer AA ima primenu u istraživačke svrhe kao alkilujući agens. Koristi za izučavanje strukture i funkcije proteina, obzirom da vrši selektivnu modifikaciju SH grupa. Tako na primer, nekovalentnim vezivanjem AA sa reziduama triptofana dolazi do prigušivanja fluorescencije ove aminokiseline, što se koristi prilikom izučavanja stukture i funkcije proteina, kao i njihove prostorne konfiguracije, odnosno „*savijanja*“ (engl. *protein folding*) (Friedman, 2003).

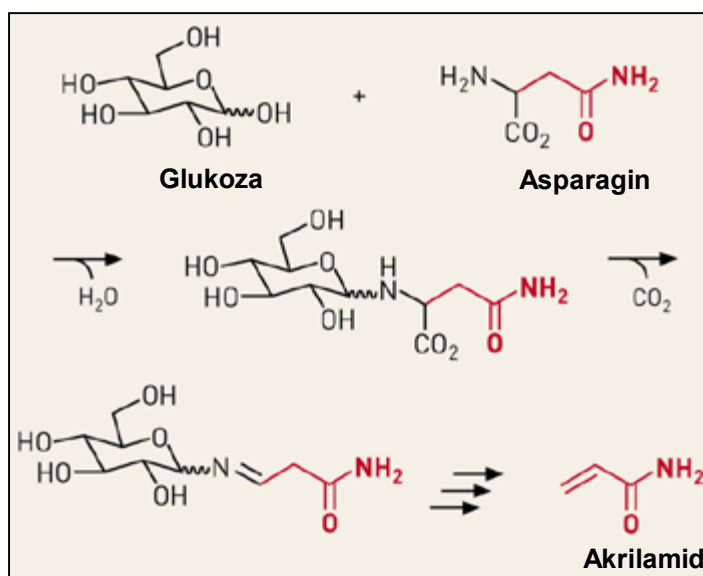
1.2.3 Spontano formiranje akrilamida u hrani

Pored sintetskog načina dobijanja, AA može spontano nastati i u prehrambenim proizvodima, kao nusprodukt. Hipoteza o prisustvu AA u hrani prvi put je plasirana 2000. godine (Tereke i sar., 2000). Švedski istraživači su objavili da se AA formira u velikom broju prehrambenih proizvoda (čips, pomfri, pržene i/ili pečene žitarice) ukoliko se namirnice pripremaju na temperaturama iznad 120 °C (SNFA, 2002; Tereke i sar., 2002). Ubrzo su ovi podaci potvrđeni u nekoliko drugih evopskih zemalja i u Sjedinjenim Američkim Državama.

Formiranje AA u namirnicama je rezultat neenzimatske tzv. Maillard-ove reakcije ili tzv. „*reakcije dobijanja smeđih komponenti*“ (engl. *browning reaction*) (Friedman, 2003; 2008). Do ove reakcije dolazi u uslovima adekvatne kombinacije ugljenih-hidrata, lipida i proteina, pod relativno visokim temperaturnim uslovima. Osnovni supstrati za formiranje AA u hrani su aminokiselina asparagin i redukujući šećer, najčešće glukoza ili fruktoza (Sl. 1.2.2). Pri temperaturama ≥ 120 °C slobodna NH_2 grupa asparagina reaguje sa COOH grupom glukoze čime će se stvoriti monomer AA (Friedman, 2003; 2008). Pored asparagina, koji je ključna komponenta za formiranje AA, relativno male količine ovog monomera mogu nastati

i od drugih aminokiselina kao što su: alanin, arginin, aspartamska kiselina, cistein, glutamin, metionin, treonin i valin (Sohn i Ho, 1995; Ezeji i sar., 2003).

Formiranje AA predstavlja reakciju zavisnu od temperature, pri čemu u temperaturnom intervalu od 120 °C do 170 °C formiranje AA raste, a zatim opada (Stadler i sar., 2002). Pored toga, formiranje AA je zabeleženo prilikom prženja krompira na temperaturama ispod 120 °C, pri uslovima prolongiranog zagrevanja (Gökmen i Senyuva, 2006). Zagrevanjem jednakih količina asparagina i glukoze na 180 °C, tokom 30 min. formirano je 368 μmol AA/mol asparagina (Stadler i sar., 2002). Dodavanjem vode u reaktivnu smešu nivo stvorenog AA se povećao na 960 μmol AA/mol asparagina. Ovime je pokazano da količina vode može bitno menjati stepen formiranja AA u namirnicama.



Slika 1.2.2. Formiranje akrilamida iz asparagina i glukoze (Preuzeto uz modifikacije: www.pubs.acs.org)

Dugogodišnjom upotrebom AA u industriji i istraživačkim laboratorijama je uočeno da monomer AA može imati višestruko štetne posledice po zdravlje ljudi i životinja. Ipak, dugo vremena se smatralo da su glavni izvori kontakta ljudi sa AA limitirani na radno okruženje ili slučajnu akutnu intoksikaciju njegovim monomerima. Nakon dokazanog prisustva u hrani 2002. godine, AA je izazvao veliku pažnju svetske naučne i stručne javnosti usled potencijalno štetnih posledica po zdravlje celokupne ljudske populacije (FAO/WHO, 2002).

1.3. IZLOŽENOST AKRILAMIDU

Hipoteza o prisustvu AA u hrani prvi put je plasirana od strane švedskih istraživača 2000. godine (Tareke i sar., 2000), a dokazana 2002. godine, kada je otkriveno značajno prisustvo AA u termički obrađenim namirnicama (SNFA, 2002; Tareke i sar., 2002). Sve do tada, radno okruženje i/ili kontaminirana voda smatrani su glavnim načinima izlaganja ljudi i životinja monomeroj formi AA.

Naime, istraživanja *Swedish National Food Agency* (SNFA) i Univerziteta u Stokholmu su zabeležila relativno visok nivo AA u termički obrađenim prehrambenim proizvodima (SNFA, 2002; Tereke, i sar., 2002; FAO/WHO, 2002). Detektovani nivoi AA su bili iznad onih koji su preporučeni od strane Svetske zdravstvene organizacije (*World Health Organization*, WHO) za pijaću vodu, koji iznosi 0,5 µg/l, što odgovara 1 µg AA na dan po osobi (WHO, 1996). Neke od analiziranih namirnica su imale i do 500 puta veći nivo AA od nivoa propisanog od strane WHO (Lofstedt, 2003). Pojedine studije su zabeležile da nivo ovog monomera u biljnoj hrani, prethodno zagrevanoj na visokim temperaturama, može dostići i do 3 mg/kg (Friedman, 2008).

Nakon dokazanog prisustva u hrani, ovaj način izlaganja ljudi AA sve više dobija primat, obzirom da se tako potencijalno ugrožava kompletna ljudska populacija. Danas se najčešćim i najrizičnijim načinima izlaganja ljudi monomeru AA smatraju radno okruženje i/ili konzumiranje namirnica bogatih AA.

1.3.1 Radna sredina kao izvor akrilamida

U radnom okruženju ljudi dolaze u kontakt sa monomernom formom AA prilikom njegove same sinteze, sinteze PAM ili u toku laboratorijske preparacije PAM gelova, prilikom izvođenja građevinskih radova itd. (Carere, 2006). Najčešći način ulaska AA u telo je dermalna absorpcija iz rastvora, inhalacija suvog monomera, prašine ili aerosola prilikom manipulacije samom hemikalijom (US Department Of Health and Human Services Public Health Service, 2009).

Izloženost ljudi AA zavisi od njegovog prisustva u radnom okruženju, ali i od agregatnog stanja u kome se molekul AA nalazi. Tako je, na primer, vazдушna koncentracija AA u laboratoriji gde se pripremaju PAM gelovi nakon 15 min. rada sa kristalnim AA bila 7,20 µg/m³,

dok je pri radu sa rastvorenim AA iznosila $5,81 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Pantusa i sar., 2002). U fabrikama sinteze monomera AA, koncentracije ovog molekula u vazduhu, takođe, variraju. Tako, u pojedinim fabrikama, izmerene koncentracije AA u neposrednoj radnoj okolini radnika, ne prelaze $0,3 \text{ mg}/\text{m}^3$, dok se u drugim mogu kretati u intervalu od $0,1$ do $3,6 \text{ mg}/\text{m}^3$ AA (IARC, 1986).

1.3.2 Akrilamid u životnoj sredini

Visoka reaktivnost, hidrosolubilnost, sposobnost polimerizacije i druge fizičko-hemijske karakteristike AA pokazale su se veoma korisnim u okviru različitih grana savremene nauke i industrije. Iz tog razloga je upotreba ovog molekula kontinuirano rasla od početka njegove proizvodnje do danas. Međutim, paralelno sa sve većom primenom AA, rastao je i rizik od pojave ovog molekula u spoljašnjoj sredini, pri čemu bi se sve prethodno navedene korisne osobine, sada mogle odraziti u negativnom svetlu po životnu sredinu i žive organizme.

Naime, AA može dospeti u prirodnu na različite načine. Prečišćavanje pijaće vode procesom flokulacije uz upotrebu PAM-a može dovesti do kontaminacije vode monomerima AA. Glavni uzrok ovome je otpuštanje rezidua AA prisutnih u sastavu PAM (CAREX, 2010). Pored toga, industrija plastike i boja može biti značajan izvor oslobađanja AA u zemljište. Sam monomer nije perzistentan u okolini, karakteriše se visokom hidrosolubilnošću i mobilnošću u vodenj i terestričnoj sredini, a retko se nalazi u sastavu atmosfere (CAREX, 2010). Kada se nađe u spoljašnjoj sredini, svetlost, toplota i drugi spoljašnji uslovi značajno utiču na depolimerizaciju PAM i razgradnju AA (Smith i sar., 1996). Monomeri AA može biti nošen na velike dubine i dospeti do podzemnih voda, zadržava se u stenama i tamo je prilično postojan. Međutim, u površinskim vodama i zemljištu (sedimenti, blato) AA lako podleže biodegradaciji usled delovanja UV zraka iz Sunčeve svetlosti, pa se tu ne očekuje njegova značajna bioakumulacija. Razgradnjom AA dolazi do oslobađanja akrilnih para, pri čemu se u reakciji sa Sunčevom svetlošću oslobađaju slobodni hidroksilni radikali (OH^\bullet) (Smith i sar., 1996; Friedman, 2003; CAREX, 2010). Sposobnost razgradnje AA ima i veliki broj mikroorganizama, pri čemu nastalu akrilnu kiselinu i amonijak (NH_3) mogu koristiti kao izvor atoma ugljenika (C) i azota (N) (Friedman, 2003).

1.3.3 Akrilamid u hrani

Konsumiranje hrane koja sadrži AA se smatra jednim od najčešćih načina izloženosti opšte populacije ovom monomeru. Prehrambene navike savremenog društva karakteriše relativno visok stepen konzumiranja namirnica koje su bogate ugljenim hidratima, a pri tome se i pripremaju na visokim temperaturama.

Termička obrada namirnica predstavlja veoma čest i komercijalan način pripreme hrane. Reakcija dobijanja smeđih komponenti se često koristi u prehrambenoj industriji u cilju postizanja željenih organo-leptičkih karakteristika namirnica koje se termički obrađuju (Tereke i sar., 2000; Coughlin, 2003). Zagrevanje hrane na visokim temperaturama (pečenje, prženje ili grilovanje), uz prisustvo vode, dovodi do formiranja tzv. Maillard-ovih smeđih komponenti koje doprinose stvaranju željene teksture, arome, ukusa i boje (Friedman, 2008). Međutim, u ovim uslovima se, kao nusprodukt, može stvarati i AA, čime se menja kvalitet hrane (Friedman, 2008).

U namirnicama bogatim ugljenim hidratima pripremanim na temperaturama iznad 120 °C otkrivene su relativno visoke količine AA (i do reda veličine mg/kg), dok u sirovim namirnicama ili namirnicama kuvanim u ključaloj vodi prisustvo AA nije zabeleženo (Tereke i sar., 2002). Analizom različitih vrsta namirnica, koje su prethodno bile zagrevane, zabeleženo je da se u hrani bogatoj proteinima nivo AA kretao između 5-50 µg/kg, dok je u hrani bogatoj ugljenim hidratima taj nivo bio 150-4000 µg/kg (Tereke i sar., 2002).

Koncentracije AA u hrani variraju u zavisnosti od tipa hrane, sadržaja prekursora AA i vode, debljine namirnice, ali i od uslova same pripreme: temperature, dužine zagrevanja, prirode ulja za prženje i sl. (Friedman, 2003). Hrana bogata prekursorima AA uglavnom je biljnog porekla (krompir, pšenica, pirinač, raž itd.). Po pravilu se najveće količine AA formiraju grilovanjem, prženjem ili pečenjem hrane bogate ugljenim hidratima, prvenstveno skrobom, kao što je to slučaj sa krompirom (US Department Of Health and Human Services Public Health Service, 2009).

Neke od namirnica u kojima je detektovano prisustvo AA su: žitarice, riba i morski plodovi, meso, mleko i mlečni proizvodi, orah, badem, masline, krompir (pire, pečeni, kroketi,

čips), povrće (sveže, kuvano, konzervirano, pečeno, prženo, grilovano), voće (dehidrirano, prženo), začini, kafa (instant, pržena, ekstrakti kafe, kafa bez kofeina), kakao proizvodi, zeleni čaj, šećer, med, čokolada, pića (pivo, džin, vino), hrana za bebe (u teglicama, limenkama, u prahu, biskviti). Prerađeni prehrambeni proizvodi sa najvećim sadržajem AA uključuju pomfri, čips, hleb, dvopek, grisine, krekeri i sl. (Friedman, 2003). Sadržaj AA u pojedinim namirnicama je prikazan u Tabeli 3.1.

Tabela 1.3.1. Sadržaj AA u pojedinim prehrambenim proizvodima (Freidman, 2003)

NAMIRNICA	AA [µg/kg = ppb*]	NAMIRNICA	AA [µg/kg = ppb*]
Bademi, prženi	260	Riblji proizvodi	30-39
Špargla, pržena	143	Meso i mesni proizvodi	30-64
Pečeni proizvodi: hleb, peciva, kolači, keks, glazirani slatkiši, perece	70-430	Dehidrirani koncentrat za supe, sos, krem	1184
Pivo i slad	30-70	Lešnici, orasi, puter od orašastih plodova	64-457
Biskviti, krekeri	30-3200	Kikiriki, glazirani	140
Žitarice kao sastojak doručka	30-1346	Krompir, kuvani	48
Čokolada u prahu	15-90	Krompir, čips	170-3700
Mlevena kafa	170-351	Krompir, pomfri	200-12000
Kukuruzni čips	34-416	Krompir, duboko prženi	1270
Dvopek	800-1200	Razne grickalice	30-1915
Medenjaci, licitarski kolači	90-1660	Soja, pržena	25
Tortilje, kuvane	559	Seme suncokreta, prženo	66

*ppb - 1 deo na 1.000.000.000 delova (engl. parts per billion)

Nađeno je da oko 40% svih namirnica koje se koriste u ishrani sadrže AA, kao i da njegov nivo može značajno varirati među pojedinim prehrambenim proizvodima (EFSA, 2012; Pedreschi i sar., 2014). Tako, u nekim proizvodima kao što su kafa i licitarski kolači, sadržaj AA premašuje onaj zabeležen u prženim krompirima (EFSA, 2012; Pedreschi i sar., 2014).

Prosečan dnevni unos AA za opštu populaciju je 2002. godine procenjen na 0,3 do 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg tm}$, što korespondira količini od 21 do 56 μg AA dnevno za osobu čija telesna masa iznosi oko 70 kg (FAO/WHO, 2002; JCR, 2002). Već 2005. godine očekivani dnevni unos AA je u proseku iznosio 0,3 do 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg tm}$, što odgovara količini od 21 do 140 μg AA dnevno za osobu od 70 kg. Kod osoba sa povećanim konzumiranjem namirnica koje sadrže AA, unos se kretao od 0,6-3,5 $\mu\text{g}/\text{kg tm/dan AA}$, pa i do 5,1 $\mu\text{g}/\text{kg tm/dan AA}$ (JECFA, 2005).

Dnevni unos AA može značano varirati među pojedinim populacijama. Tako je kod Švedana procenjen dnevni unos AA oko 35 μg (Svensson i sar., 2003), dok je kod Nemaca on procenjen na oko 60 μg (Schettgen i sar., 2003). Istraživanje u Sjedinjenim Američkim Državama sprovedeno na bazi prehrambenih navika ljudi u toj državi je pokazalo da 40% svih namirnica sadrži AA (Petersen, 2002). Procenjeno je da hrana koja sadrži visok nivo AA čini i do 38% ukupnog dnevnog unosa kalorija, 36% unosa vlakana i više od 25% unosa mikronutrijenata (Petersen i Tran, 2005).

Važno je naglasiti da populacija dece čini deo društva kod koga se nivo unosa AA procenjuje većim čak 2 do 3 puta u odnosu na onaj kod odraslih (FAO/WHO, 2002; JCR, 2002). Analizom sadržaja AA u hrani i na bazi podataka vezanih za konzumiranje hrane, prosečan dnevni unos AA u okviru mlade populacije (posebno dece i adolescenata) se kreće i do 3,4 $\mu\text{g}/\text{kg tm}$ (Dybing i Sanner, 2003; Konings i sar., 2003; Dybing i sar., 2005), što je značajno više u odnosu na procenjenih 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg tm}$ AA kod odraslih osoba (Dybing i Sanner, 2003; Konings i sar., 2003; Svensson i sar., 2003; Dybing i sar., 2005). Ukupnom unosu AA kod dece u najvećoj meri dorpinose grisini, grickalice, čips i pomfri, čak i do 89% od ukupnog procenjenog unosa AA (Kütting i sar., 2008).

Monomemi AA se može naći u ulju nakon što je ono bilo upotrebljeno za prženje hrane (FAO/WHO, 2005; Hays i Aylward, 2008). Prema tome, recikliranje i ponovna upotreba takvog ulja može biti potencijalno štetna za zdravlje. Pored hrane, AA je identifikovan kao komponenta duvanskog dima, što ukazuje na potencijal njegovog formiranja tokom zagrevanja biološkog materijala (IARC, 1994, Smith i sar., 2000; Urban i sar., 2006). Pokazano je da duvanski dim predstavlja značajan izvor ovog ksenobiotika (Boettcher i sar., 2005; Kütting i sar., 2009). Procenjuje se da dim jedne cigarete može sadržati 1-2 μg AA, pa se za čoveka prosečne telesne

mase oko 70 kg, koji u proseku popuši oko 20 cigareta dnevno, količina inhaliranog AA putem dima kreće oko 0,67 $\mu\text{g/kg tm/dan}$ (NTP-CERHR, 2005).

Na osnovu dostupnih informacija, hrana predstavlja glavni način ekspozicije opšte populacije monomernom AA. Do danas, u svetu nije definisan dozvoljeni limit unosa AA putem hrane (Krishnakumar i Visvanathan, 2014). Radi komparacije, prosečan unos AA putem hrane se kreće oko 0,5 $\mu\text{g/kg tm/dan}$ (Svensson i sar., 2003; Konings i sar., 2003; Bjellaas i sar., 2007), izloženost osoba monomernom AA na radnom mestu se kreće oko 1 $\mu\text{g/kg tm/dan}$, dok se inahalacijom duvanskog dima unosi oko 3 $\mu\text{g/kg tm/dan}$ AA (Bergmark, 1997).

1.3.4 Strategije za redukovanje količine akrilamida u hrani

Internacionalne agencije za monitoring hrane u saradnji sa prehrambenom industrijom (*Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition/National Center for Food Safety and Technology*, JIFSAN/NCFST/FDA) su predložile nekoliko strategija za minimalizaciju sadržaja AA u namirnicama. Postupci obuhvataju modifikaciju klasičnih prerađivačkih metoda (Friedman i Levin, 2008):

1. Selekcija biljaka koje sadrže nizak nivo asparagina i glukoze, inače prekursora AA
2. Uklanjanje prekursora AA pre početka prerađivačkog procesa
3. Upotreba enzima asparaginaze koja bi hidrolizovala asparagin na asparaginsku kiselinu
4. Selekcija i kontrola prerađivačkih uslova: skraćanje vremena kuvanja, snižavanje temperature i redukcija pH, čime bi se minimalizovao stepen formiranja AA
5. Dodavanje sastojaka za koje je pokazano da redukuju formiranje AA, kao na primer: aminokiseline, antioksidanti, neredukujući ugljeni hidrati, komponente belog luka, proteini i proteinski hidrolizati, soli metala
 - Aminokiseline i peptidi koji imaju SH funkcionalne grupe (npr. cistein, glutation) imaju dobra antioksidantna i antitoksična svojstva. Kao takve, imaju sposobnost delovanja kao redukujući agensi, „zamke“ za slobodne radikale (reaktivne kiseonične vrste; ROS), kao jaki nukleofili koji bi „hvatali“ elektrofile i njihove intermedijerne forme i pokretali detoksifikujuće procese u ćeliji (Friedman, 2003).

Primenom ovakvih molekula mogla bi se limitirati reakcija stvaranja Maillard-ovih smeđih komponenti.

- Pokazano je da dodavanje mono- i dvovalentnih jona poput Na^+ , Ca^{2+} ili Mg^{2+} u testo postiže veoma dobar efekat redukcije formiranja AA (Elder i sar., 2004). Ovi joni interaguju sa asparaginom i time onemogućavaju stvaranje molekula intermedijera koji bi finalno doveli do formiranja AA (Tomoda i sar., 2004; Kolek i sar., 2006; Gokmen i Senyuva, 2007).

6. Uklanjanje formiranog AA iz namirnica metodama hromatografije, evaporizacije, polimerizacije ili reakcijom sa drugim sastojcima hrane

Pored pomenutih metoda, naučnici kontinuirano razmatraju nove načine kako bi se na što efikasniji način eliminisalo ili minimizovalo prisustvo AA u hrani. Nađeno je da mikroorganizmi poput: *Rhodococcus rhodochrous*, *Nocardia*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas stutzeri* imaju set enzima koji mogu katalisati sintezu i razgradnju AA. U enzime za sintezu AA spadaju: nitril hidrataza, glutamin sintaza i dehidrogenaza, dok je za razgradnju AA najprominentnija aktivnost amidaze (Friedman, 2003). Ovi podaci sugerišu na potencijalno korišćenje određenih bakterija ili njihovih enzima u cilju smanjenja nivoa AA, kako u namirnicama, tako i u digestivnom traktu nakon konzumiranja hrane (Friedman, 2003).

Osnovni princip većine navedenih metoda je limitiranje Maillard-ove reakcije. Na ovaj način se redukuje stepen formiranja AA u namirnicama, ali se kompromituju boja i ukus finalnih proizvoda što predstavlja značajan problem sa komercijalnog aspekta u prehrambenoj industriji (Muttucumaru i sar., 2008).

1.4. APSORPCIJA, DISTRIBUCIJA, METABOLIZAM I ELIMINACIJA AKRILAMIDA

Svaki kontakt organizma sa AA nosi značajan rizik. Bez obzira na način kontakta sa monomernim AA, istraživanja pokazuju da on veoma lako ulazi u organizam, a zatim se efikasno distribuira do svih tkiva, što se prvenstveno pripisuje njegovoj visokoj hidrosolubilnosti.

Najznačajnije rute ulaska AA u organizam uključuju:

1. *Digestivni trakt (ingestija)* - konzumiranjem namirnica pripremanih na visokim temperaturama (posebno krompir, žitarice i njihove prerađevine bogate škrobom - pomfri, čips) ili pijaćom vodom koja je kontaminirana monomerima AA,
2. *Respiratorni trakt (inhalacija)* - prilikom procesa sinteze i manipulacije AA, pri održavanju odvodnih kanala ili inhalacijom duvanskog dima,
3. *Kožu (transdermalno)* - kod građevinskih radnika koji vrše popravku odvodnih cevi, preko kozmetičkih proizvoda, pri formiranju PAM gelova u laboratorijama, upotrebom kozmetičkih proizvoda koji u svom sastavu imaju AA.

1.4.1 Apsorpcija i distribucija

AA se efikasno apsorbuje sa mukoznih površina digestivnog i respiratornog trakta, dok je njegova apsorpcija preko kože manje efikasna. Procenjena bioraspodivnost AA nakon njegovog unosa putem hrane kreće se od 30% do 44%, dok se nakon unosa u vidu vodenog rastvora ona kreće 60% do 98% (Doerge i sar., 2005b). Dermalna apsorpcija AA se odvija u manjem stepenu i procenjuje se na 6,6% od ekvivalentne doze primenjene oralno (Fennell i sar., 2006).

Na bazi eksperimentalnih podataka dobijenih izlaganjem laboratorijskih životinja ovom ksenobiotiku, AA se, nakon oralne aplikacije, veoma brzo i efikasno apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, resorbuje u krv, a potom ravnomerno distribuira do svih tkiva u organizmu (Edwards, 1975; Miller i sar., 1982; JECFA, 2005). *In vitro* studije na CaCo-2 ćelijskim kulturama sugerušu da se brza apsorpcija monomernog AA odvija mehanizmom pasivne difuzije (Schabacker i sar., 2004; Zodl i sar., 2007).

Kada se nađe u krvi, AA formira tzv. „adukte“ AA sa serumskim proteinima, a prvenstveno sa hemoglobinom (Hb) (IARC, 1994; Bergmark, 1997; Carere, 2006). „Adukti“ nastaju pri reakciji α -NH₂ grupe valina na N-terminusu Hb sa AA ili njegovim reaktivnim metabolitom, glicidamidom (GA) (Perez i sar., 1999; Friedman, 2003). Količine slobodnog AA u serumu su vrlo male (<0,5% od doze), što ukazuje na visok afinitet vezivanja AA za Hb i druge serumske proteine (Miller i sar., 1982).

Toksikološka ispitivanja su pokazala da je poluživot AA u organizmu relativno kratak. Tako je njegov poluživot u ljudskoj krvi, nakon aplikacije 20 mg/kg tm AA, bio oko 0,79 h (Kopp i Dekant, 2009), a njegov ukupan poluživot u organizmu između 2,2-7,0 h (Fuhr i sar., 2006). U serumu pacova, nakon aplikacije 50 mg/kg, poluživot AA, je bio 0,73 h, a njegov ukupan poluživot u organizmu iznosio oko 2,8 h (Friedman, 2003).

Sánchez i sar. (2008) su ukazali da je kod pacova nivo „AA-Hb adukata“, nakon jedne doze AA, zavistan od pola i starosti. Ženke pacova su posle ingestije vodenog rastvora AA u dozi 25 ili 100 mg/kg tm imale veće nivoe „AA-Hb adukata“ u odnosu na mužjake (Sánchez i sar., 2008). Stepen razlika u nivoima „AA-Hb adukata“ je bio veći pri dozi od 25 mg/kg tm AA u odnosu na 100 mg/kg tm AA. Rezultati sugerišu da mužjaci pacova imaju sporiju apsorpciju AA nego ženke, kao i da su te razlike evidentnije pri nižim dozama AA (Sánchez i sar., 2008). Bioraspoloživost AA je značajno veća kod ženki posebno ukoliko su akutno tretirane AA putem vodenog rastvora (Doerge i sar., 2005a; 2005b). Treba napomenuti da su razlike u nivou „AA-Hb adukata“ između mužjaka i ženki zabeležene jedino nakon ingestije vodenog rastvora AA. Nasuprot tome, nakon unosa AA putem hrane ili *i.v.* injekcije AA, razlike u nivou „adukata“ između mužjaka i ženki nisu uočene (Sánchez i sar., 2008).

Ukoliko se AA unosi putem hrane, smatra se da matriks samih namirnica može značajno uticati na apsorpciju AA. Kod ženki pacova unos AA putem hrane može smanjiti apsolutnu bioraspoloživost AA u odnosu na bioraspoloživost koja je zabeležena nakon ingestije vodenog rastvora AA (Doerge i sar., 2005b). Za mužjake pacova je uočeno da su imali veći nivo „AA-Hb adukata“ nakon unosa AA putem hrane ili *i.v.* injekcije AA u odnosu na nivoe „adukata“ nakon ingestije AA rastvorenog u vodi (Sánchez i sar., 2008). Ovakav nalaz se smatra posledicom bržeg prolaska vode kroz crevni trakt u odnosu na čvrstu hranu (Sánchez i sar., 2008). Nije poznato da

li se ovakve polno-zavisne razlike u apsorpciji i bioraspoloživosti AA kod pacova mogu ekstrapolirati i na ljudsku populaciju (Sánchez i sar., 2008).

Takođe je pokazano da mlađi pacovi, starosti oko 1,5 mesec, imaju veći nivo „AA-Hb adukata” u odnosu na životinje stare 14 meseci nakon što su tretirane jednom dozom AA od 25 ili 100 mg/kg tm AA (Sánchez i sar., 2008). Ovakav efekat može biti posledica različitog stepena apsorpcije AA u gastro-intestinalnom traktu, kao i razlike u broju eritrocita i koncentraciji Hb između mlađih i starijih pacova. Naime, pokazano je da mlađi pacovi imaju veći broj eritrocita i veću koncentraciju Hb u odnosu na adulte (Temiz Artmann i sar., 2006). Ukoliko se ovakav trend može ekstrapolisati na ljude, navedeni rezultati naglašavaju značaj kontrolisanog unosa hrane bogate AA tokom ranog životnog doba. Prema tome, povećana izloženost mlađih AA kao rezultat njegovog većeg unosa, može biti dodatno naglašena i njegovom povećanom apsorpcijom (Sánchez i sar., 2008).

Eksperimenti na pacovima, miševima, zamorcima, psima i svinjama su pokazali da se AA brzo distribuira u organizmu, da se podjednako efikasno raspoređuje po svim tkivima, uključujući i testise, prolazi fetoplacentalnu barijeru i tako dolazi do fetusa (JECFA, 2005; Parzefall, 2008). Pokazano je prisustvo AA u majčinom mleku kod majki koje konzumiraju hranu bogatu AA (JECFA, 2005; Parzefall, 2008). Kod trudnica se procenjuje da 10-50% AA poreklom iz hrane, putem krvi, prođe kroz placentu do fetusa (Sorgel i sar., 2002).

1.4.2 Metabolizam

Jetra predstavlja centralni organ za metabolisanje, inaktivaciju, neutralizaciju i detoksifikaciju velikog broja ksenobiotika, među koje spada i AA. Kada se nađe u hepatocitima, sudbina AA se može odvijati na dva načina, pri čemu će oba finalno imati isti rezultat - stvaranje derivata merkapturične kiseline koji će, potom, biti odstranjeni iz organizma, i to u najvećoj meri putem urina (Sl. 1.4.1) (JECFA, 2005).

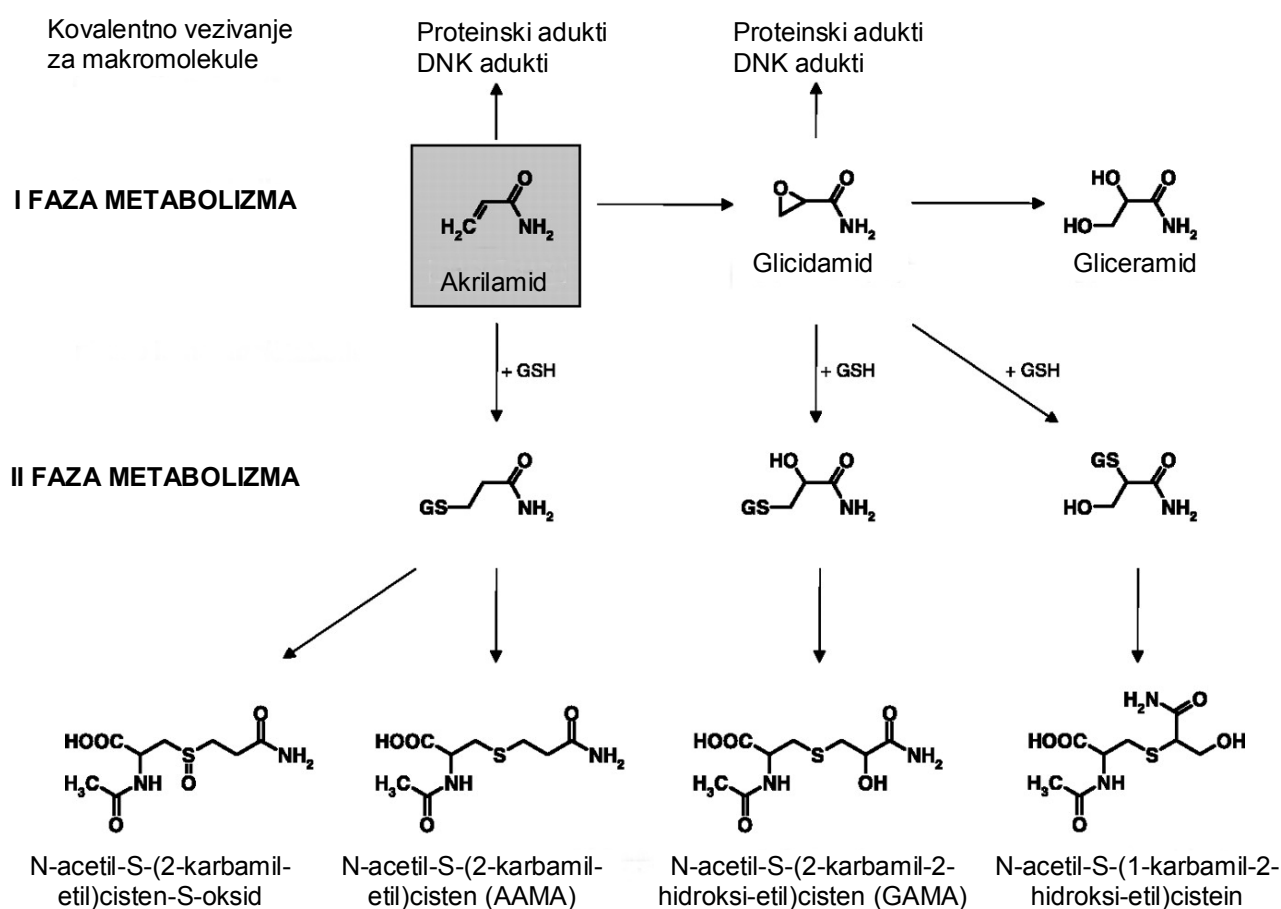
Jedan način metabolisanja AA je njegova inaktivacija preko konjugacije sa glutationom (GSH), čemu posreduje enzim glutation-S-transferaza (GST) (EC 2.5.1.18) (Sl. 1.4.1) (Sumner i sar., 1999; Settels i sar., 2008). Enzimi iz familije GST imaju važnu ulogu u procesima detoksifikacije jer katališu konjugaciju mnogih hidrofobnih i elektrofilnih komponenti

(kancerogenih supstanci, lekova, toksina, produkata oksidativnog stresa) sa GSH (<http://www.genecards.org/>).

Kada se nađe u hepatocitima, AA može biti direktno konjugovan sa GSH, što rezultira stvaranjem cistein-*S*-konjugata, tj. AA-GS. Formirani AA-GS konjugati podležu acetilaciji NH₂ grupe cisteinske rezidue posredstvom *N*-acetil-transferaze, pri čemu nastaju *N*-acetil-L-cistein-*S*-konjugati, tj. forme merkapturične kiseline (Hinchman i Ballatori, 1994). Direktnom konjugacijom AA sa GSH stvara se AAMA (metabolit AA i merkapturične kiseline), koji se iz organizma eliminiše preko urina (Sl. 1.4.1) (Sumner i sar., 1999; Settels i sar., 2008).

Drugi način metabolisanja je bioaktivacija AA, koja se odvija posredstvom katalitičke aktivnosti citohrom P450 2E1 enzima (CYP2E1) (EC 1.14.13) (Sl. 1.4.1) (Küting i sar., 2009). CYP2E1 spada u superfamiliju monooksigenaza citohrom P450, familija 2, subfamilija E, polipeptid 1 (EC 1.14.13). Ovaj enzim je lokalizovan na endoplazmatičnom retikulumu i indukuje ga etanol, dijabetes i gladovanje. On metaboliše mnoštvo endogenih (etanol, aceton, acetal, itd.) i egzogenih supstanci (benzen, ugljen-tetrahlorid, etilen glikol, mutagene nađene u dimu cigareta). Zbog širokog dijapazona substrata, pretpostavlja se da CYP2E1 enzim može biti uključen u procese od glukoneogeneze, ciroze jetre, dijabetesa do kancera (<http://www.genecards.org/>).

U slučaju bioaktivacije, AA podleže oksidaciji, pri čemu nastaje glicidamid (GA), epoksid koji je reaktivniji od AA (Sumner i sar., 1999; Settels i sar., 2008). Oksidacija AA u GA predstavlja bioaktivaciju „roditeljskog“ molekula (engl. *parent compound*), obzirom da je reaktivnost produkta reakcije (GA) veća u odnosu na AA. Eliminacija formiranog GA se, u najvećem delu, odvija putem konjugacije sa GSH, pri čemu nastaju GA-GS konjugati. U finalnoj fazi od ovih konjugata nastaju metaboliti GA i merkapturične kiseline (GAMA i *iso*-GAMA) i kao takvi se izlučuju putem urina (Sumner i sar., 1999; Settels i sar., 2008). U relativno manjoj meri, GA može podleći hidrolizi, katalisanoj od strane epoksid hidrolaze, kada nastaje gliceramid (Sl. 1.4.1) (Sumner i sar., 1992).



Slika 1.4.1. Metabolički put akrilamida u humanim hepatocitima. Pri ulasku u ćeliju, monomerna forma akrilamida i glicidamida ispoljavaju afinitet ka formiranju „adukata“ sa proteinima i DNK. I faza metabolizma: akrilamid može podleći direktnoj konjugaciji sa GSH i time formirati AA-GS konjugate, ili oksidaciji, pri čemu se formira njegov epoksid, glicidamid, a potom podleći konjugaciji sa GSH i dati GA-GS konjugate. II faza metabolizma: dolazi do daljih reakcija biotransformacije i stvaranja metabolita u formi derivata merkapturične kiseline, dominantno AAMA i GAMA, koji će putem urina biti eliminisani iz organizma. (Preuzeto uz modifikacije: www.cebp.aacrjournals.org).

Predominantnost jednog metaboličkog puta nad drugim, odnosno stepen konjugacije AA sa GSH i/ili njegova konverzija u GA, je species-specifična karakteristika, čineći da se osetljivost pojedinih vrsta na štetne posledice AA razlikuje u odnosu na druge (Shipp i sar., 2006). Istraživanja pokazuju da u jetri glodara prevladava oksidacija AA u GA, dok je kod ljudi to sporedni put metabolisanja AA (Fannell i sar., 2005). Pojedina istraživanja ukazuju da je metabolisanje AA sporije kod ljudi u odnosu na pacove (Kopp i Dekant, 2009).

Nakon oralne administracije 3 mg/kg tm AA, ljudski urin je imao oko 86% derivata nastalih konjugacijom AA sa GSH, dok su derivati GA činili oko 12% (Fennell i sar., 2005). Pored toga, molekul gliceramida je identifikovan kao glavni produkt epoksidacije AA, dok je GA

naden u malim količinama (Fennell i sar., 2005). Dakle, kod ljudi se direktna konjugacija AA sa GSH pokazala dominantnim metaboličkim putem, dok je njegova epoksidacija bila sporedna (Fennell i sar., 2005).

Razlike u stepenu oksidacije AA postoje i među glodarima. Nakon oralne administracije 50 mg/kg tm AA, urin pacova je imao oko 28% metabolita koji su derivati GA (Sumner i sar., 2003), dok je kod miševa ta količina bila oko 59% (Sumner i sar., 1992). Takođe, neka istraživanja na pacovima ukazuju da sa povećanjem doze AA opada procenat konverzije AA u GA (Young et al., 2007). Tako je kod pacova, nakon oralne aplikacije 3 mg/kg tm AA, u urinu identifikovano i do 41% metabolita koji su derivati GA, dok je pri dozi od 59 mg/kg tm AA, njihova količina pala na oko 28% (Sumner i sar., 2003). Pretpostavlja se da je razlog ovome saturacija epoksidacije AA, koja se javlja pri povećanju doze (Calleman i sar., 1992). Istraživanja sugerišu inverznu zavisnost konverzije AA u GA u odnosu na primenjenu dozu AA (Bergmark i sar., 1991; Calleman i sar., 1992).

Istraživanja su, takođe, zabeležila postojanje razlika u stepenu ekspresije, odnosno aktivnosti CYP2E1 enzima između sojeva pojedinih vrsta glodara (Hissink i sar., 1997; Denucci i sar., 2010). Tako je kod Fisher 344 pacova pokazana veća aktivnost CYP2E1 enzima u odnosu na Sprague-Dawley pacove (Hissink i sar., 1997), što bi za posledicu moglo imati različit stepen biotransformacije AA u GA. Istraživanje Denucci i sar. (2010) na adultnim mužjacima Fisher, Long Evans i Sprague-Dawley pacova pokazalo je da stepen ekspresije CYP2E1 enzima u jetri opada od Fisher ka Sprague-Dawley pacovima (Denucci i sar., 2010). Studija je pokazala da hronična izloženost etanolu kod Fisher pacova, kod kojih je inače pokazana najveća ekspresija CYP2E1 enzima, izaziva smanjenje njegove ekspresije, i može se tumačiti kao citoprotektivna reakcija hepatocita, obzirom da ovaj enzim promovise oksidativni stres, a njegov visok nivo ima citotoksičan efekat na hepatocite (Denucci i sar., 2010). Ekspresija CYP2E1 enzima nije bila promenjena etanolnim tretmanom kod Long Evans ili Sprague-Dawley pacova (Denucci i sar., 2010).

Aktivnost CYP2E1 enzima, koji posreduje bioaktivaciju AA, može indukovati hronična izloženost nekim lekovima i alkoholu. Osobe sa većom aktivnošću ovog enzima bi potencijalno mogle imati više nivoe serumskog GA i „GA-Hb adukata“ usled povećane konverzije AA u GA (Hays i Ayward, 2008). Međutim, istovremena izloženost AA i etanolu ili fenobarbitalu bi mogla

inhibirati metabolizam AA usled kompeticije ovih supstanci za CYP2E1 enzim. Prema tome, istovremena ekspozicija AA sa pomenutim ili drugim supstancama koje su u kompeticiji za CYP2E1 enzim može voditi ka prolongiranom povećanju koncentracije serumskog AA, povećanom formiranju „AA-Hb adukata“ i preusmeriti njegov metabolizam u smislu izlučivanja većih količina AAMA putem urina (Hays i Ayward, 2008).

Postoje indicije da bi i pol i starost mogli imati uticaja na kinetiku metabolizma AA (Hays i Ayward, 2008). Kod ženki pacova su uočeni viši nivoi serumskog GA i „GA-Hb adukata“ u odnosu na mužjake pri komparabilnim dozama AA (Tereke i sar., 2006). Kod ženki miševa je pokazano da se konstitutivni nivo ekspresije CYP2E1 gena u jetri menja u funkciji polnih hormona, odnosno određene faze estrusnog ciklusa, pa je tako njegova ekspresija veća u fazi estrusa, a manja u fazi metaestrusa (Konstandi, 2013). Nije poznato da li ovakve razlike postoje i kod ljudi.

Nekoliko studija na ljudima je pokazalo da je nivo CYP2E1 enzima u jetri tokom gestacije minimalan ili potpuno odsustvuje, da bi odmah nakon rođenja njegov nivo brzo porastao i potom bio praćen postepenim rastom do odraslog doba (Vieira i sar., 1996; Hakkola i sar., 1998; Johnsrud i sar., 2003). Ovaj nalaz se pokazao tačnim kod neonatalnih i adultnih miševa (Gamboa i sar., 2003). Kasnija istaživanja su potvrdila da se kod ljudi, u detinjstvu, enzim CYP2E1 ekspresuje u manjem stepenu u odnosu na stepen njegove ekspresije u odraslom dobu (Nong i sar., 2006). Prema tome, ukoliko GA izaziva mutacije na DNK, deca i omladina bi usled nižeg nivoa ekspresije CYP2E1 enzima imala niži stepen metaboličke konverzije AA u GA, a time i manji rizik od mutacija. S druge strane, tumorogeneza se javlja pri ekspoziciji visokim dozama AA i potencijalno je posredovana stimulacijom rasta. U ovakvoj situaciji, manji stepen ekspresije CYP2E1 kod dece bi štito od nastanka mutacija, ali ne bi imao protektivnu funkciju od nastanka tumora (Dourson i sar., 2008).

Nasuprot tome, neka istraživanja sugerišu da se kod dece odvija efikasniji proces oksidacije AA u odnosu na onaj koji se odvija kod odraslih (Heudorf i sar., 2009). Na osnovu navedenog, i imajući na umu da deca unose veće količine AA putem hrane, moguće je pretpostaviti da bi ovaj deo populacije bio u većoj meri izložen AA, a time i većem riziku od njegovih potencijalno štetnih efekata po zdravlje (Heudorf i sar., 2009). Ipak, još uvek ne postoji dovoljno podataka

kojima bi se determinisale potencijalne razlike u kinetici metabolizma AA i/ili razlike u karakteristikama pri njegovom vezivanju za Hb, a koje su funkciji pola ili starosti osoba.

Konačno, biotransformacija mnogih hemikalija može biti bitno uslovljena varijacijama u nivou CYP2E1 enzima u jetri (Lipscomb i sar., 2004). Međutim, prema Lipscomb i sar. (2004) metabolizam supstanci je limitaran dotokom krvi u jetru, a ne nivoom CYP2E1 enzima u njoj.

Varijabilnost u kinetici metabolizma AA i njegove sudbine u organizmu se može posmatrati kroz varijabilnost u ekspresiji CYP2E1 enzima, ali i kroz varijabilnost u nivou GSH i aktivnosti GST (Walker i sar., 2007). U populacijama ljudi, u zavisnosti od etničke pripadnosti, ima oko 20-50% nosilaca *gstm1* nulte mutacije za *gst* gen, što dovodi do odsustva aktivnosti ovog enzima. Smatra se da bi populacija sa najvećom količinom GA bila ona koja ima *gstm1* nultu mutaciju. U organizmu čoveka ima više izoformi GST, ali nije pokazano da li je neka i koja forma odgovorna za konjugaciju AA i GA (Walker i sar., 2007). Polimorfizam GST enzima ne mora imati važnu ulogu ukoliko se pokaže da i druge GST mogu učestvovati u konjugaciji AA i GA (Walker i sar., 2007).

Koncentracije GSH u humanoj jetri se kreću između od 3 do 5 $\mu\text{mol/g}$ organa (Friedman, 2003). Faktori koji doprinose smanjenju nivoa GSH u jetri i time povećavaju efekat toksičnosti AA uključuju: neuravnoteženu ishranu kojom se unose smanjene količine aminokiselina koje sadrže sumpor (S) (npr. cistein i metionin), a koje su neophodne za sintezu GSH, oksidativni stres koji izaziva oksidaciju GSH i oštećenje jetre povezano sa alkoholnim hepatitisom, cirozom i drugim poremećajima (Khanna i sar., 1988; Mulders i sar., 1992).

1.4.3 Eliminacija

AA i njegovi metaboliti se brzo eliminišu iz organizma, najvećim delom putem urina, a u veoma malom stepenu putem fecesa (JECFA, 2005). Formiranje glutation-S-konjugata sa AA, odnosno GA, predstavlja inicijalni korak biotransformacije u derivate merkapturične kiseline koji će, potom, biti eliminisani iz organizma (Sl. 1.4.1) (Awad i sar., 1998).

Među produktima metabolizma AA koji se izlučuju dominiraju konjugati merkapturične kiseline (JECFA, 2005). Kao glavni metaboliti AA u urinu ljudi i glodara identifikovani su: AAMA i GAMA, s tim da su zabeležene razlike u njihovoj međusobnoj zastupljenosti zavisno od

vrste organizma. U ljudskom urinu je kao glavni metabolit AA identifikovana AAMA, što znači da kod ljudi dominira direktna konjugacija AA sa GSH. AAMA-sulfoksid je nađen jedino u humanim uzorcima urina, nastaje oksidacijom AAMA i kao takav se eliminiše iz organizma.

Kopp i Dekant (2009) su ispitivali toksikokinetiku AA analizom urina pacova i ljudi 96 h, odnosno 94 h nakon aplikacije jedne doze AA. Urin pacova je pri 20 mg/kg tm AA sadržao: 33,6% AAMA i 32,7% GAMA, a pri 100 mg/kg tm AA je imao: 38,8% AAMA i 31,7% GAMA. AAMA-sulfoksid kod pacova nije detektovan ni u jednom od uzoraka (Kopp i Dekant, 2009). U urinu ljudi je pri 0,5 µg/kg tm AA detektovano: 51,7% AAMA, 6,3% GAMA i 6,4% AAMA-sulfoksida, dok je pri 20 µg/kg tm AA nađeno: 49,2% AAMA, 6,4% GAMA i 14,5% AAMA-sulfoksida (Kopp i Dekant, 2009). Rezultati sugerišu da je stepen bioaktivacije AA u GA veći kod pacova nego kod ljudi. Pokazano je i da se najveći deo AAMA-sulfoksida i GAMA izlučuje nakon prva 24 h od aplikacije AA (Kopp i Dekant, 2009).

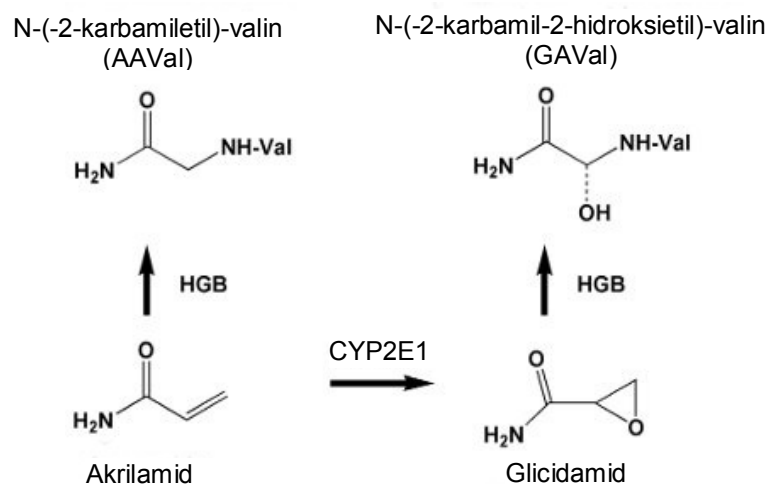
Analizom ljudskog urina 72 h nakon konzumacije čipsa koji je imao 0,94 mg AA, što je ekvivalentno 12,4 µg/kg tm AA, je nađeno 4,4% AA, 50% AAMA i 5,9% GAMA (Fuhr i sar., 2006).

Istraživanja na pacovima i miševima ukazuju da se sa povećanjem doze AA smanjuje količina izlučene GAMA, što sugeriše na inverznu doznu zavisnost AA i njegove biotransformacije u GA (Bergmark i sar., 1991; Sumner i sar., 1992; Doerge i sar., 2005a). Kod pacova se konverzija AA u GA kreće od 50% pri vrlo malim dozama do 13% za 100 mg/kg tm (Carere, 2006). Razlog pomenutog efekta može biti saturacija enzima CYP2E1 supstratom, tj. AA (Kopp i Dekant, 2009). Pretpostavlja se da kod pacova biotransformacija AA pri dozama <100 µg/kg tm nije značajno uslovljena interakcijama sa metaboličkim enzimima (Kopp i Dekant, 2009).

1.5. BIOMARKERI IZLOŽENOSTI AKRILAMIDU

Najčešće korišćeni indirektni biomarkeri za evaluaciju količine AA i njegovog reaktivnog epoksida, GA, u organizmu su tzv. „adukti“ AA sa Hb u krvi, „adukti“ GA sa DNK u tkivima i metaboliti merkapturične kiseline u urinu (Bergmark, 1997; Manière i sar., 2005; Young i sar., 2007; Bjellaas i sar., 2007).

Najpoznatiji biomarkeri izloženosti AA se određuju iz seruma i mogu biti: slobodne forme AA i GA i „adukti“ sa Hb (Dubing i sar., 2005). Obično se kao biomarker ekspozicije organizma AA koristi *N*-(2-karbamil-etil)valin („AA-Val adukt“) koji predstavlja najčešću formu „AA-Hb adukata“ (Sl. 1.5.1), dok se kao biomarker ekspozicije GA koristi *N*-(2-karbamil-2-hidroksietil)-valin („GA-Val adukt“) koji je najčešća forma „GA-Hb adukata“ (Sl. 1.5.1) (Friedman, 2003).



Slika 1.5.1. „Adukti“ akrilamida, odnosno glicidamida, sa molekulom hemoglobina (HGB). (Preuzeto uz modifikacije sa: <http://media.americanlaboratory.com>)

Obzirom da je poluživot AA u cirkulaciji veoma kratak, radi evaluacije izloženosti AA, kao i njegove bioraspoloživosti u organizmu, najviše se meri nivo „AA-Hb adukata“. Ovi „adukti“ se akumuliraju u eritrocitima tokom njihovog životnog veka (kod čoveka eritrociti žive 120, a kod pacova 60 dana). Prema tome, merenje nivoa „AA-Hb adukata“, tokom hroničnog izlaganja organizma monomernom AA, odražava prosečnu izloženost u poslednja tri meseca (čovek), odnosno dva meseca (pacov) (Bergmark, 1993; 1997; Perez i sar., 1999; Hagmar i sar., 2001; Kjuus i sar., 2004).

Direktno određivanje koncentracije „adukata“ AA sa *N*-terminalnim valinima Hb predstavlja važan metod procene rizika od izloženosti AA. Ovaj metod je posebno koristan za *in vivo* monitoring ekspozicije putem dermalog kontakta, hrane, vode, duvanskog dima, kao i izloženosti na radnom mestu (Friedman, 2003).

Neka merenja su pokazala da se nivo „AA-Hb adukata“ kod ljudi, koji su u svom radnom okruženju izloženi AA, može kretati u intervalu od 156 pmol/g globina, pa sve do 34000 pmol/g globina (Bergmark i sar., 1993; Kjuus i sar., 2004).

Merenja su pokazala da pušači imaju više nivoe „adukata“ Hb sa AA, odnosno GA, u odnosu na nepušače (Hagmar i sar., 2005; Bjellaas i sar., 2007). Inhalacijom duvanskog dima prosečan nivo „AA-Hb adukata“ izmeren kod pušača je iznosio oko 83 pmol/g globina, dok je kod nepušača on bio oko 28 pmol/g globina (Kütting i sar., 2009). Najviši nivo „AA-Hb adukata“ zabeležen je kod osobe koja je popušila 40 cigareta, i iznosio je 331 pmol/g globina (Kütting i sar., 2009). U okviru drugog istraživanja su nivoi „AA-Hb adukata“ kod pušača iznosili 116 pmol/g globina, kod nepušača 31 pmol/g globina, a kod laboratorijskog osoblja, koje radi sa AA, 54 pmol/g globina (Bergmark, 1997).

Kod ljudi je uočeno da rast nivoa AA-Hb i GA-Hb „adukata“ u krvi tokom dana ima linearan karakter ukoliko se oralnim putem unesu koncentracije AA do 3 mg/kg tm (Fennell et al, 2005). Postoje podaci o interindividualnoj varijabilnosti u farmakokinetici AA kod ljudi. Nakon izlaganja volontera kontrolisanim dozama AA, zabeležena je varijabilnost u nivoima AA i GA „adukata“ sa Hb između osoba, sa koeficijentom varijabilnosti i do 30% pri višim dozama AA (3 mg/kg tm) (Fennell i sar., 2005).

Kao biomarkeri izloženosti AA se mogu upotrebiti i koncentracije AA, GA, AAMA i GAMA u urinu (Dubing i sar., 2005). Nivo AAMA u urinu je indikator inaktivacije AA, dok je GAMA indikator inaktivacije GA, ali i pokazatelj efikasnosti oksidacije AA u GA (Hays i Aylward, 2008). Nakon jedne oralne doze AA odnos GAMA/AAMA u urinu može varirati među osobama usled razlika u kinetici eliminacije ova dva metabolita (Bjellaas i sar., 2005; Boettcher i sar., 2006). Tako su zabeležene razlike i u količini AAMA i GAMA metabolita u ljudskom urinu, sa koeficijentom interindividualne varijabilnosti 20-30% nakon što su volonteri bili izloženi kontrolisanim dozama AA (Fuhr i sar., 2006).

Pored seruma i urina, evaluacija izloženosti AA se može vršiti i u uzorcima tkiva, pri čemu se najčešće određuje koncentracija „adukata“ GA sa DNK. Tako je na primer, istraživanje Young i sar. (2007) pokazalo da stepen formiranja „GA-DNK adukata“ u jetri čoveka može biti uslovljen sa više faktora. Pri povećanoj konzumaciji hrane koja sadrži AA očekuje se povećavan nivo formiranja „GA-DNK adukata“. Polimorfizam i inducibilni status enzima uključenih u metabolizam AA mogu uticati na nivo formiranih AA-GS i GA-GS, a time i na nivo slobodnog AA i GA. Pretpostavlja se da bi unos AA u kombinaciji sa kosupstratima za enzim CYP2E1 mogli uticati na stepen formiranja GA. Jedan od primera je konzumiranje čipsa sa pivom, što predstavlja unos AA u kombinaciji sa etanolom, koji je poznat inducibilni agens za CYP2E1 enzim (Young i sar., 2007). Young i sar. (2007) su zabeležili da se nivo „GA-DNK adukata“ u humanoj jetri može kretati između 0,057 i 0,26 na 10^8 nukleotida, zavisno od doze ili dužine ekspozicije AA.

U cilju kvantitativnog definisanja species-specifičnih razlika u metabolizmu i ekskreciji AA, ali i njegovoj reakciji sa Hb i DNA, kreiran je njegov tzv. fiziološki-baziran farmakokinetički model kod pacova (Kirman i sar., 2003), miševa i ljudi (Young i sar., 2007). Ipak, ovaj model nije dao jedinstveni set parametara vezanih za AA i/ili GA, na osnovu kojih bi se mogla vršiti procena koncentracije AA i/ili GA, njihovih „aduktata“ i metabolita u serumu i urinu među ljudskim populacijama.

1.6. ŠTETNI EFEKTI AKRILAMIDA

Interes za sve biološke i potencijalno štetne efekte AA po zdravlje ljudi značajno je intenziviran nakon 2002. godine, nakon što je dokazano njegovo prisustvo u hrani, koja je prethodno termički obrađena na visokim temperaturama (≥ 120 °C) (Tareke i sar., 2000; SNFA, 2002; Tareke i sar., 2002). Iz toga razloga, pokrenuta su brojna istraživanja na životinjskim modelima, ali i samim ljudima kako bi se stekao uvid u mehanizme delovanja AA, a njegovi štetni efekti eliminisali ili sveli na minimum (FAO/WHO, 2002).

Prvi dokazani štetni efekti AA po ljudsko zdravlje bili su efekti neurotoksičnosti (Garland i Patterson, 1967; He i sar., 1989). Inicijalni nalazi o AA kao uzroku pojave štetnih neuroloških posledica vezani su za osobe koje su u svom radnom okruženju bile izložene AA (Johnson i sar., 1986). Nakon ingestije AA, kod ljudi se može javiti abdominalni bol, slabost i tremor. Prilikom kontakta sa kožom, AA može izazvati iritaciju, a veoma retko i alergijski kontaktni dermatitis, pa se tako mogu javiti lokalne iritacije, otoci, plikovi, guljenje kože na rukama, stopalima, uz potencijalan sistemski efekat koji se karakteriše abnormalnim zamorom, nesanicom, poremećajem pamćenja i vrtoglavicom (NTP-CERHR, 2005). Ukoliko dođe u kontakt sa očima, AA izaziva manje povrede i iritaciju, a oporavak je moguć tokom 24 h. Najveći rizik od ovakvih posledica je prisutan kod osoba koje dolaze u kontakt sa AA u svom radnom okruženju (Beyer i Belsito, 2000; Aalto-Korte i sar., 2002).

Kod glodara, kao najčešće korišćenih eksperimentalnih životinja, pored neurotoksičnosti, je pokazano da monomerni AA ima sposobnost indukcije kancera i naslednih mutacija, kao i efekat reproduktivne toksičnosti (FAO/WHO, 2002; Parzefall, 2008). Tako, oralna administracija AA kod ženki pacova dovodi do pojave kancerogenih efekata kao što je nastanak tumora centralnog nervnog sistema, tumora mlečnih žlezda, uterusa i tkiva usne šupljine (Friedman i sar., 1995). Do danas, potvrđene štetne posledice AA ili GA kod eksperimentalnih životinja uključuju neurotoksičnost (Burek i sar., 1980; Tyl i sar., 2000a; Lehning i sar., 2003; LoPachin i sar., 2003; Tyl i Friedman, 2003), genotoksičnost (Paulsson i sar., 2003; Tyl i Friedman, 2003; Maniere i sar., 2005; Yang i sar., 2005), kancerogenost (Johnson i sar., 1986; Friedman i sar., 1995; Carere, 2006; Hogervorst i sar., 2010) i reproduktivnu toksičnost (Parzefall, 2008).

Najveći broj podataka o štetnim efektima AA je dobijen u okviru studija na ekperimentalnim životinjama, što ujedno podrazumeva i poteškoće u ekstrapolaciji i sagledavanju relevantnosti dobijenih rezultata za ljudsku populaciju. Jedan od primera je i činjenica da glodari poseduju veću senzitivnost na slobodne radikale (engl. *reactive oxigen species*; ROS) u odnosu na primata (Klaunig i sar., 1998). S druge strane, istraživanja vezana za štetne efekte AA po ljudsko zdravlje su zastupljena u manjem obimu i veoma su limitirana, najvećim delom, iz etičkih razloga. Pored pomenute limitiranosti, studije na ljudima velikim delom imaju i nekonzistentne i/ili nepouzdanе rezultate, obzirom da su uglavnom bazirane na epidemiološkim studijama, gde se pomoću upitnika o prehrambenim navikama vrši procena unosa AA kod određene populacije (Hogervorst i sar., 2010; Pelucchi i sar., 2011). Epidemiološke studije koje se odnose na unos AA kod dece su, takođe, najvećim delom ograničene.

Stepen štetnosti AA po žive organizme, a među njima i čoveka, određuje mnogo faktora među kojima su najuticajniji: doza, vremenski period izloženosti i način dolaska u kontakt sa ovim agansom. Takođe je potrebno uzeti u obzir i prisustvo nekih drugih hemikalija, starost osobe, pol, ishranu, nasledne osobine, stil života i, konačno, samo zdravstveno stanje organizma (NTP-ATSDR, 2009).

Prilikom evaluacije potencijalnih rizika AA po ljudsko zdravlje neophodno je uzeti u obzir sledeće činjenice (Fiedman, 2003):

- a) Načini ekspozicije ljudske populacije ovom ksenobiotiku
- b) AA predstavlja biološki alkilujućii agens, vezuje se za DNK, esencijalne proteine i enzime i naj taj način ostvaruje genotoksične efekte, i to od klastogenih (strukturnih promena hromatinskog materijala/hromozoma) do mutagenih (genskih mutacija) efekata kako u somatskim, tako i u germinativnim ćelijama
- c) Dokazani štetni efekti AA kod životinja su: neurotoksičnost, reproduktivna toksičnost i kancerogenost (doze 1-2 mg/kg tm/dan AA povećavaju incidencu kancera kod pacova)
- d) Postoje indikacije da je AA kumulativni neurotoksin

Relevantni podaci u vezi štetnih efekata AA na ljude dominantno upućuju na njegovu nervnu i reproduktivnu toksičnost. Ipak, nervni sistem se smatra primarnim ciljnim mestom štetnog delovanja AA i kod ljudi i kod životinja (FAO/WHO, 2002). Efekti kancerogenosti i

genotoksičnosti AA su dokazani kod eksperimentalnih životinja, ali se isti kod ljudi još smatraju samo kao potencijalni (Tyl i sar., 2000a).

Uzimajući u obzir doze AA kojima je izložena opšta ljudska populacija, pojava efekata neurotoksičnosti i reproduktivne toksičnosti smatraju se malo verovatnim. Izuzetak su osobe čije se prehrambene navike karakterišu povećanom konzumacijom namirnica koje imaju visok sadržaj monomera AA. Nasuprot tome, kancerogeni i mutageni efekti AA predstavljaju potencijalnu opasnost za opštu populaciju (Küting i sar., 2009). Ipak, najugroženijima se smatraju osobe čiji posao obuhvata kontakt sa AA ili osobe kod kojih je došlo do akutne intoksikacije ovim monomerom.

1.6.1 Stavovi relevantnih svetskih organizacija o štetnosti akrilamida

Međunarodna agencija za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer*; IARC) je 1994. godine svrstala AA u grupu 2A, kojoj pripadaju supstance sa verovatno kancerogenim efektom za ljude. Klasifikacija je najvećim delom izvršena na osnovu podataka dobijenih iz studija na eksperimentalnim životinjama, obzirom da je podataka o štetnosti AA po ljude bilo relativno malo ili su bili nepouzđani. Prilikom evaluacije štetnosti AA korišćeni su: dokazani genotoksični efekti AA u *in vivo* i *in vitro* esejima, formiranje „adukata“ AA/GA sa DNK kod miševa i pacova, kao i formiranje „adukata“ AA/GA sa Hb kod ljudi i pacova.

Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država (*US Environmental Protection Agency*; US EPA) (1994) je uvrstila AA u grupu B2, koju čine verovatno kancerogene hemikalije po ljudsko zdravlje. Klasifikacija je zasnovana na nedovoljno pouzdanim podacima koji se odnose na ljude i na osnovu brojnih dokaza o kancerogenosti AA kod životinja. Tokom 2002. godine Evropska Komisija svrstala je AA u kategoriju 2 mutagenih supstanci (EC, 2002).

Prema *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH, 2001) AA spada u grupu A3, gde su svrstane supstance sa potvrđenim kancerogenim efektom kod životinja, ali sa nepoznatom relevantnošću tog efekta na ljude.

Evropska agencija za hemikalije (*European Chemicals Agency*; ECHA) je 2010. godine uvrstila AA među 15 novih supstanci za tzv. listu „*Candidate List of substances of very high concern*“, koju čine supstance na koje je potrebno fokusirati značajan stepen pažnje i opreza.

Za svaku potencijalno štetnu supstancu se mogu odrediti tzv. NOAEL i LOAEL vrednosti. NOAEL (engl. *No observed adverse effect level*) jeste najviši nivo izloženosti nekoj supstanci pri kome nema biološki značajnog povećanja u frekventnosti ili stepenu štetnih efekata između izložene populacije i adekvatne kontrole (www.epa.gov). LOAEL (engl. *Lowest observed adverse effect level*) jeste najniži nivo izloženosti nekoj supstanci pri kom se javlja biološki značajno povećanje u frekventnosti ili stepenu štetnih efekata između izložene populacije i adekvatne kontrole (www.epa.gov).

Toksikološke studije vezane za efekte AA kod životinja, dominantno su izvođene na laboratorijskim miševima i pacovima (NTP-CERHR, 2005). Dozno-zavisni efekti AA najbolje su okarakterisani kod pacova, obzirom da su takve studije dizajnirane kako bi se procenile NOAEL vrednosti za AA. Štetni efekti AA u funkciji njegove doze su, takođe, zapaženi i u studijama na drugim vrstama eksperimentalnih životinja, kao što su miševi, mačke, psi i majmuni (JIFSAN/NCFST, 2002). Međutim, većina ovih studija inicijano nije bila namenjena, pa time ni adekvatna, za definisanje NOAEL kod navedenih vrsta.

Kod pacova izlaganih AA preko pijaće vode tokom 90 dana, NOAEL za morfološke promene na nervima iznosio je 0,2 mg/kg tm/dan AA, dok pojava neoplastičnih lezija u drugim tkivima nije uočena pri dozama AA nižim od 5 mg/kg tm/dan (JECFA, 2005). Prema podacima iz reproduktivnih toksikoloških istraživanja, oralne doze >7 mg/kg tm/dan AA, izazivaju smanjen fertilitet, pojavu dominantnih letalnih efekata i štetan efekat na brojnost i morfologiju spermatozoida kod mužjaka pacova. Kod ženki, pomenute doze nisu imale štetne efekte na fertilitet ili reprodukciju, osim blage redukcije telesnih masa mladunaca koja je bila zabeležena pri oralnim dozama $\geq 2,5$ mg/kg tm AA (JECFA, 2005). Na osnovu dobijenog, kod pacova vrednost NOAEL za neurotoksičnost, bazirano na morfološkim promenama u nervnom sistemu, iznosi 0,2 mg/kg tm/dan AA, a LOAEL između 1-2 mg/kg tm/dan AA (Burek i sar., 1980), dok je za reproduktivnu i razvojnu toksičnost vrednost NOAEL 2 mg/kg tm/dan AA (Tyl et al., 2000b; Tyl i Friendman, 2003). Vrednosti dobijenih NOAEL i LOAEL variraju u manjem stepenu između pojedinih studija. Prema izveštaju EU iz 2002. godine, a u okviru dvogodišnje studije na pacovima tretiranih oralno rastvorom AA, prema eksperimentanom protokolu Johnson i sar. (1986), NOAEL procenjena na 0,5 mg/kg tm/dan AA.

Podaci vezani za ljudsku populaciju su malobrojni, a pritom su postojeći u značajnom stepenu nekonzistentni i/ili nepouzdana. Prema nekim podacima, kod čoveka NOAEL za AA iznosi 10 µg/kg tm/dan (Calleman, 1996; Kjuus et al., 2004), LOAEL iznosi 0,2-0,5 mg/kg tm/dan, pri čemu je za reproduktivne funkcije ona veća, i iznosi 4 x 0,5 mg/kg tm/dan AA (EC, 2002; FAO/WHO, 2002). Vodeći se time, maksimalan dnevni unos AA putem hrane bi iznosio: 41 mg AA/dan za muškarce (82 kg telesne težine), 30 mg AA/dan za žene (60 kg telesne težine), a 9 mg AA/dan za decu (18 kg telesne težine) (FAO/WHO, 2002). Praktično, da bi se dostigle ove količine unosa AA putem hrane, dnevno bi muškarci trebali pojesti 29 kg pečenog krompira, žene popiti 86 kg voćnog soka, a deca pojesti 13 kg French fried krompira (FAO/WHO, 2002).

Vrednost LD₅₀ (engl. *lethal dosage*) za neku supstancu jeste standardna mera akutne toksičnosti, izražava se u mg/kg tm i predstavlja individualnu dozu date supstance koje je dovoljna da izazove smrt kod 50% jedinki testirane populacije životinja (pacova, miševa, zamoraca, zečeva itd.). Na osnovu ove doze je moguće porediti relativnu toksičnost toksičnih supstanci. Niža vrednost LD₅₀ podrazumeva da je data supstanca toksičnija (www.epa.gov).

Toksikološke studije na eksperimentalnim životinjama su pokazale njihovu različitu osetljivost na toksične efekte izazvane AA, kako između vrsta, tako i između pojedinih sojeva u okviru iste vrste. U studijama akutne toksičnosti, LD₅₀ za oralne doze AA aproksimativno se kreću u intervalu 100-150 mg/kg tm kod miševa, pacova, zečeva i zamoraca (McCollister i sar., 1964; Paulet 1975; Hashimoto i sar., 1981). Prema JECFA (2005), jedna doza od 100 mg/kg tm AA aplikovana oralno kod pacova izaziva pojavu akutne toksičnosti, dok se LD₅₀ za pacove obično kreće iznad 150 mg/kg tm AA (JECFA, 2005). U Tab. 1.6.1 su navedene vrednosti letelnih doza (LD₅₀) za pojedine vrste.

Tabela 1.6.1. Intervali LD₅₀ za AA kod pojedinih vrsta sisara (NTP-CERHR, 2005)

Vrsta	LD ₅₀ [mg/kg tm]
Pacov (<i>p.o.</i>)	107-251
Pacov (dermalno)	400
Pacov (<i>i.p.</i>)	90-120
Miš (<i>p.o.</i>)	107-170
Zamorac (<i>p.o.</i>)	150-180
Kunić (dermalno)	1.148
Mačka (<i>i.v.</i>)	85

1.6.2 Interakcija akrilamida sa komponentama živog sistema

Sva štetna svojstva AA vezuju se isključivo za njegovu monomernu formu. Polimerizovane forme AA nisu pokazale nikakvu vrstu toksičnosti na biološke sisteme. Prilikom kontakta sa komponentama živog sistema, AA vrši analogne modifikacije aminokiselina, peptida, proteina i nukleinskih kiselina *in vivo* i *in vitro* (Friedman, 2003).

Funkcionalne grupe sa kojima reaguje AA u *in vivo* i *in vitro* uslovima podrazumevaju: SH grupa cisteina, homocisteina i glutationa; α -NH₂ grupa slobodnih aminokiselina i rezidua aminokiselina na N-terminusu proteina, ϵ -NH₂ grupa lizina i NH grupa u prstenu histidina (Friedman, 2003). Pri reakcijama sa ovim molekulima, AA vrši alkilovanje SH grupa aminokiselina i proteina i modifikaciju NH₂ grupa proteina i nukleinskih kiselina (Friedman, 2003). Ovakve interakcije AA dovode do formiranja „adukata“ AA sa komponentama živog sistema, mogu se smatrati dominantnim mehanizmom delovanja AA na biološki sistem i imaju potencijal da izmene strukturno-funkcionalne karakteriske važnih biomolekula u organizmu i tako finalno izazovu efekat toksičnosti.

Oksidacijom AA u hepatocitima formira se GA, još reaktivniji i štetniji molekul. Pošto GA nastaje katalitičkom aktivnošću CYP2E1 enzima, formiranje ovog epoksida se očekuje samo u uslovima *in vivo* (Sumner i sar., 1992; 1997). GA intenzivnije reaguje sa proteinima i DNK, u odnosu na AA. Ipak, postoje razlike u afinitetu interakcija AA, odnosno GA sa komponentama biološkog sistema.

Naime, dok AA pokazuje veći afinitet za interakciju sa proteinima, GA ima veći afinitet ka DNK (Sumner i sar., 1992; 1997). Iz ovog razloga se mutagenost i genotoksičnost prvenstveno pripisuju GA i smatraju njegovim dominantnim štetnim efektima (Sumner i sar., 1992; 1997). Pokazano je da AA veoma slabo reaguje sa DNK, dok su „GA-DNK adukti“ pronađeni u uzorcima izolovane DNK mnogih organa (Calleman, 1996).

Slaba reaktivnost AA sa DNK u odnosu na njegovu visoku reaktivnost sa proteinima koji poseduju SH grupe sugerise da je alkilovanje proteina primarni mehanizam delovanja AA, koji bi, potom, indirektno mogao voditi nastanku klastogenih efekata (Sega i sar., 1989).

1.6.3 Neurotoksičnost

Primarni i najbolje izučeni štetni efekat AA po žive organizme, prvenstveno čoveka, jeste njegovo toksično delovanje na nervni sistem (FAO/WHO, 2002). Na osnovu zabeleženih štetnih posledica koje izaziva po zdravlje ljudi i laboratorijskih životinja, AA pripada grupi potvrđenih neurotoksina (Friedman, 2003).

Neurotoksičnost AA može biti posledica bipolarne prirode ovog molekula. Naime, u molekulu AA, deo sa dvostukom vezom [$\text{CH}_2=\text{CH}_2$] može učestvovati u hidrofobnim, a amino deo [CONH_2] u hidrofilnim interakcijama sa komponentama živog sistema prisutnim u ćeliji. Na ovaj način bi AA mogao remetiti strukturu ćelijske membrane, ubrzati svoju difuziju i ulazak u terminalne krajeve nerava što bi se odrazilo na normalno funkcionisanje nervnog sistema (Friedman, 2003). Potencijalne interakcije AA uključuju formiranje vodoničnih veza sa molekulima H_2O , sa peptidnom vezom [$-\text{CO}-\text{NH}-$], sa karboksilnom grupom [$-\text{COO}^-$] aspartamske i/ili glutaminske kiseline, i sa pozitivno naelektrisanim molekulima kao što je acetilholin (ACh). Ovim interakcijama bi se formirali naelektrisani, nekovalentni intermedijeri (Friedman, 2003). Na osnovu *in vivo* i *in vitro* studija postoje indicije da bi interakcije AA sa SH grupama proteina mogle imati presudan značaj u patogenezi neurotoksičnih efekata (Kemplay i Cavanagh, 1984; Martensen i sar., 1995; Ko i sar., 2002). Biohemijsku bazu neuropatija bi mogle činiti i modifikacije aminokiselina i proteina nervnih ćelija, kao i supresija inkorporacije aminokiselina u proteine nervnog sistema (Hashimoto i Ando, 1973; 1975). Pomenute interakcije bi izazvale poremećaje u oporavku nervne funkcionalnosti, u regeneraciji aksona nakon fizičkog oštećenja, poremećaje aksonskog transporta u neuronu, slabost skeletnih mišića, paralizu zadnjih ekstremiteta i poremećaj hodanja kod životinja (Kemplay i Cavanagh, 1984; Martensen i sar., 1995; Ko i sar., 2002).

Prva istraživanja o delovanju AA na organizam su bazirana na njegovoj neurotoksičnosti ili tzv. neurotoksičnom sindromu. Simptomi su prvo primećeni kod osoba koje su izložene visokim koncentracijama AA u svojoj radnoj sredini (Spencer i Schaumburg, 1974; Calleman i sar., 1994). Neurotoksični efekti AA manifestuju se: ataksijom, odnosno gubitkom kontrole voljnih pokreta mišića, slabošću skeletnih mišića i gubitkom telesne mase (Spencer i Schaumburg, 1974; LeQuesne, 1985; Calleman i sar., 1994). Ekspozicija visokim dozama AA izaziva i: iritaciju

mukoznih membrana, znojenje, poremećaj govora, utrnulost, paresteziju, urinarnu inkontinenciju (Spencer i Schaumburg, 1974; LeQuesne, 1985; Calleman i sar., 1994).

Rani simptomi intoksikacije AA karakterišu se gubitakom osećaja u rukama i stopalima, njihovom slabošću i pojavom utrnulosti, i preznojavanjem (Spencer i Schaumburg, 1974; LeQuesne, 1985; Calleman i sar., 1994). Sistemske efekte AA se odražavaju preko centralnog, perifernog i autonomnog nervnog sistema i karakterišu se: abnormalnim zamorom, nesanicom, poremećajem pamćenja i vrtoglavicom (Spencer i Schaumburg, 1974; LeQuesne, 1985; Calleman i sar., 1994). Periferna neuropatija se manifestuje gubitkom refleksa, poremećajem senzacije, disfunkcijom mišićne periferne delova ekstremiteta (Spencer i Schaumburg, 1974; LeQuesne, 1985; Calleman i sar., 1994). Po prestanku ekspozicije, oporavak je moguć i obično traje od par meseci do nekoliko godina.

Jako trovanje (engl. *severe intoxication*) uzrokuje: konfuziju, dezorijentaciju i halucinacije (Spencer i Schaumburg, 1974; LeQuesne, 1985; Calleman i sar., 1994). Akutno trovanje kod ljudi javlja se nakon oralne konzumacije oko 220 mg AA. U slučaju akutnog trovanja žene (48 kg telesne težine) nakon ingestije kristalnog AA u dozi od 18 g (375 mg/kg tm), zabeleženi su jaki simptomi neurotoksičnosti u vidu periferne neuropatije i pojave respiratornog distresa, krvarenje u gastro-intestinalnom traktu pojavilo se 5 h nakon trovanja, a hepatotoksičnost nakon 3 dana (NTP-CERHR, 2005).

Radnici u tunelima koji su dolazili u kontakt sa AA ispoljavali su blage i reverzibilne simptome neuropatija perifernog nervnog sistema (Calleman i sar., 1993; Costa, 1996). Osobe kod kojih je zabeleženi nivo „AA-Hb adukata“ bio >1 nmol/g Hb, imale su osećaj peckanja ili utrnulosti ruku ili stopala (Hagmar i sar., 2001). Kratkoročna izloženost radnika u fabrikama za proizvodnju AA izazvala je osećaj slabosti u nogama, gubitak senzacije i refleksa nožnog palca, kao i utrnulost ruku i stopala, kojima je prethodilo guljenje kože sa ruku. Duža izloženost monomerima AA izazvala je ozbiljne poremećaje u radu malog mozga uz propratnu neuropatiju (He i sar., 1989).

Neurološki poremećaji izazvani AA kod ljudi se ne očekuju pri nivoima „AA-Hb adukata“ <6000 pmol/g Hb. Na osnovu ovoga je nivo od 2000 pmol/g Hb određen kao LOAEL za „AA-Hb adukate“ (Calleman i sar., 1994; Calleman, 1996; Bergman i sar., 1997). Pri koncentraciji „AA-Hb

adukata“ od 300 pmol/g Hb zabeležena je pojava blagih, reverzibilnih simptoma neurotoksičnosti kod ljudi. Vrednost „AA-Hb adukata“ od 300 pmol/g Hb korespondira dnevnom unosu od 10 µg/kg tm AA i uzeta je kao NOAEL (Calleman, 1996; Kjuus i sar., 2004). Kod životinja granična vrednost AA bez ikakvih štetnih efekata (NOAEL) iznosi 500 µg/kg tm na dan (EC, 2002).

Eksperimentalna intoksikacija laboratorijskih životinja sa AA zabeležila je rezultate slične onima koji su se manifestovali kod ljudi (Barber i sar., 2001). Pored toga, prilikom slučajne ekspozicije goveda monomerima AA tokom ispaše, kod životinja su zapaženi simptomi poremećene nervne funkcije zadnjih ekstremiteta, povećanje iritabilnosti i senzitivnosti na dodir. Težina detektovanih oštećenja je bila u korelaciji sa nivoom „AA-Hb adukata“ (Godin i sar. 2002).

Inicijalno se smatralo da AA kod laboratorijskih životinja izaziva neuropatološke promene koje se manifestuju u vidu tzv. toksične periferne distalne aksonopatije (Miller i Spencer, 1985). Ona je posredovana direktnim delovanjem AA na aksone i manifestuje se njihovom degeneracijom (Spencer i Schaumburg, 1978). Međutim, kasnije studije o efektima AA na pacove su ukazala na nekonzistentnost između pojave klasičnih simptoma neurotoksičnosti i razvijanja distalne aksonopatije perifernog nervnog sistema (PNS). Naime, ataksija, opruženost zadnjih ekstremiteta i slabost mišića zadnjih ekstremiteta su uočeni nezavisno od unete dnevne doze AA (50 mg/kg tm na dan, *i.p.* ili 21 mg/kg tm na dan, *p.o.*), dok se aksonopatija detektovala samo pri dugoročnoj ekspoziciji životinja malim dozama AA (21 mg/kg tm na dan) (Crofton i sar., 1996; Lehing i sar., 1998). Pored toga, neuropatološke studije ukazuju da visoke doze AA primarno izazivaju oštećenja nerava u centralnom nervnom sistemu (CNS), dok su lezije u PNS češće nakon ekspozicije nižim dozama AA (Burek i sar., 1980; Yoshimura i sar., 1992). Pri intoksikaciji AA, aksoni nerava predstavljaju inicijalna mesta stvaranja lezija, ali se aksonopatija manifestuje prilikom dugoročne ekspozicije malim dozama ovog ksenobiotika (LoPachin, 2002).

Postoje indicije da AA izaziva selektivno oštećenje Purkinje-ovih ćelija, koje predstavljaju važnu komponentu u regulaciji tonusa mišića, koordinaciji somatske motorne aktivnosti i održavanju ravnoteže (Ghez i Thach, 2000). Direktno delovanje AA na somu neurona može dovesti do poremećaja u sintezi ćelijskih molekula, a potom i u njihovom anterogradnom i retrogradnom transportu (Cavanagh, 1979). Intoksikacija AA dovodi do degeneracije dendrita,

aksona i terminalnih završetaka Purkinje-ovih ćelija. Oštećenja se manifestuju pojavom ataksije i poremećajem rada mišićne aktivnosti (Lehning i sar., 2002a). Prema Cavanagh i Gysbers (1983) AA deluje direktno na perikarion Purkinje-ovih ćelija što izaziva oštećenje endoplazmatskog retikuluma i može dovesti do neurodegenerativnih promena sličnim nekrozi. Rezultati sugerišu na tzv. „dying-back“ model odumiranja ćelija, što podrazumeva da smer odumiranja počinje na periferiji i kreće se ka somi neurona (Cavanagh, 1979). Novija istraživanja su identifikovala terminalne završetke neurona kao primarno mesto delovanja AA, što bi moglo imati za posledicu poremećaj u sekreciji neurotransmitera. Pretpostavlja se da je ovaj efekat patofiziološka osnova neurotoksičnosti AA (LoPachin, 2005).

Kod pacova je dnevna doza od 30 mg/kg tm AA, nakon 5 dana, izazvala otok i degenerativne promene dendrita Purkinje-ovih ćelija, dok je između 10. i 14. dana tretmana uočena degeneracija some i aksona (Cavanagh i Gysbers, 1983). Tretman pacova dnevnim dozama od 50 mg/kg tm AA (*i.p.*) je nakon 5 dana izazvao progresivno oštećenje dendrita Purkinje-ovih ćelija. Nakon 8 dana zabeleženo je obilno oštećenje aksona, a u manjoj meri i perikariona Purkinje-ovih ćelija (Lehning i sar., 2002a). Tretman pacova dnevnim dozama od 21 mg/kg tm AA (*p.o.*) je nakon 14 dana pokazao oštećenje dendrita, aksona i terminalnih završetaka Purkinje-ovih ćelija (Lehning i sar., 2002a). Takođe, ovaj tretman dozom od 21 mg/kg tm AA (*p.o.*) tokom 7, 14, 28, 38 dana izazvao je degenerativne promene moždanog stabla, malog mozga i kičmene moždine (Lehning i sar., 2002a; 2002b; 2003). Na osnovu ovoga, očekuje se da veće doze AA (30-50 mg/kg tm) imaju kapacitet izazivanja neurodegeneracije.

Endo i sar. (1994) su pokazali da u mozgu pacova, nakon aplikacije 100 mg/kg tm AA (*i.p.*), dolazi do povećanja sinteze proteina neurofilamenata, što ukazuje na potencijalno delovanje AA u smislu remećenja ekspresije gena koji regulišu sintezu proteina mozga. AA utiče na ćelijske motorne proteine koji sa kinezinom učestvuju u procesima mitoze i mejoze, kao i u brzom anterogradnom aksonskom transportu što doprinosi neurofilamentoznim aksonopatijama (Sickles, 1992; Sickles i sar., 1996). Prema ovim rezultatima, pretpostavlja se da je toksičnost AA posredovana njegovim interakcijama sa kinezinu-sličnim motornim proteinima u nukleusu i neurofilamentima (Sickles, 1992). Ovi proteini su važni za separaciju hromozoma u anafazi mitoze ili mejoze (Adler i sar., 1993), pa bi interakcije AA sa proteinima deobnog vretena mogle biti uzrok detektovanih dominantnih letalnih mutacija (Spencer i Schaumburg, 1974).

Pokazano je da u mozgu AA može inhibirati aktivnost GST i smanjiti nivo GSH (Dixit i sar., 1981; 1984). Pomenute promene su praćene povećanjem količine dopaminergičnih receptora u mozgu, i to u koncentracijski-zavisnom maniru (Srivistava i sar., 1986). Pretpostavka je da se AA može vezivati za dopaminske receptore i imati aktivnost kao parcijalni agonist dopamina. Ovime bi mogao izazvati ćelijsku proliferaciju sa potencijalnom mogućnošću izazivanja ubrzanog nastanka tumora (Crump, 1999a; 1999b). Drugi potencijalni mehanizam indukcije ćelijske proliferacije od strane AA je modulacija nivoa hormona, što ne mora biti bitno drugačije od njegove aktivnosti kao dopaminskog agoniste (Tyl i Friedman, 2003). Takođe, istraživanja na pilećem embrionu ukazuju da, usporavanjem funkcionisanja mikrotubularnog sistema i neurofilamenata, AA može blokirati transport receptora za γ -amino-buternu kiselinu (GABA) koji predstavlja jedan od najvažnijih inhibitornih neurotransmitera CNS-a (Ho i sar., 2002).

Nekoliko studija se bavilo ispitivanjem AA-indukovane neurotoksičnosti u hipotalamusu i AA-posredovanom remećenju odgovora mozga na dopamin. Tako je tretman pacova sa 50 mg/kg tm AA (*i.p.*), tokom 5 dana, izazvao široko rasprostranjenu degeneraciju nervnih završetaka, koja je bila prisutna i u hipotalamusu (Lehning i sar., 2003). Nasuprot tome, tretman pacova sa 21 mg/kg tm AA, u trajanju od 21 dana, izazvao je oštećenje nekih regiona mozga, ali ne i hipotalamusa (Lehning i sar., 2003). Injektiranje 20 mg/kg tm AA tokom 10 dana nije značajno uticalo na nivoe dopamina i serotonina u hipotalamusu pacova (Ali i sar., 1983). Prema sličnom protokolu, Dixit i sar. (1981) su pokazali smanjenje nivoa dopamina u mozgu pacova. Kod mužjaka Fischer 344 pacova tretiranih dozama od 2,4; 10 ili 43 mg/kg tm/dan AA, putem pijaće vode, tokom 14 dana, nisu nađene značajne promene u ekspresiji gena hipotalamusa, nivo serotonina je bio značajno povećan kod najniže (2,4 mg/kg tm AA) i srednje doze (10 mg/kg tm AA), dok se nivo dopamina nije menjao (Bowyer i sar., 2008a). Životinje tretirane sa najvećom dozom AA (43 mg/kg tm) su ispoljavale poremećaj motorne aktivnosti i gubitak telesne mase (Bowyer i sar., 2008a).

Na bazi svojih rezultata, LoPachin i sar. (2006) tvrde da AA inhibiše neurotransmisiju u CNS-u na nivou terminalnih završetaka nerava, tako što formira „adukte“ sa SH grupama proteina ključnim za „pakovanje“ neurotransmitera u presinaptičke vezikule i sprečava fuziju vezikula sa membranom nervne ćelije. Naime, pacovi tretirani sa 21 mg/kg tm AA tokom 21 dana (*p.o.*) ili sa 50 mg/kg tm AA tokom 5 dana (*i.p.*) ispoljavali su simptome neurotoksičnosti

(npr. poremećaj hoda) uz razvoj degenerativnih promena na nervnim završecima u dozno- i vremenski-zavisnom maniru. U *corpus striatum*-u prednjeg mozga nađeno je smanjeno „pakovanje“ dopamina u sinaptičke vezikule i smanjeno otpuštanje dopamina iz sinaptozoma na terminalnim završecima nerava (LoPachin i sar., 2006). Obzirom da *in vivo* tretman nije uticao na nivo GSH u nervnim ćelijama, pretpostavlja se da pokazana neurotoksičnost nije posredovana mehanizmom oksidativnog stresa (LoPachin i sar., 2006). Prema LoPachin i sar. (2006), neurotoksični efekti AA se razvijaju u dozno-zavisnom maniru i sledećim redosledom: vezivanjem AA za SH grupe ključnih proteina dolazi do narušavanja procesa otpuštanja i ponovnog preuzimanja dopamina na presinaptičkim nervnim završecima, nastaju morfološke promene na neuronu, koje su praćene degenerativnim promenama nervnih krajeva i, konačno, kliničkim znakovima neurotoksičnosti. Prema rezultatima, ciljno mesto delovanja AA u CNS i PNS su presinaptički završeci nerava (LoPachin i sar., 2006).

Mehanizam neurotoksičnog delovanja AA još nije sasvim poznat, ali se pretpostavlja da uzrokuje oštećenja neurona koji se manifestuju perifernim degenerativnim promenama. Postoje dve hipoteze o mehanizmu neurotoksičnosti AA. Jedna podrazumeva inhibiciju kinezin-posredovanog brzog aksonskog transporta (Stickles i sar., 2002), a druga direktnu inhibiciju neurotransmisije (LoPachin, 2002). Većina studija ukazuje da se mehanizam neurotoksičnosti AA verovatno ostvaruje posredstvom inaktivacije kinezina i dineina, proteina uključenih u transaksonalni transport (Tyl i Friedman, 2003). Potencijalne interakcije AA sa tubulinom i drugim proteinima citoskeleta mogu dovesti do efekta akumulacije mikrofilamenata i povećanja količine proteina neurofilamenata u mozgu i kičmenoj moždini (Gupta i Abou-Donia, 1996).

1.6.4 Kancerogenost

Na bazi brojnih studija na životinjskim modelima, IARC je 1994. godine uvrstila AA u grupu hemikalija 2A koje su „verovatno kancerogene za ljude“. Pored direktne genotoksičnosti kao primarnog mehanizma tumorogeneze AA, pretpostavlja se da bi AA mogao izazvati nastanak tumora i putem ne-genotoksičnih mehanizama, kao što su izazivanje hormonskog disbalansa, ćelijske proliferacije ili interakcije sa motornim proteinima u ćeliji (Bolt, 2003, Friedman, 2003; Tyl i Friedman, 2003).

Formiranje „DNK adukata“ sa kancerogenim supstancama ili njihovim reaktivnim metabolitima čini inicijalni korak kancerogeneze (Manière i sar., 2005). U embrionalnim ćelijama hrčka AA je indukovao morfološke promene i redukovao nivo GSH (Park i sar., 2002). Dodavanjem *N*-acetil-L-cisteina uz AA, pomenute promene su bile ublažene (Park i sar., 2002). Ovakvi rezultati sugerišu da se AA i GA mogu ponašati kao alkilujućim agensima, indukovati tačkaste mutacije u DNA (bazne supstitucije) i time inicirati kancerogenezu (Friedman, 2003).

Iako GA ima veći afinitet ka DNA od AA, oba molekula (AA i GA) mogu modifikovati DNK u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Solomon i sar., 1985; Dearfield i sar., 1995; Solomon, 1999). Naime, pokazano je da GA ima 100 do 1000 puta veću reaktivnost sa DNA nego što je to slučaj sa AA (Sagerback i sar., 1995). Istraživanje na miševima ukazuje na signifikantno veće vezivanje AA za DNA nakon dermalne aplikacije, nego kada se AA aplikuje oralno (Carlson i sar., 1986).

Studije na pacovima nisu utvrdile da AA ima ciljna tkiva/organe kod kojih izaziva kancerogenezu. Mnogi organi kod kojih je AA izazvao tumorogenezu imaju endokrinu funkciju, odnosno ta tkiva karakteriše relativno visok nivo metabolizma i aktivnosti (Dourson i sar., 2008). Na osnovu dostupnih podataka, pretpostavlja se da su razlike u metaboličkoj aktivnosti među tkivima ključna odrednica AA-indukovane kancerogeneze (Dourson i sar., 2008). Takođe, nije poznato zašto u jetri pacova, koja ima visok metabolički kapacitet za formiranje GA, ne dolazi do tumorogeneze. Nasuprot njoj, mnoga tkiva sa manjim metaboličkim kapacitetom, a među njima su i tkiva regulisana hormonima, razvijaju tumore (Dourson i sar., 2008).

Nadalje, zavisno od vrste glodara, pokazano je prisustvo diskretnih i specifičnih razlika, kako u metabolizmu AA, tako i u njihovoj osetljivosti prema ovom toksikantu. Tako je procenjeno da miševi mogu biti i do 10 puta osetljiviji na AA u odnosu na pacove (Paulsson i sar., 2001). Smatra se da je kod glodara GA glavni kancerogeni metabolit AA (Friedman, 2003). Nakon oralne administracije 0,1 mg/kg tm AA, pik koncentracije GA u krvi i tkivima glodara može dostići nivo i do 1 μ M (Doerge i sar., 2005a). Takođe, kod miševa je detektovan 3-10 puta veći nivo „GA-Hb adukata“ nego kod pacova (Friedman, 2003). Metaboličke i druge razlike koje mogu postojati među pojedinim sojevima pacova mogu značajno doprineti kvalitativnim i kvantitativnim varijacijama u podložnosti organizma za razvoj tumora (Dourson i sar., 2008).

Eksperimenti na miševima i pacovima su pokazali da AA ima tumorogeni potencijal (Rice, 2005). Za razliku od ljudi, kod pacova su studije kancerogenog potencijala AA pokazale povećanu incidencu benignih i malignih tumora tireoidne žlezde, mlečne žlezde i tunike vaginalis testisa (Haber i sar., 2009; Maier i sar., 2012). Eksperimenti na miševima su pokazali da AA može povećati incidencu tumora mozga i CNS-a, kancera tireoidne i drugih endokrinih žlezda, kao i kancera reproduktivnih organa (Bull i sar., 1984). Neke studije sugerišu da evaluirani rizici o genotoksičnosti pojedinih supstanci nisu uslovljeni vrstom organizma, kao i da se procenjeni relativni rizici od kancera kod životinja mogu ekstrapolisati i primeniti na ljude (Granath i sar., 1999).

Dugoročne (dvogodišnje) studije na pacovima su pokazale da tretman AA povećava incidencu pojave tumora nekoliko organa, kao što su mezoteliomi tunike vaginalis, fibroadenomi i adenokarcinomi mlečnih žlezda, adenomi i karcinomi tireoidne žlezde (Johnson i sar., 1986; Friedman i sar., 1995). Pored toga, Johnson i sar. (1986) su zabeležili povećanu frekvencu primarnih feohromocitoma adrenalne žlezde, kao i tumora astrocita u mozgu i kičmenoj moždini. Međutim, ovi rezultati nisu potvrđeni kasnije (Friedman i sar., 1995).

U okviru dvogodišnjeg (hroničnog) tretmana ženki i mužjaka Fischer 344 pacova dozama AA od 0,01; 0,1; 0,5 i 2 mg/kg tm/dan ispitani su njegovi toksični i kancerogeni efekti (Gorzinski i sar., 1984; Johnson i sar., 1986). Povećan mortalitet pacova oba pola se javio u periodu od 21. meseca do kraja tretmana, pri većim dozama AA. Kod ženki je zabeležena povećana incidenca tumora CNS (glijalni tumori), adenom hipofize, tireoidee (folikularni adenom i adenokarcinom), mlečne žlezde, uterusa (adenokarcinom), dok se kod mužjaka javio povećan broj tumora tireoidee (folikularni adenom), nadbubrežne žlezde (feohromocitom) i tunike vaginalis testisa (peritestikulami mezoteliom) (Gorzinski i sar., 1984; Johnson i sar., 1986).

Drugi dvogodišnji tretman mužjaka i ženki Fisher 344 pacova u intervalu doza od 0 do 2 mg/kg tm/dan AA putem pijace vode imao je slične rezultate kao i prethodna studija (Friedman i sar., 1995). Naime, veće doze AA su kod ženki povećale incidencu tumora tireoidee i mlečne žlezde, a kod mužjaka tumora tireoidee i tunike vaginalis testisa (Friedman i sar., 1995). Studija ukazuje da indukcija tumorogeneze kod pacova kreće već pri dnevnoj dozi AA od 1 mg/kg tm (Friedman i sar., 1995). Mortalitet životinja se povećao pri većim dozama AA i to kod mužjaka nakon 17. meseca tretmana, a kod ženki nakon 23. meseca (Friedman i sar., 1995).

Kako bi se ispitaio efekat kombinacije kukuruznog ulja i AA na indukciju i razvoj kancera kolona, mužjacima Sprague-Dawley pacova je 8 nedelja davana hrana sa 10% kukuruznog ulja u kombinaciji sa intraperitonealnom injekcijom AA od 10 mg/kg tm (Zhang, 2009). Kod pacova tretiranih ovom kombinacijom, u mukozi kolona zabeležen je smanjen nivo apoptoze i povećan nivo ćelijske priliferacije. U mitohondijama je pokazana inhibicija p53, što se manifestovalo smanjenjem njegove lokalizacije u ovim organelama, dok je njegov nivo u citosolu bio uvećan. Ovo je rezultovalo povećanjem ekspresijom mitohondrijalnog anti-apoptotskog markera, Bcl-2, i smanjenom ekspresijom pro-apoptotskog markera, Bax, inhibicijom otpuštanja citohroma c iz mitohondrija u citosol i redukcijom nivoa i aktivnosti Caspase 3 (Zhang, 2009). Rezultati studije sugerišu da simultana i dugoročna ekspozicija pacova kukuruznom ulju i AA stimuliše razvoj kancera kolona inhibicijom apoptoze, koja je posredovana tumor supresorom p53 i zavisna od mitohondrija (Zhang, 2009).

Nekoliko studija se bavilo ispitivanjem efekte AA na tireoidnu žlezdu. Ženkama Fischer 344 pacova, starih 42 dana, je putem gavaže aplikovano 2 ili 15 mg/kg tm/dan AA tokom 2, odnosno 7 dana (Khan i sar., 1999). Oba vremenska intervala ekspozicije AA su izazvala povećanje visine folikularnog epitela tireoidee i smanjenje količine koloida, pri čemu su dobijene vrednosti parametara bile slične za obe primenjene doze AA (Khan i sar., 1999). Uočene su diskretne promene u nivoima TSH i T4. U grupama tretiranim 7 dana je bilo prisutno dozno-zavisno povećanje T4. Nivo TSH je bio smanjen u grupi tretiranoj 7 dana sa 15 mg/kg tm/dan AA, dok je u grupi tretiranoj 7 dana sa 2 mg/kg tm/dan AA nivo TSH bio povećan (Khan i sar., 1999).

Mužjaci Fischer 344 pacova (starosti ~70 dana) su tretirani sa 2,4; 10 ili 43 mg/kg tm/dan AA preko pijaće vode tokom 14 dana (Bowyer i sar., 2008a). Kod pacova tretiranih sa 43 mg/kg tm AA, nivo T4 je značajno opao, dok su nivoi T3 i rT3 imali nesignifikantno dozno-zavisno povećanje. Ni jedan tretman nije uticao na nivo TSH. Promene u ćelijskoj morfologiji, proliferaciji ili apoptozi nisu zabeležene (Bowyer i sar., 2008a).

U okviru jedne studije, Fischer 344 pacovi (starosti 8 nedelja) su tretirani dozama od 1,4; 4,1; 12; 19 i 25 mg/kg tm/dan AA (mužjaci) i 1,3; 4,3; 9; 19 i 24 mg/kg tm/dan AA (ženke) tokom 28 dana, putem pijaće vode (Friedman i sar., 1999). Tokom 4. nedelje tretmana 3 mužjaka iz grupe tretirane najvećom dozom su uginula. Pored toga, pre završetka studije je bilo usmrćeno

još 5 mužjaka i 4 ženke iz grupa sa najvišim dozama zbog veoma lošeg zdravstvenog stanja. Životinje tretirane sa najvećim dozama AA (25, odnosno 24 mg/kg tm AA) su imale redukovane telesne mase, smanjen unos hrane i vode. Redukovana telesna masa je zabeležena kod oba pola pri tretmanu sa 19 mg/kg tm AA, i kod mužjaka tretiranih sa 12 mg/kg tm AA. Doze ≥ 19 mg/kg tm AA su izazvale neurotoksičnost kod oba pola (Friedman i sar., 1999). Nakon 14 dana od početka tretmana, kod mužjaka i ženki su nivoi T3 i T4 imali pozitivan linearan trend u odnosu na primenjenu dozu AA, s tim da je interval navedenih promena kod ženki bio manji, a trend promena manje signifikantan u odnosu na mužjake. Međutim, dok je kod mužjaka nivo TSH ostao nepromenjen u svim tretmanima, kod ženki tretiranih najvišom dozom AA, nivo TSH je bio značajno smanjen (Friedman i sar., 1999). Nakon 28 dana tretmana, nivo T3 i T4 je pokazao značajno dozno-zavisno smanjenje u grupama mužjaka tretiranih sa ≥ 19 mg/kg tm AA u odnosu na kontrolnu grupu. TSH je bio povećan u grupi mužjaka sa najvećom dozom AA u odnosu na kontrolu. Kod ženki, nakon 28 dana nisu zabeležene dozno-zavisne promene u nivoima T4 i TSH, dok je T3 imao neznatno smanjenje samo pri najvećoj dozi AA (Friedman i sar., 1999).

Pokazano je da hronični tretman AA pijaćom vodom kod pacova oba pola povećava incidencu neoplazija srži nadbubrega (feohromocitomi) i tireoidne žlezde (adenomi) (Johnson i sar., 1986; Friedman i sar., 1995). Pored toga, kod mužjaka pacova povećava učestalost neoplazija u testisima (mezoteliomi), a kod ženki incidencu neoplazija mlečne žlezde (Johnson i sar., 1986; Friedman i sar., 1995). Lafferty i sar. (2004) su ispitali efekat AA na parametre ćelijskog rasta (sinteza DNK, mitozu i apoptozu) u tkivima koja su podložna razvoju neoplazija usled tretmana AA (tireodna žlezda, medula nadbubrežne žlezde i testisti) i u tkivima kod kojih nije zabeležen ovakav efekat AA (jetra i kora nadbubrežne žlezde). Istovremeno je ispitan uticaj oksidativnog metabolizma AA na sintezu DNK u navednim tkivima (Lafferty i sar., 2004).

Adultni mužjaci Fischer 344 i Sprague-Dowley pacova tretirani su dozom od 2 ili 15 mg/kg tm/dan AA, *per os*, tokom 7, 14 i 28 dana (Lafferty i sar., 2004). Prema dobijenim nalazima, u tireocitima Fischer 344 pacova, obe doze AA su izazvale povećanu sintezu DNK, dok je kod Sprague-Dowley pacova ovaj efekat bio detektovan samo pri dozi od 15 mg/kg tm AA (Lafferty i sar., 2004). U meduli nadbubrega povećana sinteza DNK je bila zabeležena kod oba soja pacova i pri obe doze, pri čemu je najveći stepen sinteze bio prisutan nakon 7 dana tretmana (Lafferty i sar., 2004). U testisima Fischer 344 pacova obe doze AA su izazvale povećanu sintezu DNK, u

svim vremenskim intervalima, dok je kod Sprague-Dowley pacova ona bila prominentna samo pri dozi od 15 mg/kg tm AA (Lafferty i sar., 2004). Nasuprot ovim tzv. „ciljnim“ tkivima, promene u sintezi DNK u jetri i kori naduburega, su izostale (Lafferty i sar., 2004). Promene vezane za apoptozu ili mitozu nisu pokazane ni u jednom od tretmana kod oba soja pacova (Lafferty i sar., 2004). Takođe, nije bilo promena u masi organa i telesnoj masi životinja, ni u jednom od tretmana kod oba soja pacova (Lafferty i sar., 2004). Konačno, studija je utvrdila da tretman dozom od 15 mg/kg tm AA izaziva povećanu sintezu DNK kod oba soja pacova, u svim vremenskim intervalima, i svim tkivima koja se smatraju ciljnim za razvoj tumora (tireoidna žlezda, testisi i srž nadbubrega), dok su nalazi za dozu od 2 mg/kg tm AA imali varijabilan karakter (Lafferty i sar., 2004). Razlike u DNK sintezi između dva ispitivana soja pacova mogu biti posmatrane i kroz aspekt različitog stepena biotransformacije AA u GA, obzirom da studija Hissink i sar. (1997) ukazuje na njeno postojanje.

Potvrđeno je da AA interaguje sa DNK, kao i da izaziva specifičan obrazac pojave neoplazija u određenim tkivima (Johnson i sar., 1986; Friedman i sar., 1995; Friedman, 2003; Lafferty i sar., 2004). Istraživanje Lafferty i sar. (2004) sugerše da AA ima potencijal selektivne indukcije DNK sinteze u tkivima koja podležu tumorogenim efektima AA. Takođe, postoje indicije da oksidativni metabolizam AA, odnosno njegovi metaboliti (primarno GA), ne moraju biti isključivi uzroci povećane sinteze DNK i eventualne ćelijske proliferacije, koja se može javiti nakon AA tretmana (Lafferty i sar., 2004). Ovo ukazuje na postojanje dodatnih faktora koji utiču na kancerogenost AA, pa je tako jedno od mogućih objašnjenja prisustvo epigenetičkih mehanizama koji doprinose tumorogenosti AA (Lafferty i sar., 2004).

Kod ženki Sprague-Dowley pacova (starosti ~6-7 nedelja na početku eksperimenta) nakon 30-nedeljnog tretmana sa 3,3 ili 5,6 mg/kg tm AA putem pijaće vode nisu zabeležene proliferativne promene na tireoidnoj žlezdi (Imai i sar., 2005). Juvenilni mužjaci Fischer 344 pacova su tretirani dozama od 1; 2,1 ili 4 mg/kg tm AA, a ženke dozama od 1,2; 2,5 ili 4,9 mg/kg tm AA putem pijaće vode tokom 12 nedelja (Imai i sar., 2008). Ni u jednom od tretmana nisu zabeležene histopatološke promene tireoidne žlezde. Signifikantno povećanje u relativnoj masi tireoidne žlezde je bilo prisutno kod ženki pacova tretiranih sa najvišom dozom AA (Imai i sar., 2008).

Cistična dilatacija tireoidnih folikula je pokazana nakon dvogodišnjeg tretmana Fischer 344 pacova sa AA u intervalu doza od 0,002 do 2 mg/kg tm (Johnson i sar., 1984). Tireoidna hiperplazija je nađena kod istog soja pacova nakon dvogodišnjeg tretmana mužjaka dozama od 0,002 do 2 mg/kg tm AA i ženki dozama od 0,002 do 3 mg/kg tm AA (Friedman i sar., 1995). Studija Johnson i sar. (1984) je pokazala značajno povećanje tumora folikularnih ćelija tireodne žlezde kod mužjaka i ženki pacova pri 2 mg/kg tm AA, dok su Friedman i sar. (1995) isti rezultat zabeležili pri 2 mg/kg tm AA kod mužjaka, odnosno 3 mg/kg tm AA kod ženki pacova (Friedman i sar., 1995).

Epidemiološke studije na ljudima još uvek nisu dokazale pozitivnu korelaciju između AA i povećanog mortaliteta kao posledice kancera (Marsh i sar., 1999; Dybing i Sanner, 2003; Rice, 2005). U okviru studije na švedskim potrošačima koji su konzumirali hranu sa srednjim (30-299 µg/kg) i visokim (300-1200 µg/kg) sadržajem AA nije pokazan povećan rizik od kancera creva, bubrega i mokraćne bešike (Mucci i sar., 2003). Postoje indikacije o pozitivnoj korelaciji između unosa AA putem hrane i rizika od kancera bubrega (Hogervorst i sar., 2008). Kod ljudi se još uvek ne može sa sigurnošću proceniti tumorogeni i/ili kancerogeni potencijal AA delom zbog nepoznate molekularne patogeneze veoma malih doza koje se unose putem hrane (Clement i sar., 2007). Postavlja se pitanje da li specifični transkripcioni odgovori mogu amplifikovati ili umanjiti pokazanu genotoksičnost AA.

Kod osoba izloženih AA u svom radnom okruženju nije pronađena korelacija između ekspozicije AA i povećanog mortaliteta izazvanog tumorima CNS-a, kancerom tireoidne žlezde, testisa, jednjaka, rektuma, pankreasa i bubrega (Marsh i sar., 2007; Swaen i sar., 2007). Mnoge epidemiološke studije vezane za prisustvo AA u hrani nisu zabeležile povećan rizik od nastanka kancera kod ljudi (Mucci i sar., 2003, 2004, 2005, 2006; Pelucci i sar., 2006; Hogervorst i sar., 2007).

Međutim, pri najvišem nivou ekspozicije AA kod žena nepušača zabeležen je povećan rizik od nastanka endometrijalnog kancera i kancera ovarijuma (Hogervorst i sar., 2007). Naime, rezultati istraživanja sugerišu da žene koje se nalaze u postmenopauzi, posebno one koje nisu pušači, a imaju povećan unos AA putem hrane, spadaju u rizičnu grupu za nastanak ovarijalnog i endometrijalnog kancera (Hogervorst i sar., 2007). Pokazana je i pozitivna korelacija između

nivoa „AA-Hb adukata“ u eritrocitima sa rizikom od kancera dojke. Žene kod kojih su izmerene najveće koncentracije „AA-Hb adukata“ imaju i 2,7 puta povećan rizik od nastanka estrogen-zavisanog kancera dojke (Olesen i sar., 2008). Pokazano je prisustvo monomera AA u mlečnim žlezdama ženki pacova nakon ingestije kontaminirane hrane (Sorgel i sar., 2002). Ipak, postojeći epidemiološki podaci još uvek ne pružaju sasvim uverljive dokaze o korelaciji između AA iz hrane i povećanog rizika od nastanka kancera (Dourson et al, 2008).

Pokazano je da tretman humanih epitelijalnih ćelijskih linija (MCF7 i CaCo-2) sa GA može uticati na tri velika sistema u ćeliji: na sistem detoksifikacije, antioksidativnu odbranu ćelije i na sistem tumorske progresije (Clement i sar., 2007). Zabeležena je „overekspresija“ nekoliko članova GSH signalnog puta, među kojima se nalaze enzimi involvirani u sintezu GSH, konjugaciju, kao i reciklirajuće korake, pri dozama od 0,1-1 μM GA. Pretpostavlja se da je ovo interval u kojem je GA efikasno neutralisan u pomenutim ćelijskim linijama (Clement i sar., 2007). Prema rezultatima ove studije, niske koncentracije GA mogu pokrenuti citoprotektivne reakcije, ali bi visoke doze GA, koje premašuju doze AA koje se nalaze u hrani, mogle pokrenuti transkripcione procese vezane za progresiju tumora (Clement i sar., 2007).

Nadalje, tretman humanih epitelijalnih ćelijskih linija (MCF7 i CaCo-2) niskim koncentracijama GA (0,1-1 μM) izazva povećanu aktivnost enzima epoksid hidrolaze 1, pa ovaj enzim može biti kandidat kao najosetljiviji transkripcioni biomarker za izloženost GA (Clement i sar., 2007). Veće koncentracije GA ($\geq 10 \mu\text{M}$) su indukovale povećanu ekspresiju tipičnih markera tumorske progresije kao što su aktivatori regulisani steroidnim hormonima, pozitivni regulatori nuklearnog faktora κB (NF- κB), stimulatora ćelijskog rasta i inhibitora apoptoze (Clement i sar., 2007). U skladu sa tim, ekspresija supresora ćelijskog rasta i molekula ćelijske adhezije su utišani (Clement i sar., 2007). Koncentracije GA $\geq 10 \mu\text{M}$ utiču na ekspresiju nekih od transkripata pri čemu dovode do: povećane ekspresije receptora aktivatora NF- κB (RANK), povećane ekspresije osteoprotegerina (OPG), tzv. „receptora mamca“, koji inhibira pokretanje apoptotičkih signalnih puteva, povećane ekspresije receptora za insulinu-slični faktor rasta 2 (IGFR2) koji stimuliše ćelijsku proliferaciju, smanjene ekspresije IGFBP2, IGFBP4, IGFBP5, odnosno proteina koji mogu smanjiti aktivnost IGF (Clement i sar., 2007). Najprominentiniji rezultat ove studije ukazuje da su brojni GA-inducibilni geni članovi NF- κB signalnog puta, ključnog medijatora u ćelijskim odgovorima na stres (Clement i sar., 2007). Pokazano je da GA može povećati

konstitutivnu aktivnost NF- κ B kompleksa koji pokreće anti-apoptičke signalne puteve i tako omogućava pokretanje mehanizma kojima tumorske ćelije izbegavaju apoptozu (Clement i sar., 2007). Takođe, NF- κ B učestvuje u regulaciji ćelijske proliferacije, angiogeneze, migriranja tumorskih ćelija i njihove invazivnosti (Karin, 2006). Konstitutivna stimulacija NF- κ B signalnog puta je pokazana u podgrupi visoko-rizičnih kancera dojki sa lošim prognozama (Zhou i sar., 2006).

Tretmani humanih epitelijalnih ćelijskih linija većim koncentracijama GA ($\geq 10 \mu\text{M}$) izazvali su promene u ekspresiji i nekoliko aldo-keto reduktaza (AKRC1, AKRC2 i AKRC3) koje se dovode u vezu sa kancerom dojke i prostate (Clement i sar., 2007). Ovi enzimi imaju sposobnost da katališu konverziju inaktivnih androgenih i estrogenih prekursora u biološki potentne steroidne hormone kao što su: testosteron, 3 α - i 3 β -androstendiol i 17 β -estradiol (Lin i sar. 2004). Prema ovim podacima efekti AA ili GA se mogu posmatrati u svetlu njihovog uticaja na hormonsku aktivnost, koje bi dodatno pojačale njihove genotoksične karakteristike. Rice (2005) je sugerisao na pozitivnu korelaciju dugoročnog tretmana glodara sa AA i razvoja tumora endokrinih žlezda i drugih hormon-zavisnih tkiva, kao što su testikulatni mezoteliomi, adenomi i karcinomi mlečnih žlezda. Još nema podataka koji bi podržali endokrini mehanizam delovanja AA ili GA. Ipak, postojeći podaci ukazuju da se razvoj tumora u steroid-zavisnim tkivima može dovesti u pozitivnu korelaciju sa izloženošću AA preko povećane aktivnosti aldo-keto reduktaza (Clement i sar., 2007).

Nedostatak pouzdanih podataka o kancerogenosti AA kod ljudi je jedan od faktora koji otežava adekvatnu procenu ukupne razmere zdravstvenog rizika koji sa sobom nosi njegova široka rasprostranjenost u hrani (Erdreich i Friedman, 2004).

1.6.5 Genotoksičnost

Mala količina slobodnog AA i/ili GA koja zaobiđe tzv. „tiolsku barijeru“, odnosno fazu detoksifikacije putem SH grupa aminokiselina, ima potencijal da reaguje sa DNK. Genotoksični (klastogeni) efekti AA najvećim delom se ostvaruju posredstvom njegovog epoksida, GA, koji vrši alkilovanje DNK (Granath i sar., 2001; Abramsson-Zetterberg, 2003; Friedman, 2003), obzirom da su *in vitro* studije pokazale da AA veoma slabo stvara „adukte“ sa DNK (Solomon i sar., 1985).

Direktna genotoksičnost AA ili GA posredovana je vezivanjem ovih molekula za DNK, a odvijanje reakcije ne zavisi od dostizanja određenog praga koncentracije (engl. *threshold*) (Maniére i sar., 2005). „Threshold reakcija“ (engl. *threshold reaction*) predstavlja reakciju uslovljenu dostizanjem granične vrednosti određenog parametra (koncentracije, temperature i sl.), kako bi uopšte došlo do njenog odvijanja (Maniére i sar., 2005). GA se smatra mutagenom supstancom, a „GA-DNK adukti“ se formiraju u mnogim tkivima prema lineranom, dozno-zavisnom obrascu. Prisustvo ovih „adukata“ je pokazano u brojnim tkivima u kojima nije došlo do tumorogeneze (Maniére i sar., 2005).

Postoje indicije da AA može izazvati nastanak tumora i putem ne-genotoksičnih mehanizama, odnosno indirektno genotoksičnosti, preko vezivanja za proteine, remećenjem funkcionisanja deobnog vretena ili preko hormonskog disbalansa (Bolt, 2003; Friedman, 2003; Tyl i Friedman, 2003). Reakcije sa proteinima mogu biti uzrok indirektno genotoksičnosti, a remećenje endokrinih funkcija bi moglo voditi kancerogenezi (Maniére i sar., 2005). Kod ljudi se potencijalni kancerogeni efekat AA primarno posmatra u svetlu njegove *in vivo* i *in vitro* genotoksičnosti koja može izazvati formiranje mikronukleusa (Higashikuni i sar., 1994, Schriever-Schwemmer i sar., 1997), hromozomskih aberacija, ometanje u razmeni genetičkog materijala između sestrinskih hromatida i remećenja mitoze u *in vitro* uslovima (Adler i sar., 1993). Dakle, AA se smatra klastogenim agensom, a mehanizam koji posreduje njegovoj klastogenosti jesu interakcije sa hromozomima ili hromozomalnim proteinima (Carere i sar., 2006). Vezivanje AA ili GA za proteine je uslovljeno dostizanjem kritičnih koncentracija ovih molekula, odnosno ovakvi procesu imaju tzv. „*threshold*“ i nemaju linearnu zavisnost (Maniére i sar., 2005; Carere i sar., 2006).

Mutageni potencijal AA je ispitivan *in vitro* na humanim i mišjim ćelijskim kulturama. Rezultati sugerišu da se mutagenost AA dovodi u korelaciju sa sposobnošću formiranja „GA-DNK adukata“ i može biti objašnjena „tačkastim“ mutacijama (engl. *point mutation*) tipa A-G tranzicija i G-C transverzija (Besaratina i Pfeifer, 2003; 2004). Tretman miševa sa ≥ 25 mg/kg tm AA je pokazao neophodnost aktivnosti CYP2E1 enzima za izazivanje genetičkog oštećenja u somatskim ili germinativnim ćelijama (Ghanayem i sar., 2005). Brojna *in vivo* i *in vitro* istraživanja su potvrdila da je AA genotoksičan za somatske i germinativne ćelije (European Commission, 2000; Abramsson-Zetterberg, 2003), i da su „GA-DNK adukti“ identifikovani u

većem broju organa kod miševa i pacova (Segerbäck i sar., 1995; Gamboa da Costa i sar., 2003). Prema tome, potencijal za izazivanje tačkastih mutacija u molekulu DNK pripisuje se prvenstveno molekulu GA (Dourson i sar., 2008).

Pokazano je da AA remeti funkciju deobnog vretena (Adler i Parry, 1993), izaziva hromozomske aberacije u kosnoj srži miša pri 50 mg/kg tm AA (*i.p.*) (Adler i sar., 1988) i 100 mg/kg tm AA (*i.p.*) (Shiraishi, 1978). Mnoge studije su, kao efekte AA, zabeležile pojavu mikronukleusa u ćelijama kosne srži (Adler i sar., 1988), perifernoj krvi i slezini (Russo i sar., 1994; Abramsson-Zetterberg, 2003). Mikronukleusi su indikator hromozomskih oštećenja, i obično nisu posledica direktne reaktivnosti sa DNK, već rezultat disfunkcije deobnog vretena i/ili neadekvatne hromozomske segregacije (Dourson i sar., 2008). Ovo sve potvrđuje da se klastogeni efekti AA ostvaruju njegovom interakcijom sa proteinima u ćeliji.

Na osnovu podataka dobijenih *in vivo* istraživanjima na laboratorijskim životinjama i ljudima, i *in vitro* studijama na ćelijskim kulturama, AA se smatra genotoksičnim preko klastogenog efekta, dok se GA smatra mutagenom supstancom (Dourson i sar., 2008).

U tretmanu mužjaka pacova jednom dozom AA (*p.o.*) u koncentraciji od 18, 36 ili 54 mg/kg tm, ispitani su mehanizmi genotoksičnosti kod AA-indukovane kancerogeneze. Analizirana su oštećenja DNK i određivani nivoi dve forme „GA-DNK adukata“ kao markera genotoksičnosti AA: N7-(2-carbamil-2-hidroksietil)guanina (N7-GA-Gua) i N3-(2-carbamil-2-hidroksietil)adenina (N3-GA-Ade) (Manière i sar., 2005). Rezultati su pokazali relativno podjednaku distribuciju i poluživot „GA-DNK adukata“ u mozgu, testisima i jetri, što sugeriše da nema njihove selektivne akumulacije između analiziranih organa (Manière i sar., 2005). „N7-GA-Gua adukti“ su bili prisutni u višestruko većim količinama u organima pacova u odnosu na „N3-GA-Ade adukate“, što se može pripisati većem stepenu reaktivnosti N7 u Gua u odnosu na N3 u Ade (Manière i sar., 2005). Zapaženo je i da su „N3-GA-Ade adukti“ brže uklanjani iz jetre, testisa i mozga u odnosu na „N7-GA-Gua adukate“, što se tumači manjom stabilnošću prvog „adukta“ u odnosu na drugi (Manière i sar., 2005). U uzorcima mozga i testisa je zabeležen povećan stepen oštećenja DNK lanaca, dok je kod uzoraka jetre, kosne srži i nabubrežnih žlezda on bio manji (Manière i sar., 2005). Autori predlažu leukocite, odnosno evaluaciju stepena oštećenja njihove DNK, kao još jedan biomarker izloženosti AA (Manière i sar., 2005).

In vivo istraživanja na miševima i pacovima beleže da izlaganje AA dovodi do stvaranja „DNK adukta“ koji su posledica vezivanja GA za N7 poziciju u guaninu i N3 poziciju u adeninu u DNK lancu (Segerback i sar., 1995; Doerge i sar., 2005c). Prisustvo „DNK adukata“ kod miševa je pokazano: u leukocitima, plućima, jetri, bubrezima i testisima, a kod pacova: u kosnoj srži, leukocitima, jetri, mlečnoj žlezdi, mozgu i tireoidnoj žlezdi. Pored toga, studije su pokazale relativno ujednačene nivoe „DNK adukata“ u jetri, plućima, bubrezima, slezini, mozgu i testisima što sugeriše na odsustvo tkivno-specifične tumorogeneze (Segerback i sar., 1995; Doerge i sar., 2005c).

Nedostatak tkivno-specifične DNK reaktivnosti sa AA može se objasniti razlikama koje postoje između tkiva, a tiču se stepena njihove metaboličke aktivnosti i/ili podložnosti za nastanak oštećenja genetičkog materijala u ćelijama. Zahvaljujući svom velikom afinitetu ka SH grupama proteina (Cavins i Friedman, 1968), AA može izazvati indirektna oštećenja DNK, posebno u brzo-rastućim ćelijama ili ćelijama koje imaju niži kapacitet održavanja adekvatnog oksido-redukcionog balansa. Tako bi reakcijom sa proteinima koji kontrolišu hromozomsku segregaciju, AA mogao izazvati genetička oštećenja. Alternativa ovom mehanizmu je vezivanje AA za SH grupe GSH. Na ovaj način bi potencijalno narušavanje homeostaze GSH moglo dovesti do oksidativnog stresa, ali i oštećenja DNK (Dourson i sar., 2008).

Tretman monomernim AA je izazvao morfološku transformaciju embrionalnih ćelija sirijskog hrčka (Park i sar., 2002). Činjenica da je uz AA aplikovan i inhibitor oksidativnog metabolizma AA, što je smanjilo oksidaciju AA u GA, ukazuje da je AA odgovoran za promene koje su uočene na embrionalnim ćelijama (Park i sar., 2002). Takođe, transformacija ćelija je bila veća u simultanom tretmanu AA sa inhibitorom sinteze GSH, dok je kod ćelija tretiranih kombinacijom AA i donora SH grupa stepen transformacije bio manji (Park i sar., 2002). Na osnovu ovih podataka se može reći da AA izaziva smanjenje nivoa GSH u ćeliji, i da se ćelijska transformacija makar jednim delom odvija zahvaljujući remećenju homeostaze GSH. Oksidativni stres uz potencijalnu disregulaciju homeostaze GSH može biti ključni mehanizam AA-indukovanog oštećenja DNK (Park i sar., 2002).

U *in vitro* uslovima AA izaziva oštećenja DNK u ćelijskoj kulturi hepatocita pacova (Puppel i sar., 2005). Na linijama tireoidnih ćelija pacova je pokazano da tretmani sa AA koji *in vitro* izazivaju oksidativni stres, dovode do redukovanja GSH nivoa i izazivaju oštećenja DNK

(Chico Galdo i sar., 2006). *In vivo* genotoksičnost AA se manifestovala u formi DNK oštećenja leukocita, mozga i testisa Sprague-Dawley pacova nakon 24 h od aplikacije pojedinačne doze ≥ 18 mg/kg tm AA (Maniére i sar., 2005). Big Blue miševi tretirani 3-4 nedelje pijaćom vodom koja je sadržavala ~ 19 mg/kg tm AA imali su povećanu frekvenciju mutacija u limfocitima i jetri, ali bez povećane incidence tumorogeneze (Manjanatha i sar., 2006).

Kod pacova se pri manjim dozama AA formira proporcionalno veća količina GA (Maniére i sar., 2005). Povećan stepen oštećenja DNK i povećan nivo „GA-DNK adukata“ koji su nađeni u uzorcima mozga pacova tretiranih sa 36 i 54 mg/kg tm (Segeberäck i sar., 1995; Maniére i sar., 2005) sugerišu na genotoksični potencijal GA na mozak, obzirom da AA i GA prolaze krv-moždanu barijeru. Tretman pacova dozom od 18 mg/kg tm AA zabeležio je najviši nivo formiranih „GA-DNK adukata“ u odnosu na 36 ili 54 mg/kg tm, ali nije pokazan značajno veći stepen oštećenja DNK (Maniére i sar., 2005).

U jetri i kosnoj srži pacova, 5 h nakon administracije AA, zabeležen je nizak i prolazan efekat oštećenja DNK (Maniére i sar., 2005), što je potvrdilo nalaze ranijih studija (European Commission, 2000; Paulsson i sar., 2002; Paulsson i sar., 2003). Nakon jedne ili ponovljenih ekspozicija, AA nije indukovao neprogramiranu DNK sintezu u hepatocitima pacova *in vivo*, dok GA nije dao jasna efekat (European Commission, 2000; Maniére i sar., 2005). U leukocitima, stepen AA-izazvanog oštećenja DNK korelira sa relativno visokim koncentracijama ovog molekula u plazmi ($\sim 15,9$ $\mu\text{g/ml}$, 5 h posle oralne administracije). Ovaj efekat bi mogao biti rezultat formiranja veće količine GA u jetri, koja je dospela u cirkulaciju. Stepen oštećenja DNK leukocita bi mogao biti validan biomakrer ekspozicije većim dozama AA (Maniére i sar., 2005). U eritrocitima kosne srži pacova nije zabeležen povećan broj formiranih mikronukleusa nakon AA tretmana, dok je njihova frekventnost nakon tretmana GA bila osrednja (Paulsson i sar., 2002; Paulsson i sar., 2003; Maniére i sar., 2005).

Značajna *in vivo* genotoksičnost je zabeležena brojnim studijama gde je tretman varirao od pojedinačne doze AA, pa do četvoronedeljnog tretmana AA (Abramsson-Zetterberg, 2003; Klaunig i Kamendulis, 2005, Maniére i sar., 2005; Manjanatha i sar., 2006). Uočena genotoksičnost prisutna pri dozama koje su manje u odnosu na doze AA koje su izazvale povećanu incidencu tumora u studijama na pacovima (Johnosn i sar., 1986; Friedman i sar., 1995).

Istraživanja vezana za tumorogenezu štitne žlezde pacova sugerišu da niske doze AA izazivaju mutagenezu, dok se pri višim dozama AA javlja ćelijska proliferacija (Dourson i sar., 2008). Prema ovoj studiji, tumorogeneza se javlja pri dozama AA koje su veće u odnosu na one pri kojima se ostvaruje genotoksičnost, što sugeriše da nastanak tumora nije uzrokovan genotoksičnošću AA.

Na bazi dosadašnjih rezultata istraživanja, moguće je zaključiti da se genotoksičnost AA bazira na izazivanju klastogenih efekata, dok je genotoksičnost GA posredovana mutagenim efektima (Koyama i sar., 2006).

1.6.6 Reproductivna toksičnost

Podaci o reproduktivnoj toksičnosti AA su bazirani na rezultatima studija sprovedenih na životinjama. Molekularni mehanizam reproduktivne toksičnosti AA može biti posredovan alkilovanjem SH grupa u nukleusu i repu spermatozoida, smanjenjem nivoa GSH i/ili oštećenjem DNK u testisima (Dearfield i sar., 1995).

U testisima pacova su, nakon tretmana sa AA, zabeležena oštećenja DNK, a posebno efekti klastogeneze koji mogu biti posledica interakcije AA sa kinezinom i/ili hromozomalnim proteinima (Dearfield i sar., 1995). Malo je verovatno da vezivanjem AA za DNK nastaju „adukti“ sa mutagenim potencijalom (Sega i sar., 1989).

U spermi miševa se AA prvenstveno vezuje za protamine i smatra se da je to mehanizam kojim ostvaruje svoj toksični efekat. Nakon 3 nedelje ekspozicije AA, u spermi miševa je zabeležena upečatljiva korelacija između AA vezanog za protamine i indukcije mikronukelusa (Sega, 1989; 1991). Alkilovanje protamina bi moglo značajno doprineti nastanku AA-indukovanih genetičkih oštećenja u spermio-genim ćelijama miševa (Sega, 1989; 1991).

Na spermatidama kod glodara AA indukuje dominantne letalne mutacije u vidu klastogenih efekata, odnosno indukcije hromozomskih oštećenja ili prekida što vodi deleciji, adiciji i rearanžiranju delova hromozoma. Shodno ovim rezultatima, očekuje se da AA ima pomenuti mutageni efekat i kod sisarskih germinativnih ćelija (Shelby i sar., 1987, Adler i sar., 2002). Veoma niske doze AA mogu izazvati oštećenja na hromozomima spermatida kod miševa, što se

manifestovalo formiranjem mikronukleusa u ćelijama (Abramsson-Zetterberg, 2003). Kod miševa izloženih AA, dominantan genotoksični efekat ima GA (Paulsson i sar., 2003).

Pokazano je da tretman GA kod miševa inudukuje dominantne letalne mutacije i nasledne translokacije, koje su verovatno posledica klastogenih efekata, kao i neprogramiranu DNK sintezu, tj. DNK popravku (Generoso i sar., 1996). Prema Adler i sar. (2000), AA remeti funkciju motornih proteina, a time i funkcionisanje sperme, dok su dominantne letalne mutacije posledica interakcija GA sa hromatinom, što dovodi do klastogeneze. Costa i sar. (1992) smatraju da je monomerni AA primarno odgovoran za izazivanje periferne neurotoksičnosti, dok je za reproduktivnu toksičnost (posebno vijabilnost spermato- i spermiogenih ćelija) odgovoran GA.

Pokazano je da se reproduktivna toksičnost AA kod glodara javlja pri višestruko većim dozama u odnosu na one koje izazivaju neurotoksičnost (Tyl i Friendman, 2003). Kod pacova NOAEL za morfološke promene na nervima iznosi 0,2 mg/kg tm AA, dok je za reproduktivnu toksičnost ta vrednost 10 puta veća, odnosno iznosi 2 mg/kg tm AA. Pored toga, NOAEL za toksičnost kod adultne životinje iznosi <0,5 mg/kg tm AA, dok NOAEL za prenatalnu dominantnu letalnost iznosi 2,0 mg/kg tm AA (Tyl i sar., 2000a; Tyl i Friendman, 2003).

Pokazano je da doze AA koje imaju neurotoksični efekat, takođe imaju štetne posledice i po reproduktivni sistem, uključujući: smanjen fertilitet, povećan gubitak fetusa, smanjenu telesnu masu mladunaca pri porođaju, pojavu abnormalnosti u spermi i smanjenu brojnost spermatozoida (Sakamoto i sar., 1986; Chapin, i sar., 1995; Wisw i sar., 1995). Mužjaci pacova su pri oralnim dozama >7 mg/kg tm/dan AA imali smanjen fertilitet i promene u broju i morfologiji spermatozoida (EC, 2002; JECFA, 2005).

Rezultati studija na pacovima ukazuju da AA snižava nivo polnih hormona, remeti motilitet spermatozoida i indukuje testikularnu atrofiju (Tyl i Friedman, 2003). Monomer AA može izvršiti alkilovanje proteinskih SH grupa, kao što su protamini u nukleusu spermatozoida ili SH grupe proteina u repu spermatozoida, i izazvati smanjenje nivoa GSH, aminokiseline koja obnavlja SH grupe proteina i učestvuje u reakciji konjugovanja tj. formiranja metabolita AA namenjenih za njegovu neutralizaciju i izlučivanje iz organizma (Tyl i Friedman, 2003).

Tretman pacova vodenim ratsvorom AA tokom 5 dana u dozama od 5, 15, 30, 45 ili 60 mg/kg tm je izazvao smanjenu brojnost i morfološke abnormalnosti spermatozoida, što je posebno bilo izraženo pri ≥ 15 mg/kg tm AA (Yang i sar., 2008). Doze AA od 45 i 60 mg/kg tm su smanjile vijabilnost Leydig-ovih ćelija, dok je koncentracija serumskog testosterona značajno smanjena pri ≥ 30 mg/kg tm AA (Yang i sar., 2008). Histopatološka analiza seminifernih tubula testisa je pokazala degenerativne promene germinativnog epitela pri 60 mg/kg tm AA. Ovde je takođe, zapažena mestimična atrofija seminifernih tubula sa gubitkom germinativnog epitela, odlubljivanje spermatogenih ćelija u lumen tubula, prisustvo multinuklearnih hipertrofisanih ćelija, pojava vakuolizacije i brojnih apoptotičnih ćelija, smanjena vijabilnost Leydig-ovih ćelija, kao i smanjena sinteza i sekrecija testosterona, što se finalno odrazilo na proces spermatogeneze pacova (Yang i sar., 2008).

Izloženost AA tokom trudnoće ima za posledicu transplacentalnu izloženost ploda ovom ksenobiotiku, što može ugroziti njegovo zdravlje. Pokazano je da AA i njegov epoksid, GA, podjednako uspešno prolaze iz krvi majke kroz placentu i ulaze u fetalnu cirkulaciju (Schettegen i sar., 2004; Annola i sar., 2008).

Adultni mužjaci i ženke pacova su tretirani AA putem pijaće vode u dozama 50-200 ppm tokom perioda parenja, gestacije i laktacije (do 10 nedelja) (Zenick i sar., 1986). Ovaj tretman je imao za posledicu da se pri većim dozama AA manifestuju poremećaji u njihovom parenju, sekreciji sperme, gubitkom telesne mase i smanjenim konzumiranjem tečnosti, a kod ženki je zabeležen povećan postimplantacioni gubitak ploda, a mladunci pacova su pri rođenju imali redukovanu telesnu masu (Zenick i sar., 1986). Smanjena fertilitnost i incidenca gravidnosti, povećan postimplantacioni gubitak i smanjen broj živih mladunaca po okotu, kao posledice AA tretmana, pokazani su i u studiji Tyl i sar. (2000b). Prema ovim autorima, dominantne letalne mutacije, izazvane AA, doprinose smanjenom broju fetusa.

Tretman ženki Wistar pacova sa 25 mg/kg tm/dan AA u periodu laktacije (0-21 dana) je kod njihovih mladunaca izazvao pojavu neurotoksičnosti, redukovanu telesnu masu i povećan mortalitet (Hussain i sar., 1987). Međutim, nakon što su mladunci odvojeni od majki, došlo je do njihovog oporavka, dostigli su normalnu telesnu težinu, a sumptomi neurotoksičnosti AA su bili ublaženi do 90. dana (Hussain i sar., 1987).

Mušjaci Long-Evans pacova su tretirani 5 dana dozama AA sa 5-60 mg/kg tm/dan AA (*p.o.*), a potom su pareni sa neizloženim ženka (Sublet i sar., 1989). Doze od 15-60 mg/kg tm/dan AA kojima su tretirani mušjaci pacova su prouzrokovale smanjen fertilitet i povećani postimplantacioni gubitak ploda, što je bilo veoma izraženo tokom prve 3 nedelje nakon tretmana sa AA (Sublet i sar., 1989). Tyl i sar. (2000b) su pokazali da se reproduktivna toksičnost kod mužjaka pacova manifestuje pri dozama od 45 i 60 mg/kg tm/dan AA.

Kod miševa NOAEL za gravidne ženke, kao i za normalan razvoj ploda iznosi 15 mg/kg tm/dan AA, dok je kod pacova NOAEL za gravidne ženke 2,5 mg/kg tm/dan AA, a za normalan razvoj ploda ≥ 15 mg/kg tm/dan AA (Field i sar., 1990). Ovi nalazi ukazuju na prisustvo razlika u stepenu otpornosti, odnosno senzitivnosti pomenute dve vrste glodara na toksičnost AA.

1.6.7 Hepatotoksičnost

Pretpostavlja se da AA ima hepatotoksični efekat. Podaci o efektima AA na jetru najvećim delom se baziraju na molekularnim ispitivanjima glavnih enzima koji učestvuju u metabolizmu AA. Histološke promene na jetri tokom procesa metabolisanja AA relativno su slabo istražene. Prema nekim istraživanjima na eksperimentalnom modelu pacova, sumnja se na hepatotoksično dejstvo AA koje može imati posledice i po viši nivo organizacije ovog organa (El-Bohi i sar., 2011; Rawi i sar., 2012).

Nalazi Veenapani i sar. (2010) su pokazali da hepatociti podležu oštećenju koje je izazvano AA već pri dozi ≥ 24 mg. Ova studija je zabeležila prisustvo strukturnih promena u lobulusu jetre, koje su se manifestovale degenerativnim promenama i prisustvom hiperplastičnih i binuklearnih hepatocita nakon izlaganja životinja AA (Veenapani i sar., 2010). U studiji su adultni mušjaci Wistar pacova tretirani dozama od 1, 2, 3, 4, 5 ili 6 mg AA/100 g tm, 6 puta na svakih 48 h, što znači da su životinje ukupno primile 6, 12, 18, 24, 30, odnosno 36 mg AA (Veenapani i sar., 2010). Nakon tretmana, histološka analiza jetre je pokazala da su svi tretmani izazvali određen stepen degenerativnih promena hepatocita, kao i promena na jetrinim sinusodima (Veenapani i sar., 2010). U grupi tretiranoj sa 6 mg AA zabeležene su degenerativne promene u vidu granuliranosti citoplazme hepatocita i kongestiju, odnosno nagomilavanje krvi u lumenu centralne vene (Veenapani i sar., 2010). Tretman sa 12 mg AA izazvao je mitotske promene u hepatocitima i hemoragiju u sinusoidima (Veenapani i sar., 2010). Doza od 18 mg AA je dovela

do pojave većeg broja hepatocita sa dva jedra, hepatocita u mitozu uz hipertrofiju njihovih jedara, i vaskularnu kongestiju (Veenapani i sar., 2010). Životinje tretirane sa 24 mg AA su imale brojne binuklearne hepatocite sa prominentnim jedarcima, hiperplastične hepatocite i vaskularnu kongestiju (Veenapani i sar., 2010). Jetra pacova, koji su primili 30 mg AA, karakterisala se prisustvom hiperplastičnih i binuklearnih hepatocita, kao i prominentnim nagomilavanjem mononuklearnih leukocita (Veenapani i sar., 2010), a doza od 36 mg AA je, uz prisustvo binuklearnih hepatocita, izazvala hemoragiju, proliferativne i hiperplastične promene jetrinih sinusoida (Veenapani i sar., 2010).

Na jetri juvenilnih mužjaka pacova tretiranih dozom od 15 mg/kg tm AA, u periodu od 28 dana, uočene su degenerativne promene na hepatocitima, a kod pojedinih su bili detektovani i znakovi apoptoze (Rawi i sar., 2012). Pored toga, u blizini hepatocita sa degenerativnim promenama, uočeno je propadanje Kupffer-ovih ćelija (Rawi i sar., 2012).

Tretman mužjaka pacova kombinacijom standardne hrane uz dodatak 7% recikliranog ulja, koje je sadržavalo AA, na jetri je izazvao oštećenja u formi tamnih mrlja, nekroze i krvarenja (Totani i sar., 2006; Totani i Ojiri, 2007a).

Histopatološka analiza jetre adultnih mužjaka pacova oralno tretiranih dozama od 50 ili 100 mg/kg tm AA, tokom 21 dana, pokazala je prisustvo značajnih dozno-zavisnih oštećenja njenog tkiva. Zabeležene su nekrotične i degenerativne promene u nekim hepatocitima, kao i prisustvo degenerativnih promena na Kupffer-ovim ćelijama (El-Bohi i sar., 2011). Jetra mužjaka tretiranih nižom dozom AA karakterisala se pojavom blagih, reverzibilnih degenerativnih promena, koje su se ogledale u vidu bubrenja ili poremećaja u transportu nekih hepatocita, propadanjem Kupffer-ovih ćelija, u kombinaciji sa dilatiranim ili opstruiranim krvnim sudovima (El-Bohi i sar., 2011). Pojava edema je bila prisutna u nekim periportalnim regionima, kao i proliferacija epitela žučnih kanala, zajedno sa infiltracijom limfocita (El-Bohi i sar., 2011). U jetri mužjaka tretiranih dozom od 100 mg/kg tm AA uočene su blage nekrotične promene parenhima, koje su se ogledale pojavom granuliranosti citoplazme i kariolize pojedinih nukleusa hepatocita, a u portalnom regionu je uočena infiltracija leukocita. Pored toga, infiltracija limfocita je zabeležena kako u portalnim regionu, tako i u okolnom inetrsticijelnom tkivu, uz pojavu teleangiektazije (pojava uvećanja i dilatacije kapilara) nekih sinusoida (El-Bohi i sar., 2011).

Na molekularnom nivou, u okviru istog eksperimenta, u hepatocitima je zabeležen poremećaj sinteze iRNK i sinteze proteina (El-Bohi i sar., 2011). Takođe, pokazan je i „izlazak“ proteina iz ćelija, što može sugerisati na narušenu strukturu i integritet ćelijske membrane (El-Bohi i sar., 2011). Tretman AA je značajno smanjio nivo CYP2E1 proteina u hepatocitima u dozno-zavisnom maniru (El-Bohi i sar., 2011). Pomenuto smanjenje je bilo praćeno redukovanim nivoom iRNK za CYP2E1 enzim (El-Bohi i sar., 2011). Ovo utišavanje *cyp2e1* gena je, takođe, bilo u dozno-zavisnom maniru (El-Bohi i sar., 2011). Istovremeno je pokazano značajno uvećanje broja jednolančanih prekida na molekulu DNK kao posledice tretmana molekulom AA (El-Bohi i sar., 2011). Poznato je da AA i GA poseduju afinitet za vezivanje za molekul DNK (Dearfield i sar., 1995), pri čemu su Doerge i sar. (2005c) zabeležili da je formiranje DNK „adukata“ u jetri sa GA i do 40% veće nego pri ekvimolarnim dozama AA. Ove interakcije mogu narušiti strukturu DNK, što se može negativno odraziti na transkripciju i sintezu proteina (Dearfield i sar., 1995). Prema tome, smanjenje količine CYP2E1 enzima može biti rezultat direktne citotoksičnosti GA, koja inhibicijom transkripcije *cyp2e1* gena u oštećenim hepatocitima, dovodi do redukcije nivoa njegove iRNK i time izaziva pad nivoa CYP2E1 proteina (El-Bohi i sar., 2011).

AA može izazvati smanjenje nivoa GSH u hepatocitima, što može dovesti do oksidativnog stresa, gubitka ćelijske vijabilnosti, apoptoze i/ili nekroze (Tong i sar., 2004). Izazivanjem oksidativnog stresa i remećenjem metabolizma lipida i proteina, AA bi mogao uzročiti strukturne promene na jetri pacova u razvoju (Allan i sar., 2010). U hepatocitima, stepen metaboličke bioaktivacije AA u GA je limitiran enzimskom aktivnošću CYP2E1 (Tareke i sar., 2002). Naime, konverzija AA u GA zahteva prisustvo i aktivnost CYP2E1 enzima, čiji nivo i aktivnost smanjuje sam AA (Tareke i sar., 2002; El-Bohi i sar., 2011). Takođe, konverzija AA u GA postaje efikasnija kako se doza smanjuje (Doerge i sar., 2005a), a reakcija formiranja GA prati Michaelis-Menten kinetiku (Kurebayashi i Ohno, 2006). El-Bohi i sar. (2011) ukazuju na neophodnost bioaktivacije AA u GA putem CYP2E1 enzima, koji se smatra glavnim uzrokom za nastanak oštećenja jetre (El-Bohi i sar., 2011).

Istraživanje na humanim hepatoma ćelijama HepG2 je pokazalo da predtretman ovih ćelija hidrositirozolum, antioksidansom iz maslinovog ulja, u koncentracijski-zavisnom maniru, značajno smanjuje citotoksičnost, DNK oštećenja i formiranje intracelularnih reaktivnih

kiseoničnih radikala, koji su izazvani koncentracijama 5 ili 10 mM AA, tokom 24 h (Zhang i sar., 2009). Takođe, pokazano je da ovaj molekul ublažava pad nivoa GSH kod ćelija tretiranih sa 10 mM AA (Zhang i sar., 2009).

Toksičnost AA je ispitivana na primarnoj kulturi hepatocita pacova, pri čemu su ćelije tretirane dozama od 0,1; 1 i 10 mM AA u trajanju od 30, 60 ili 120 min (Awad i sar., 1998). Smanjena vijabilnost je zabežena kod ćelija tretiranih dozom od 10 mM AA, tokom 30 min. i ćelija tretiranih dozom od 1 mM AA, tokom 60 min. Izlazak ALT enzima iz hepatocita bio je paralelno praćen smanjenjem njihove vijabilnosti (Awad i sar., 1998). Izlazak AST enzima iz ćelija je bio prisutan u tretmanu dozom od 10 mM AA, tokom 30 min., dok je doza od 1 mM AA izazvala isti efekat nakon 120 min. izlaganja ćelija. Doza od 10 mM AA je smanjila nivo GSH nakon 30 min. tretmana, dok je pri dozi od 1 mM AA isti efekat postignut nakon 60 min. Aktivnost enzima GST je rasla sa porastom doze AA, pri čemu je plato aktivnosti GST dostignut pri dozi od 5 mM AA (Awad i sar., 1998). Aktivnost CYP2E1 enzima bila smanjena nakon ekspozicije ćelija dozi od 10 mM (Awad i sar., 1998). Rezultati sugerišu da je efekat AA na vijabilnost hepatocita, izlazak ALT i AST iz ćelija, ćelijski nivo GSH i aktivost enzima GST dozno- i vremenski zavisna (Awad i sar., 1998). Prema nalazima Awad i sar. (1998), AA svoje toksične efekte ostvaruje i na nivou citoplazme, i na nivou mitohondija.

Genotoksičnost AA i GA je ispitana na 3 tipa sisarskih ćelijskih kultura: V79, CaCo-2 i primarnoj kulturi hepatocita (Puppel i sar., 2005). Na kulturi V79 i CaCo-2 je pokazano da sam AA ima slab potencijal za izazivanje oštećenja DNK, i da su samo najveće koncentracije AA (6 mM, tokom 24 h) izazvale značajniju pojavu prekida u lancu DNK (Puppel i sar., 2005). Ćelije u ćelijskoj kulturi V79 i CaCo-2 nemaju značajnu ekspresiju CYP2E1 enzima, te se ne očekuje efikasna konverzija AA u GA, a detektovani prekidi u lancu DNK se mogu pripisati samom AA. Međutim, kod primarnih hepatocita, iako je enzim CYP2E1 ekspresovan u značajnoj meri, nije zabeležena pojava DNK prekida (Puppel i sar., 2005). Tretman ćelijskih kultura molekulom GA ($\geq 100 \mu\text{M}$, 24 h), izazvao je značajan porast oštećenja DNK molekula u V79 kulturi ćelija i kulturi primarnih hepatocita (Puppel i sar., 2005). Kultura CaCo-2 ćelija se pokazala otpornijom u odnosu na ostale, pa su se oštećenja DNK molekula, odnosno prekidi u njegovom lancu, povećavali pri koncentracijama $>300 \mu\text{M}$ GA, tokom 24 h (Puppel i sar., 2005). Ovi podaci sugerišu da GA ima veći genotoksični potencijal od AA, ali pokazuju i da ekspresija CYP2E1

enzima sama po sebi nije nužno povezana sa povećanom genotoksičnošću AA (Puppel i sar., 2005). Studija je pokazala da pad intracelularnog nivoa GSH čini jedan od važnih faktora koji doprinosi genotoksičnosti AA (Puppel i sar., 2005). Inkubacija V79 ćelija sa 1 mM AA indukovala je značajan nastanak porekida u DNK molekulu. Ipak, pri većim koncentracijama AA ($\geq 1,25$ mM) uočeno je snažno uvećanje citotoksičnog efekta, koji se odražavao značajnijim gubitkom ćelijske vijabilnosti (Puppel i sar., 2005).

Citotoksičnost GA je evaluirana preko lipidne peroksidacije, ćelijske nekroze i gubitka intracelularnih enzima u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Reed, 1994). Nalazi pokazuju da se citotoksičnost GA javlja samo u uslovima kada intracelularna koncentracija GSH padne ispod 10-15% od inicijalne, pošto tada GSH nije dostupan za zaštitu ćelije od oksidativnog oštećenja (Reed, 1994). Tako, GA u koncentraciji od 3 mM izaziva prominentan pad GSH u primarnoj kulturi hepatocita Sprague-Dawley pacova, a preostali nivo GSH u ćelijama nije dovoljan da spreči ćelijsku smrt (Kurebayashi i Ohno, 2006). Prema tome, nivo GSH može biti faktor koji određuje citotoksičnost ksenobiotika i njegov efekat na preživljavanje ćelije (Kurebayashi i Ohno, 2006). Oba molekula, AA i GA, izazivaju vremenski- i dozno-zavisni pad nivoa GSH u ćeliji, pri čemu GA izaziva i do 1,5 puta izraženiji pad GSH nivoa u odnosu na AA (Kurebayashi i Ohno, 2006).

Prema navedenom, AA može izazvati prekide u lancu DNK molekula, pri čemu taj efekat ne mora direktno zavisiti od količine i nivoa aktivnosti CYP2E1 enzima u ćeliji (Puppel i sar., 2005). Smanjenje nivoa GSH je povezano sa povećanjem genotoksičnog efekta AA, ali takođe može biti u korelaciji i sa ključnim povećanjem citotoksičnosti (Puppel i sar., 2005). Moguće je da bi AA, slabljenjem antioksidativnog odbrambenog sistema ćelije, mogao ostvariti kako efekte citotoksičnosti, tako i efekte genotoksičnosti (Zhang i sar., 2008).

Ciljevi istraživanja

II CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Jetra predstavlja ključni organ u metabolizmu AA, molekula za koji se sumnja da poseduje hepatotoksični potencijal. Shodno tome, prisustvo AA u jetri, kao i proces njegove biotransformacije, nosili bi određeni rizik od oštećenja ovog organa. Ukoliko AA može poremetiti funkcionalni status hepatocita, prvenstveno njihovu sposobnost metabolisanja endogenih i egzogenih molekula, kao i sposobnost regeneracije, posledice bi se neizbežno odrazile i na ceo organizam, obzirom da je adekvatno funkcionisanje jetre od vitalnog značaja.

Većina dosadašnjih istraživanja ispitivala su efekte AA na jetru adultnog organizma, i to uglavnom na subcelularnom nivou, dok su nalazi na nivou tkiva zastupljeni u manjoj meri. Fiziološka reakcija jetre mladog organizma na intoksikaciju, kao i njena rezistentnost na potencijalna oštećenja izazvana AA može se razlikovati u odnosu na jetru adultnog organizma. Ipak, još uvek nije poznato da li i u kojoj meri AA može dovesti do oštećenja jetre mladog organizma.

Cilj ovog istraživanja bilo je ispitivanje potencijalnih mikrostrukturnih i biohemijskih promena u jetri juvenilnih mužjaka pacova nakon njihovog subhroničnog izlaganja AA. Hipoteza je testirana analizom histoloških karakteristika jetre i evaluacijom osnovnih biohemijskih parametara ovog organa, na način da bi:

- a) histološka analiza pružila uvid u opšti plan građe jetre, mikrostrukturne karakteristike hepatocita i sinusoida, sposobnost hepatocita za deponovanje energije i regeneracije, kao i karakterizaciju populacije Kupffer-ovih ćelija i mastocita, kao ćelija imunog sistema koje bitno doprinose reakcijama jetre na toksikante, a time i održavanju njene homeostaze;
- b) biohemijski parametri bi upotpunili sliku o prirodi reakcije jetre, njenog metaboličkog kapaciteta i moguća subcelularna mesta koja su izvor i/ili okidač pokretanja toksičnih efekata pri intoksikaciji AA;
- c) kombinovanjem mikrostrukturnog i biohemijskog pristupa analize pružio bi se uvid u stepen i karakter promena koje se mogu javiti na jetri mladog organizma usled izloženosti AA;
- d) steći uvid da li se i u kojoj meri potencijalni poremećaji u fiziologiji hepatocita, izazvani AA, mogu odraziti na viši nivo strukturne organizacije jetre.

Materijal i metode

III MATERIJAL I METODE

3.1 Eksperimentalne životinje

Istraživanje je obuhvatilo 30 prepubertalnih/juvenilnih mužjaka pacova *Rattus norvegicus*, soja Wistar, koji su na početku eksperimenta bili stari 23 postnatalna dana (PND). Odabir mužjaka za eksperiment je baziran na činjenici da kod njih odsustvuju ciklične promene u koncentraciji polnih hormona, koje su karakteristične za estrusni ciklus ženki. Životinje su tokom eksperimenta bile smeštene u gajilištu Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu. Pre početka eksperimenta, životinjama su izmerene telesne mase, a potom su raspoređene u 3 eksperimentalne grupe sa po 10 mužjaka u svakoj. Tokom eksperimenta, životinje su bile izložene konstantnim uslovima, na temperaturi od 22 ± 1 °C, kontrolisanom fotoperiodu (12 h svetlo, 12 h mrak), imale su slobodan pristup standardnoj peletiranoj hrani i vodi.

Eksperimentalna procedura je obavljena u skladu sa opšte prihvaćenim internacionalnim pravilima i regulativama vezanim za dobrobit eksperimentalnih životinja i uz Odobrenje Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja, Univerziteta u Novom Sadu (licenca broj: IV-2010-01). Eksperimentalni postupak je izveden i rukovođen prema „Uputstvu za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja“ originalno publikovanom od strane *National Research Council (NRC)* pod nazivom: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (copyright 1996)*, *National Academy of Sciences, Washington D. C.* i *National Institutes of Health (NIH)* pod nazivom: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 8023, revised 1996, 7th edition)*.

3.2 Eksperimentlani protokol

Postavka eksperimenta se zasnivala na subhroničnom tretmanu juvenilnih mužjaka pacova vodenim rastvorom akrilamida (AA) u dozi od 25, odnosno 50 mg AA po kg telesne mase (tm). Doze su pripremane rastvaranjem adekvatne količine kristalnog AA, čistoće >99.5% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), u destilovanoj vodi.

Tretman životinja je definisan sledećim eksperimentalnim protokolom:

- a) *I eksperimentalna grupa (AA25)* - pacovi tretirani dozom od 25 mg/kg tm AA, 5 puta nedeljno, tokom 3 nedelje;

- b) *II eksperimentalna grupa (AA50)* - pacovi tretirani dozom od 50 mg/kg tm AA, 5 puta nedeljno, tokom 3 nedelje;
- c) *III eksperimentalna grupa (K)* - kontrolna grupa, pacovima davana destilovana voda, 5 puta nedeljno, tokom 3 nedelje.

Životinje su rastvor AA primale *per os*, putem gavaže, u jutarnjem terminu između 8,30-9,00 h.

Dužina i dinamika eksperimentalnog protokola je kreirana kako bi se minimalizovala mogućnost akomodacije organizma na tretman. Životinje su 24 h nakon poslednjeg tretmana uvedene u etarsku anesteziju i dekapitovane. Od svake životinje su, nakon dekapitacije, prikupljeni krv i tkivo jetre za dalje analize.

3.3 Uzorkovanje biološkog materijala za histološke i serološke analize

Nakon dekapitacije, pacovima je uzeta krv radi dobijanja seruma. Krv životinja je prikupljena u kivete za centrifugiranje i ostavljena da koagulise. Kivete sa koagulisanim krvlju su centrifugirane 10 min. na 1.800 rpm na +4 °C kako bi se iznad koagulumu izdvojio supernatant, odnosno serum. Dobijeni serumi su pažljivo alikvotirani iz kiveta u staklene flašice i ostavljeni u zamrzivač na -20 °C do dalje analize.

Tkivo jetre, dimenzija 5 mm x 5 mm x 5 mm, namenjeno za histološku analizu je uzeto iz srednjeg jetrinog lobusa svake životinje, fiksirano u 10% neutralnom puferisanom formalinu tokom 24 h sata, a zatim obrađeno prema standardnom protokolu za parafinsko kalupljenje. Nakon fiksacije uzoraka izvršena je njihova dehidracija kroz seriju alkohola rastućih koncentracija od 70% do 100%, prosvetljavanje u ksilolu, a potom prožimanje u parafinu i kalupljenje u parafinu. Parafinski kalupi jetre su isečeni na histološke preseke debljine 5 µm, a zatim bojeni histohemijskim i imunohistohemijskim metodama.

3.4 Histohemijske i imunohistohemijske metode

Parafinski preseki jetre su bojeni histohemijskim i imunohistohemijskim histološkim metodama radi karakterizacije parenhima jetre, odnosno hepatocita i pojedinih neparenhimskih ćelija: Kupffer-ovih ćelija, kao rezidentnih makrofaga jetre, i mastocita, kao mobilnih ćelija.

3.4.1 Histoheimijske metode

- a) Radi pregleda opšte strukture i mikroanatomije jetre parafinski preseki su bojeni hematoksilin-eozin (H&E) metodom bojenja (Merck, Darmstadt, Nemačka) (Švob, 1974), koja predstavlja rutinsku histološku metodu bojenja. Ovom metodom se dobija diferencijalni prikaz citoplazme i nukleusa ćelija, pri čemu je hematoksilin bazna (katjonska) boja i boji nukleus ljubičasto, dok je eozin kisela (anjonska) boja i boji citoplazmu crveno (Švob, 1974).

Metoda rutinskog bojenja tkivnih preseka H&E metodom (Švob, 1974):

1. Deparafinizacija preseka ksilolom
2. Rehidracija preseka kroz seriju opadajućih koncentracija alkohola
3. Ispiranje u tekućoj vodi
4. Bojenje hematoksilinom
5. Ispiranje u tekućoj vodi
6. Diferencijacija u HCl-alkoholu
7. Kratko ispiranje u tekućoj vodi
8. Uranjanje preseka u amonijačnu vodu
9. Ispiranje u tekućoj vodi
10. Bojenje eozinom
11. Dehidracija preseka u 95% alkoholu, a potom u 100% alkoholu
12. Ispiranje preseka u ksilolu
13. Montiranje preseka u DPX-u

- b) Prisustvo ugljenih hidrata u hepatocitima, posebno glikogena, je vizuelizovano metodom Periodic acid-Schiff-a (PAS) (Merck, Darmstadt, Nemačka) (Švob, 1974). Reakcija se zasniva na oksidaciji određenih elemenata tkiva do aldehida usled delovanja perjordne kiseline (H_5IO_6) (Carson i Hladik, 2009). Ovom metodom je moguće prikazati sve polisaharide i mucine koji imaju deoksiheksoze ili heksoze sa glikolnim grupama. Pored toga, metoda boji i neutralne mukopolisaharide, dok se kiseli mukopolisahaidi ne boje (Švob, 1974; Carson i Hladik, 2009). PAS-pozitivne granulacije su crveno-ružičaste boje. Intenzitet boje ovih granulacija odgovara njihovoj količini u citoplazmi, što se može upotrebiti za njihovu relativnu kvantifikaciju. Primenom PAS metode na histološkim presecima jetre može se analizirati količina deponovanog glikogena između pojedinačnih lobulusa i u okviru

njih samih. Takođe, ovom metodom je moguće detaljnije okarakterisati distribuciju glikogena u samim hepatocitima.

PAS metoda bojenja za prikaz komponenti tkiva sa glikolnom ili aminohidroksilnom grupom (Švob, 1974):

1. Deparafinizacija preseka ksilolom
2. Rehidratacija preseka kroz seriju opadajućih koncentracija alkohola
3. Ispiranje u destilovanoj vodi
4. Potapanje u 0,5% rastvor perjodne kiseline
5. Ispiranje u destilovanoj vodi
6. Bojenje Schiff-ovim reagensom
7. Potapanje u sulfitnu vodu
8. Ispiranje u tekućoj vodi
9. Bojenje Mayer-ovim hematoksilinom
10. Ispiranje u tekućoj vodi
11. Dehidratacija preseka u 95% alkoholu, a potom u 100% alkoholu
12. Ispiranje preseka u ksilolu
13. Montiranje preseka u DPX-u

- c) Radi prikaza mastocita na presecima jetre korišćena je metoda bojenja toluidin plavim (engl. *toluidine blue*; TB). U cilju vizuelizacije mastocita u uzorcima jetre fiksiranim u formalinu, klasični protokol bojenja preseka 0,5% rastvorom boje TB (Merck, Darmstadt, Nemačka) (Švob, 1974) je modifikovan korakom diferencijacije uranil-nitratom (Clark i sar., 1973). Naime, pokazano je da su mastociti u jetri, kao i mastociti mukoznih membrana, senzitivni na formalin, odnosno da se nakon fiksacije tkiva u formalinu, ove ćelije ne boje TB bojom (Chan i sar., 2001). Međutim, ovaj efekat se može ukloniti dodatnim korakom diferencijacije rastvorom uranil-nitrata (Clark i sar., 1973).

Metoda bojenja TB bazira se na metahromatskom bojenju granula prisutnih u citoplazmi mastocita (Švob, 1974). Granulacije mastocita sadrže heparin i histamin, a pri kontaktu sa TB bojom dolazi do efekta metahromazije. Ova reakcija je primarno posledica histaminskog sadržaja koji se nalazi u citoplazmatskim granulacijama (Carson, 1990). Mastociti će, kao rezultat bojenja TB bojom, u svojoj citoplazmi imati sitno zrnaste, tamno ljubičaste granulacije dok će ostale komponente tkiva biti plavo obojene (ortohromatsko bojenje), kao i sama boja

rastvora sa TB (Švob, 1974; Carson i Hladik, 2009). Ovakva promena u boji naziva se metahromazija i karakteristična je pri bojenju tkiva katjonskim ili baznim bojama, gde dolazi do interakcije sa anjonskim reziduama visoko sulfatisanih lanaca glikozaminoglikana koji su vezani za serglicin, proteoglikan i glavni konstituent granulacija u mastocitima (da Silva i sar., 2014). Metahromazija delimično zavisi od pH, koncentracije boje i temperature (Carson i Hladik, 2009). Ovom metodom je, pored vizualizacije, moguća evaluacija brojnosti i karakterizacija funkcionalnog statusa ovih ćelija. Naime, TB metoda bojenja omogućava da se na osnovu količine obojenih granulacija i sveopšte morfologije mastocita izvrši distinkcija između intaktnih i degranulisanih ćelija.

Modifikovana TB metoda bojenja za mastocite u parafinskim presecima jetre (Clark i sar., 1973):

1. Deparafinizacija preseka ksilolom
2. Rehidracija preseka kroz seriju opadajućih koncentracija alkohola
3. Ispiranje u tekućoj vodi
4. Bojenje 0,5% rastvorom TB
5. Ispiranje u tekućoj vodi
6. Diferencijacija 0,2% rastvorom uranil-nitrata
7. Dehidracija preseka u 95% alkoholu, a potom u 100% alkoholu
8. Ispiranje preseka u ksilolu
9. Montiranje preseka u DPX-u

3.4.2 Imunohistohemijske metode

- a) Proliferativne osobine jetre su analizirane imunohistohemijskom metodom bojenja parafinskih preseka na Ki-67 protein. Za imunobojenje je korišćeno zečije poliklonalno antitelo *Ki-67 Ab-4* (ready-to-use) (Thermo Scientific, Fremont, SAD), nakon čega su Ki-67 pozitivni hepatociti vizuelizovani pomoću *UltraVision LP Detection System*-a (Thermo Scientific, Fremont, SAD). Detekcija Ki-67 proteina na parafinskim presecima je zahtevala tzv. *antigen retrieval*, odnosno tretman kuvanja u citratnom puferu kako bi se demaskirala antigena mesta. Nakon deparafinizacije i rehidracije, preseci su prebačeni u citratni pufer (10 mM/L, pH 6,0) i kuvani 20 min. u mikrotalasnoj peći. Dalja procedura imunobojenja je izvedena prema protokolu proizvođača (Thermo Scientific, Fremont, SAD). Pločice sa presecima su isprane u TBS puferu (*engl.*

Tris-buffered saline), pH 7,2-7,4, a zatim inkubirane sa *Hydrogen Peroxyde Block*-om (10 min.) kako bi se blokirale endogene peroksidaze. Potom je usledilo ispiranje preseka u TBS-u, inkubacija sa *Ultra V Block*-om (5 min.) i još jedno ispiranje TBS-om. Inkubacija preseka jetre sa primarnim antitelom je trajala 30 min. Nakon ispiranja, preseci su inkubirani sa *Primary Antibody Enhancer*-om (10 min.) i ispirani u TBS-u. Sekundarno antitelo je aplikovano na preseke u vidu *HRP Polymer*-a (15 min.). Posle ispiranja u TBS-u, na preseke je stavljen hromogen u formi *DAB Plus Chromogen* i *DAB Plus Substrate* (5 min.), potom su preseci isprani u destilovanoj vodi, obojeni *Mayer*-ovim hematoksilinom u cilju kontrastiranja, dehidratirani i montirani u DPX-u.

- b) Apoptotičke osobine hepatocita su ispitane pomoću zečijeg poliklonalnog antitela *Caspase 3 (CCP32) Ab-4* (ready-to-use) (Thermo Scientific, Fremont, SAD). Imunopozitivni hepatociti su vizuelizovani pomoću *UltraVision LP Detection System*-a (Thermo Scientific, Fremont, SAD). Detakcija Caspase 3 enzima na parafinskim presecima je zahtevala tzv. *antigen retrieval*, odnosno tretman kuvanja u citratnom puferu kako bi se demaskirala antigena mesta. Nakon deparafinizacije i rehidratacije, preseci su prebačeni u citratni pufer (10 mM/L, pH 6,0) i kuvani 20 min. u mikrotalasnoj peći. Dalja procedura imunobojenja je izvedena prema protokolu proizvođača (Thermo Scientific, Fremont, SAD). Pločice sa presecima su isprane u TBS puferu, pH 7,2-7,4, a zatim inkubirane sa *Hydrogen Peroxyde Block*-om (10 min.) kako bi se blokirale endogene peroksidaze. Potom je usledilo ispiranje preseka u TBS-u, inkubacija sa *Ultra V Block*-om (5 min.) i još jedno ispiranje TBS-om. Inkubacija preseka jetre sa primarnim antitelom je trajala 30 min. Nakon ispiranja, preseci su inkubirani sa *Primary Antibody Enhancer*-om (10 min.) i ispirani u TBS-u. Sekundarno antitelo je aplikovano na preseke u vidu *HRP Polymer*-a (15 min.). Posle ispiranja u TBS-u, na preseke je stavljen hromogen u formi *DAB Plus Chromogen* i *DAB Plus Substrate* (5 min.), potom su preseci isprani u destilovanoj vodi, obojeni *Mayer*-ovim hematoksilinom u cilju kontrastiranja, dehidratirani i montirani u DPX-u.
- c) Detekcija makrofaga u jetri, prvenstveno Kupffer-ovih ćelija, je izvršena imunohistohemijskim bojenjem preseka na marker CD68. Za imunobojenje je

korišćeno mišje monoklonalno antitelo *CD68 (Macrophage Marker) Ab-3 (Clone KPI)* (ready-to-use) (Thermo Scientific, Fremont, SAD), a vizuelizacija je izvršena pomoću *UltraVision LP Detection System*-a (Thermo Scientific, Fremont, SAD). Detekcija CD68 markera je zahtevala pripremu preseka jetre enzimskom digestijom pomoću *Proteaze XXV* (Thermo Scientific, Fremont, SAD) kako bi se demaskirala antigena mesta. Nakon deparafinizacije i rehidratacije, preseci su tretirani *Proteazom XXV* (5 min., 37 °C). Dalja procedura imunobojenja je izvedena prema protokolu proizvođača (Thermo Scientific, Fremont, SAD). Pločice sa presecima su isprane u TBS puferu, pH 7,2-7,4; a zatim inkubirane u *Hydrogen Peroxyde Block*-u (10 min.) kako bi se blokirale endogene peroksidaze. Usledilo je ispiranje preseka u TBS-u, inkubacija sa *Ultra V Block*-om (5 min.) i još jedno ispiranje TBS-om. Inkubacija preseka jetre sa primarnim antitelom je trajala 30 min. Nakon ispiranja, usledila je inkubacija preseka sa *Primary Antibody Enhancer*-om (10 min.) i ispiranje u TBS-u. Sekundarno antitelo je aplikovano na preseke u vidu *HRP Polymer*-a (15 min.). Posle ispiranja u TBS-u, na preseke je stavljen hromogen u formi *DAB Plus Chromogen* i *DAB Plus Substrate* (5 min.). Preseci su zatim isprani u destilovanoj vodi, obojeni *Mayer*-ovim hematoksilinom radi kontrastiranja, dehidratirani i montirani u DPX-u.

3.5 Histološka i stereološka analiza

Kvalitativna (deskriptivna) histološka analiza preseka jetre rađena je pomoću Reichert-ovog svetlosnog mikroskopa na uvećanjima 100x i 400x. Za *kvantitativnu (stereološku) analizu* preseka jetre korišćena je višenamenska stereološka mrežica M42 (Weibel, 1979) postavljena u okular Reichert-ovog svetlosnog mikroskopa, pri uvećanju od 400x. Stereološki parametri, volumenska i numerička gustina ispitivane faze, računati su prema sledećim formulama:

- Za volumensku gustinu; V_v :

$$V_v = \frac{P_f}{P_t} \left[\frac{\text{mm}^3}{\text{mm}^3} = \text{mm}^0 \right]$$

P_f – broj tačaka testnog sistema koje padaju na ispitivanu fazu

P_t – ukupan broj tačaka testnog sistema x broj vidnih polja

- Za numeričku gustinu; N_v :

$$N_v = \frac{\kappa}{\beta} \times \sqrt[2]{\frac{P_t \times \left(\frac{N}{A_t}\right)^3}{P_f}} \quad [\text{mm}^{-3}]$$

κ - distribucijski korekcionni koeficijent

β - oblikovni korekcionni koeficijent

P_t – ukupan broj tačaka testnog sistema x broj vidnih polja

P_f – broj tačaka testnog sistema koje padaju na ispitivanu fazu

N – broj ispitivane faze u pregledanim vidnim poljima

A_t – površina testnog polja

3.5.1 Opšta mikrostruktura jetre

Osnovne karakteristike jetrinih lobulusa, organizacija Remak-ovih gredica, portalnih trijada, opšte morfološke karakteristike parenhimskih ćelija (hepatocita) i strome analizirani su na H&E obojenim presecima na uvećanju 100x. Lobularna mikroarhitektura jetre, volumen hepatocita, njihove citoplazme i jedara, kao i volumen sinusoidnih prostora lobulusa su analizirani na presecima jetre obojenim H&E metodom na uvećanju 400x. Analiza je obuhvatala 20 nasumično odabranih vidnih polja na svakom 4. serijskim preseku jetre i na ukupno 4 preseka za svaku životinju.

Evaluirani stereološki parametri:

- volumenska gustina; V_v [mm^3/mm^3]
 - a) V_{vh} - hepatocita
 - b) V_{vh_n} - nukleusa hepatocita
 - a) V_{vh_c} - citoplazme hepatocita
 - b) V_{vs} - sinusoidnih prostora

3.5.2 Glikogen

Količina i način distribucije glikogena u hepatocitima analizirani su na PAS obojenim presecima jetre pri uvećanjima 100x i 400x. Analiza je rađena na svakom 4. serijskim preseku jetre i na ukupno 4 preseka za svaku životinju. Na uvećanju 100x pregledana je raspodela glikogena duž celog preseka, između perifernih i središnjih lobulusa, kao i u okviru samih lobulusa, od pericentralnog do periportalnog regiona. Pri uvećanju 400x analizirane su distribucija i karakteristike PAS-pozitivnih glikogenskih granulacija u pericentralnim, središnjim i periportalnim hepatocitima u okviru lobulusa, ali i u pojedinačnim (subkapsularnim) hepatocitima neposredno ispod kapsule organa.

Kvantifikacija količine glikogena u jetri urađena je indirektno na osnovu intenziteta crveno-ružičaste boje PAS-pozitivnih granulacija i u zavisnosti od tendencije njihovog nakupljanja u lobulusu od pericentralnog do periportalnog regiona. Radi evaluacije intenziteta crveno-ružičaste obojenosti citoplazme hepatocita, definisana je skala sa stepenima gradacije koji se odnose na jačinu obojenosti: odsustvo obojenosti (-); slaba obojenost (+); srednji intenzitet obojenosti (++); i jaka obojenost (+++). Skala je omogućila relativnu kvantifikaciju količine glikogena i izražavanje razlika u njegovoj količini između eksperimentalnih grupa.

3.5.3 Mastociti

TB metoda bojenja je omogućila vizuelizaciju mastocita u jetri, njihovu morfološku karakterizaciju i definisanje njihove aktivnosti. Histološkom analizom ćelijskog integriteta, tj. stepena degranulisanosti mastocita i količine metahromatki obojenih granulacija, definisane su dve subpopulacije mastocita (intaktni i degranulisani), koje odgovaraju funkcionalnom statusu ovih ćelija. Stereološka analiza mastocita je ispitana na 20 nasumično odabranih Kiernan-ovih prostora na svakom 4. serijskim preseku jetre i na ukupno 4 preseka za svaku životinju.

Evaluirani stereološki parametri za mastocite:

- volumenska gustina; V_v [mm^3/mm^3]
 - c) V_{vm_t} - ukupnih mastocita
 - d) V_{vm_i} - intaktnih mastocita
 - e) V_{vm_d} - degranulisanih mastocita
- numerička gustina; N_v [mm^{-3}]
 - a) N_{vm_t} - ukupnih mastocita

- b) N_{vm_i} - intaktnih mastocita
- c) N_{vm_d} - degranulisanih mastocita

3.5.4 Proliferativne karakteristike jetre

Ki-67 predstavlja nuklearni protein koji se ekspresuje u proliferišućim ćelijama, i to u G1, S, M i G2 fazama ćelijskog ciklusa, a njegova ekspresija odsustvuje u G0 fazi. Imunopozitivnost ćelija na ovaj protein se očekuje u nukleusu (Thermo Scientific, Fremont, SAD). Analiza imunopozitivnosti hepatocita na ovaj marker je obuhvatala 20 nasumično odabranih vidnih polja za svaku životinju. Svaki Ki-67 pozitivan nukleus hepatocita je smatran pozitivnim, bez obzira na intenzitet obojenosti. Analizom su obuhvaćeni imunopozitivni hepatociti sa jednim i dva jedra.

Evaluirani stereološki parametri za Ki-67 pozitivne hepatocite:

- volumenska gustina; V_v [mm^3/mm^3]
 - f) $V_{v_{ki-67t}}$ - ukupnih Ki-67 pozitivnih hepatocita (mononuklearnih i binuklearnih)
 - g) $V_{v_{ki-67bn}}$ - binuklearnih Ki-67 pozitivnih hepatocita
- numerička gustina; N_{vh} [mm^{-3}]
 - d) $N_{v_{ki-67t}}$ - ukupnih Ki-67 pozitivnih hepatocita (mononuklearnih i binuklearnih)
 - e) $N_{v_{ki-67bn}}$ - binuklearnih Ki-67 pozitivnih hepatocita

3.5.5 Apoptotičke osobine hepatocita

Caspase 3 predstavlja enzim iz grupe kaspaza za koji je pokazano da svojom aktivacijom učestvuje u indukciji apoptoze (Thermo Scientific, Fremont, SAD). Pripada porodici kaspaza (engl. *cysteine-aspartic acid protease* tj. *caspase*), koje imaju centralnu ulogu u izvršenju ćelijske apoptoze. Kaspaze se u ćeliji nalaze u formi inaktivnih proenzima i podležu proteolitičkim modifikacijama na konzerviranim reziduama asparaginske kiseline čime se formiraju dve subjedinice (velika i mala), koje će potom dimerizovati i tako dati aktivnu formu enzima. Ovaj protein iseca i time aktivira kaspazu 6 i 7, a sam protein modifikuju i aktiviraju kaspaze 8, 9 i 10 (Alnemri i sar., 1996). Imunopozitivnost ćelija na ovaj protein se očekuje dominantno u citoplazmi, a u manjoj meri i u nukleusu ćelija. Analiza imunopozitivnosti hepatocita na ovaj marker je obuhvatala 20 nasumično odabranih vidnih polja za svaku životinju. Svaki Caspase 3 pozitivan hepatocit je smatran pozitivnim, bez obzira na intenzitet obojenosti.

Evaluirani stereološki parametri za Caspase 3 pozitivne hepatocite:

- volumenska gustina Caspase 3 pozitivnih hepatocita; $V_{V_{c3}}$ [mm^3/mm^3]
- numerička gustina Caspase 3 pozitivnih hepatocita; $N_{V_{c3}}$ [mm^{-3}]

3.5.6 Analiza Kupffer-ovih ćelija jetre

Marker CD68 predstavlja transmembranski glikoprotein koji se ekspresuje kod monocita i tkivnih makrofaga. Pripada familiji tzv. „scavenger“ receptora sa LAMP domenom (engl. *lysosome associated membrane protein-like domain*) i predominantno je intracelularni protein (AbD Serotec, Kidlington, Velika Britanija). Karakteriše se visokim stepenom ekspresije na lizozomima tkivnih makrofaga ili monocita, Kupffer-ovih ćelija, mikroglije i osteoklasta. U manjoj meri je prisutan i kod dendritskih ćelija i granulocita periferne krvi (AbD Serotec, Kidlington, Velika Britanija). CD68 je važan prilikom identifikacije makrofaga u tkivima i predstavlja jedan od karakterističnih markera Kupffer-ovih ćelija jetre. Obzirom da je CD68 glikoprotein dominantno intracelularni, imunopozitivnost ćelija na ovaj marker se očekuje u citoplazmi, odnosno na membranama makrofaga, monocita, endozomalnih vakuola i lizozoma (Thermo Scientific, Fremont, SAD). Pokazano je da CD68 Ab-3 reaguje sa mijeloidnim prekursorima i granulocitima u perifernoj krvi (Thermo Scientific, Fremont, SAD). Histološka analiza imunopozitivnosti Kupffer-ovih ćelija na marker CD68 obuhvatala je analizu preseka jetre svake životinje pri uvećanjima 100x i 400x.

3.6 Serološke analize

Funkcionalni status juvenilne jetre pacova analiziran je posredstvom serumske aktivnosti enzima: aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP) i koncentracije ukupnih serumskih proteina. Analiza je obuhvatila i određivanje koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) čiji se nivo u krvi povećava u slučaju povreda (oštećenja tkiva), inflamacije i/ili infekcije organizma.

Analiza je urađena od strane Instituta za primenu nuklearne energije, Beograd u skladu sa standardom ISO 9001.

3.7 Telesne mase životinja

Tokom trajanja eksperimenta, kontinuirano su praćene fluktuacije u telesnim masama životinja. Telesne mase pacova su merene svakodnevno, neposredno pre tretmana.

3.8 Statistička analiza

Numeričke vrednosti stereoloških parametara su statistički obrađene pomoću neparametrijskog Kruskal-Wallis ANOVA testa. Komparirane su razlike između eksperimentalnih grupa za svaki analizirani parametar, pri čemu su vrednosti $p < 0,05$ smatrane statistički signifikantnim.

Rezultati serološke analize su statistički obrađeni pomoću one-way ANOVA testa, praćenim Bonferroni post hoc testom. Komparirane su razlike između eksperimentalnih grupa za svaki analizirani parametar, pri čemu su vrednosti $p < 0,05$ smatrane statistički signifikantnim.

Numerički podaci o telesnim masama su statistički obrađeni primenom neparametrijskog Kruskal-Wallis testa. Komparirane su razlike između eksperimentalnih grupa sa postavljenim nivoom značajnosti od $p < 0,05$.

Rezultati

IV REZULTATI

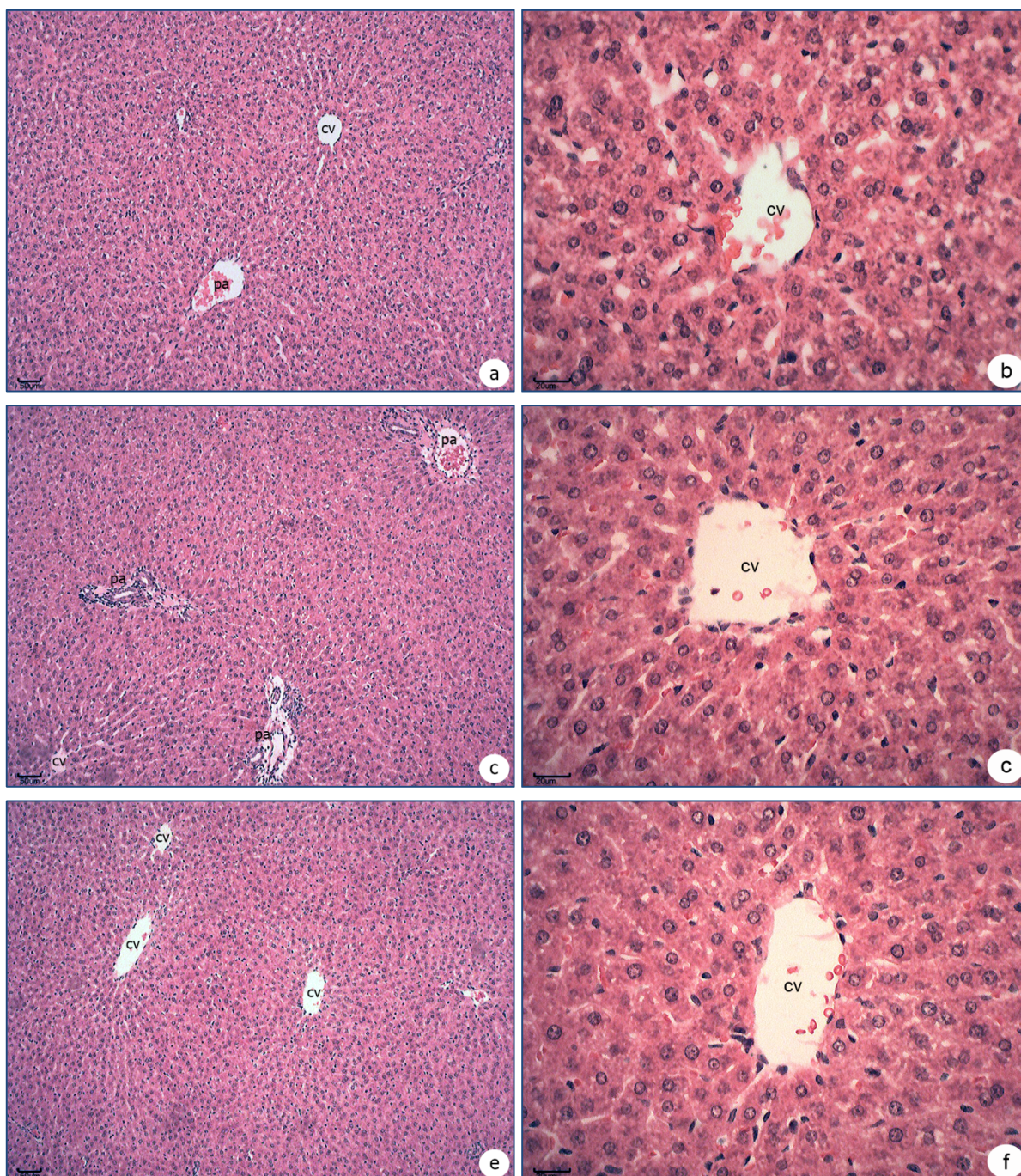
4.1 Opšta mikroanatomska građa

Opšte mikrostrukturne karakteristike jetre juvenilnih pacova su ispitane na preparatima bojenim H&E metodom. Mikroskopskom analizom nije uočeno prisustvo značajnijih promena u histološkoj građi jetre kod životinja tretiranih dozom od 25 odnosno, 50 mg/kg tm AA u odnosu na kontrolu. Uzorci jetre svih eksperimentalnih grupa karakterisali su se tipičnom lobularnom građom i organizacijom (Sl. 4.1).

Lobulusi jetre su imali klasičan poligonalan oblik, sa centralnom venom u sredini, radijalno raspoređenim Remak-ovim gređicama između kojih su se nalazili sinusoidni prostori. Remak-ove gređice su činili hepatociti klasičnog poligonalnog oblika. Dominirala je populacija hepatocita sa po jednim jedrom, dok su hepatociti sa po dva jedra bili zastupljeni u manjoj meri. Većina ćelija je imala jasno definisano jedro sa jedarcem, dok je manji broj hepatocita bio u fazi deobe. Granice između lobulusa su bile relativno slabo izražene, što je osobina koja je inače svojstvena za jetru pacova (Sl. 4.1).

Sinusoidni prostori lobulusa su bili jasno definisani. Veći stepen dilatiranosti sinusoida zapažen je u centralnom delu lobulusa nasuprot njihovoj konstrikciji u perifernom (periportalnom) regionu. Na osnovu morfoloških svojstava jedara prisutnih u sinusoidnim prostorima mogle su se jasno uočiti Kupffer-ove i endotelne ćelije (Sl. 4.1).

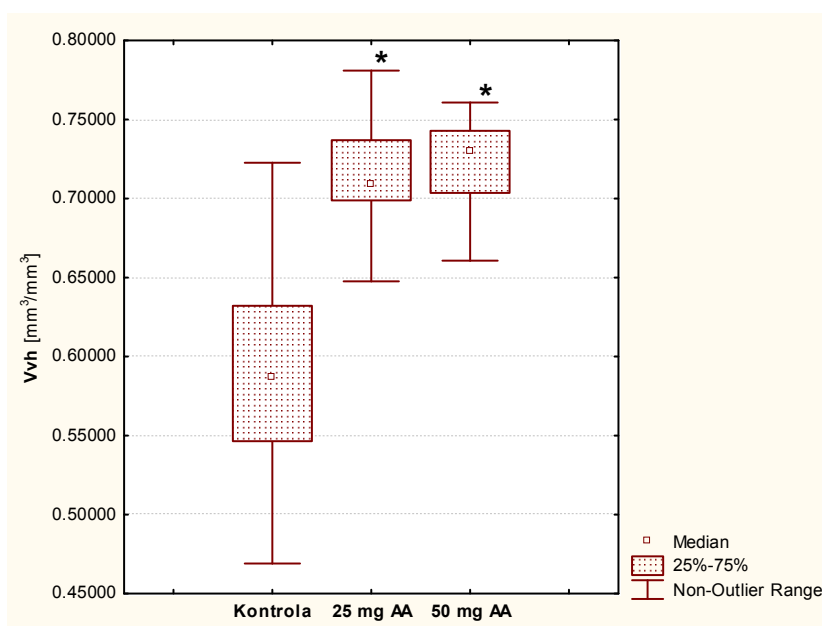
Mesta susticanja tri ili više lobulusa ograničavala su Kiernan-ov prostor u kome su jasno bili uočljivi: žučni kanal (lat. *ductus biliferus*), interlobularna arteria (lat. *arteria interlobularis*) i vena (lat. *vena interlobularis*). Portalne trijade su se kod sve tri eksperimentalne grupe karakterisale normalnom morfologijom, sa relativno malom količinom vezivnog tkiva (Sl. 4.1).



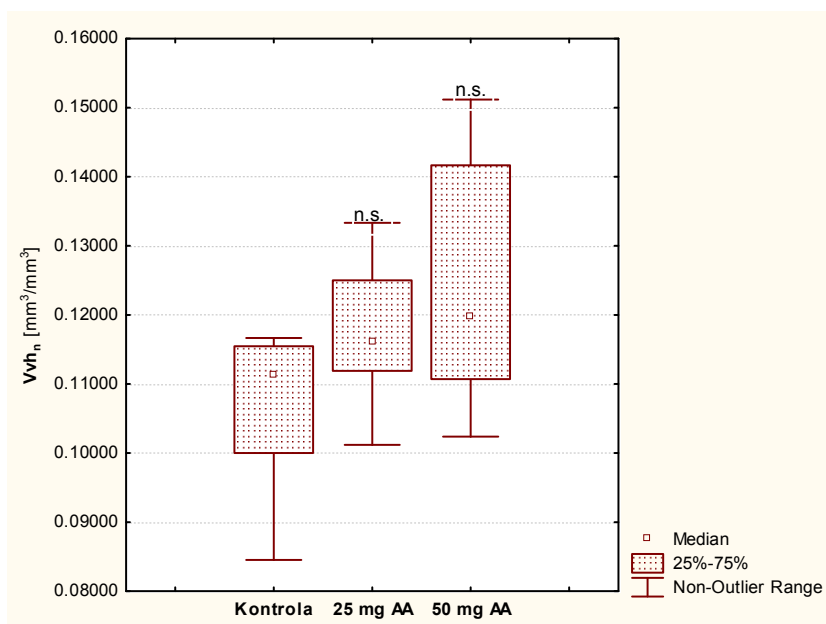
Slika 4.1. Jetra juvenilnih mužjaka pacova nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. Uzorci jetre tretiranih životinja ne ukazuju na prisustvo promena u građi i organizaciji lobulusa u odnosu na kontrolne uzorke. Kontrola (a, b); AA25 (c, d); AA50 (e, f). CV-centralna vena, PA-portalni region. H&E metoda bojenja. Bar: 50 μ m (a, c, e); 20 μ m (b, d, f).

Nasuprot deskriptivnoj histološkoj analizi, kvantitativna stereološka analiza hepatocita i sinusoidnih prostora, na uvećanju 400x, ukazala je na određen stepen mikrostrukturnih promena u lobulusu jetre kod oba AA tretmana. Dobijeni numerički podaci sugerišu na dozno-zavisni

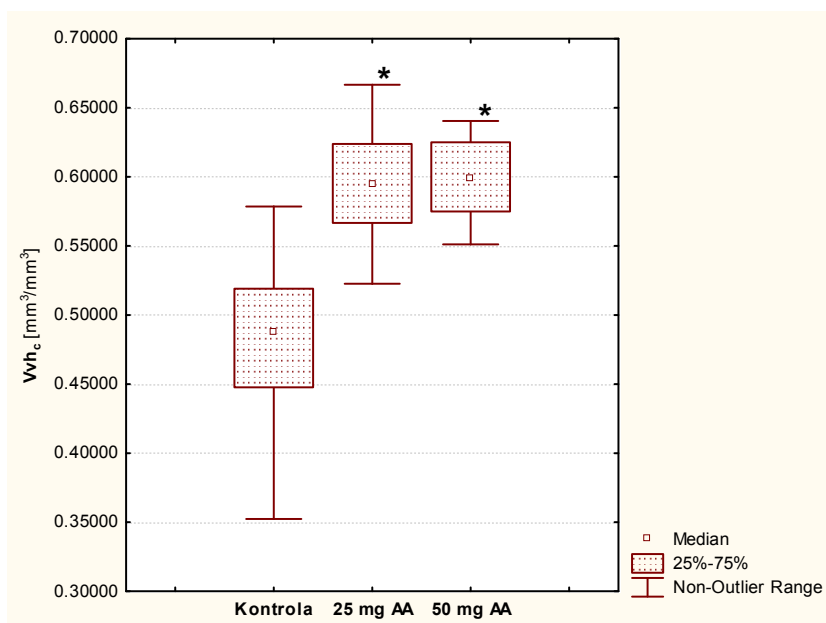
karakter ovih promena (Tab. 4.1). Oba AA tretmana su izazvala povećanje vrednosti svih ispitanih parametara vezanih za hepatocite (V_{vh} , V_{vh_n} , V_{vh_c}) u odnosu na kontrolu. U obe grupe tretiranih pacova su volumenska gustina hepatocita (V_{vh}) i volumenska gustina njihove citoplazme (V_{vh_c}) bile značajno veće u odnosu na kontrolu (obe pri $p < 0,001$) (Graf. 4.1; Graf. 4.3) (Tab. 4.1). Zabeleženo povećanje volumena jedara hepatocita (V_{vh_n}) kod tretiranih grupa, u odnosu na kontrolu, nije dostiglo nivo statističke značajnosti (Graf. 4.2) (Tab. 4.1). Nasuprot tome, volumenska gustina sinusoidnih prostora lobulusa (V_{vs}) je značajno bila smanjena kod oba AA tretmana u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$) (Graf. 4.4) (Tab. 4.1).



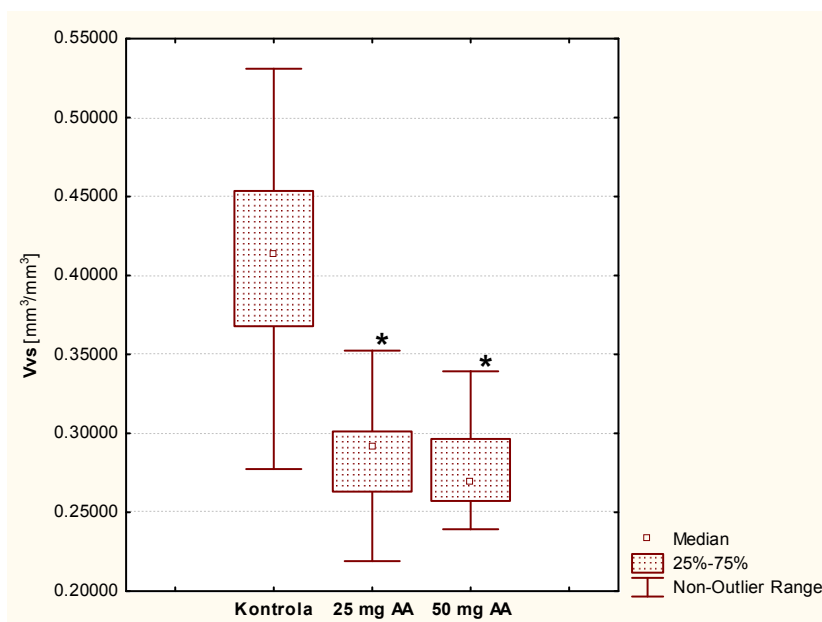
Grafik 4.1. Volumenska gustina hepatocita (V_{vh}) juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$).



Grafik 4.2. Volumenska gustina nukleusa hepatocita (Vvh_n) juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. n.s. - bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$).



Grafik 4.3. Volumenska gustina citoplazme hepatocita (Vvh_c) juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$).



Grafik 4.4. Volumenska gustina sinusoidnih prostora (Vvs) juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$).

Tabela 4.1. Vrednosti evaluiranih stereoloških parametara na presecima jetre kontrolnih i pacova tretiranih AA prikazani su kao vrednosti mediane sa gornjim i donjim kvartilima (u zagradi). Vv predstavlja volumensku gustinu: hepatocita (Vvh), nukleusa hepatocita (Vvh_n), citoplazme hepatocita (Vvh_c) i sinusoidnih prostora u lobulusu jetre (Vvs). AA predstavlja akrilamidni tretman.

Stereološki parametar	Kontrola	AA 25 mg/kg tm	AA 50 mg/kg tm
Vvh [mm ³ /mm ³]	0,586905 ^a (0,546429) (0,632143)	0,708929 ^b (0,698810) (0,736905)	0,730357 ^b (0,703571) (0,742857)
Vvh _n [mm ³ /mm ³]	0,111310 ^a (0,100000) (0,115476)	0,117619 ^a (0,111905) (0,125000)	0,119643 ^a (0,110714) (0,141667)
Vvh _c [mm ³ /mm ³]	0,486905 ^a (0,447619) (0,519048)	0,594643 ^b (0,566667) (0,623810)	0,598810 ^b (0,575000) (0,625000)
Vvs [mm ³ /mm ³]	0,413095 ^a (0,367857) (0,453571)	0,291071 ^b (0,263095) (0,301190)	0,269643 ^b (0,257143) (0,296429)

Sve vrednosti mediane označene istim slovom predstavljaju homogene grupe (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

4.2 Sadržaj glikogena u hepatocitima

Intenzitet crveno-ružičaste boje PAS-pozitivnih granulacija u citoplazmi hepatocita, odgovara količini deponovanog glikogena. Mikroskopska analiza PAS obojenih preseka jetre na uvećanju 100x je pokazala da je kod sve tri eksperimentalne grupe životinja bio prisutan klasičan obrazac deponovanja glikogena u okviru lobulusa, koji podrazumeva da se najviše deponovanog glikogena nalazi u hepatocitima u centralnom delu lobulusa, a da potom taj sadržaj postepeno opada od centra ka periferiji lobulusa (Tab. 4.2). Prema tome, citoplazma pericentralnih hepatocita je bila najbogatija glikogenskim agregatima, dok je njihova najmanja količina bila prisutna u periportalnim hepatocitima, gde su se često mogli uočiti i hepatociti bez deponovanog glikogena (Sl. 4.2).

Analiza na uvećanju 100x je takođe pokazala da je kod pacova tretiranih dozom od 25 mg/kg tm AA došlo do redukcije depoa glikogena u odnosu na njegovu količinu kod kontrolnih životinja (Sl. 4.2) (Tab. 4.2). Ovo smanjenje je bilo vizuelizovano smanjenim intenzitetom crveno-ružičaste boje u odnosu na kontrolu (Tab. 4.2). Nasuprot tome, kod pacova tretiranih dozom od 50 mg/kg tm AA uočeno je prominentno uvećanje količine deponovanog glikogena pri poređenju sa kontrolom. Ovaj efekat se manifestovao veoma izraženom crveno-ružičastom obojenošću citoplazme hepatocita u odnosu i na kontrolu i grupu tretiranu nižom dozom AA (Sl. 4.2) (Tab. 4.2).

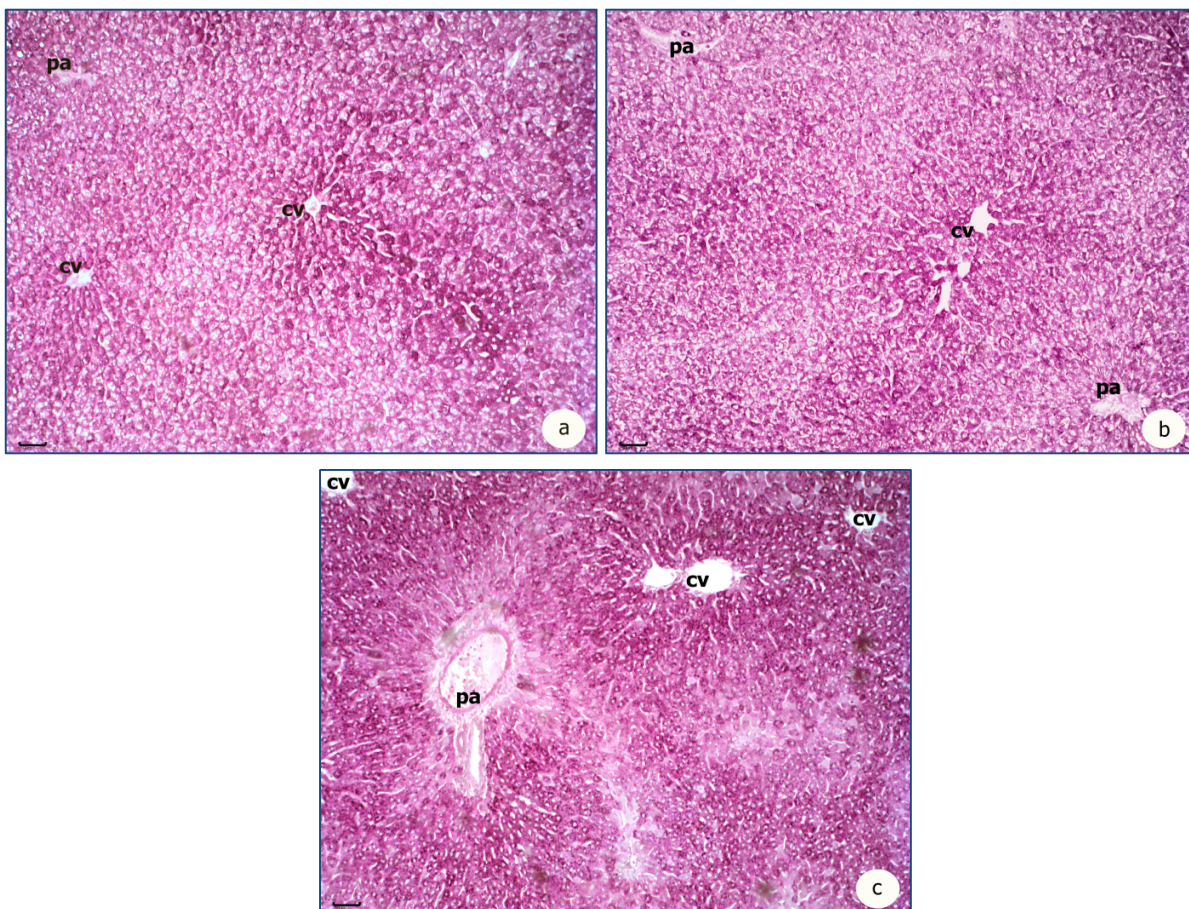
Analizom preseka na uvećanju 400x, uočeno je da su se uzorci jetre kontrolnih životinja karakterisali prisustvom sitno-zrnastih granulacija glikogena koje su bile dispergovane po celoj citoplazmi, sa većom količinom glikogenskog depoa u pericentralnim hepatocitima u odnosu na periportalne (Tab. 4.2). Kod grupe tretirane dozom od 25 mg/kg tm AA uočeno je sveukupno smanjenje glikogenskih depozita u odnosu na kontrolu. Većina hepatocita je bila bledo obojena, a manji broj njih je u citoplazmi imao prominentno obojene sitne granulacije glikogena, najčešće lokalizovane u blizini nukleusa ili ćelijske membrane (Sl. 4.3). Uočeni su i hepatociti bez deponovanog glikogena, čija je citoplazma odavala utisak „vakuoliziranosti“. Doza od 50 mg/kg tm AA je kod tretiranih pacova izazvala nagomilavanje glikogena u hepatocitima juvenilne jetre, pa su na presecima dominantno bili zastupljeni hepatociti kompletno ispunjeni glikogenskim agregatima u vidu jedne ili par kompaktnih, intenzivno obojenih granula (Sl. 4.3). Pojedini hepatociti u centralnoj i središnjoj zoni lobulusa su, pored velike količine deponovanog

glikogena, u citoplazmi imali bezbojne formacije slične vakuolama. Hepatociti sa veoma malom količinom deponovanog glikogena su bili prisutni u periportalnom regionu lobulusa (Sl. 4.3).

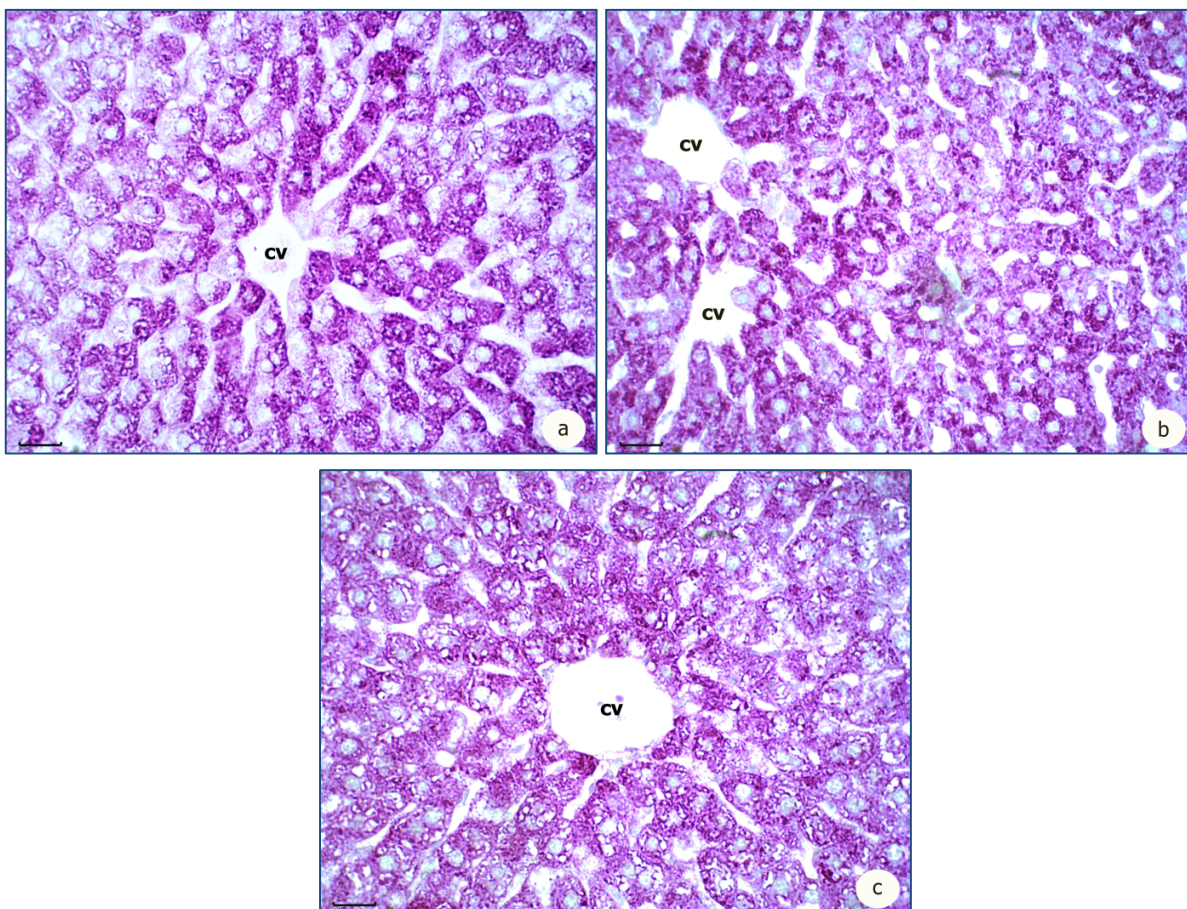
Tabela 4.2. Sadržaj glikogena u jetri kontrolnih i pacova tretiranih AA. Intenzitet obojenosti PAS-pozitivnih granulacija odgovara količini deponovanog glikogena. Razlike između eksperimentalnih grupa su izražene u funkciji mesta njihovog nagomilavanja u lobulusu i intenziteta njihove obojenosti. AA označava akrilamidni tretman.

Lobulus	Kontrola	AA 25 mg/kg tm	AA 50 mg/kg tm
Pericentralni region	++	+	+++
Središnji region	+	+	++
Periportalni region	+/-	+/-	+

Intenzitet boje PAS granulacija je definisan sledećim stepenima gradacije: (-) odustvo obojenosti; (+) slaba obojenost; (++) srednja obojenost; (+++) jaka obojenost.



Slika 4.2. Depoziti glikogena u jetri juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih akrilamidom. PAS-pozitivne granulacije su predstavljene crveno-ružičastom bojom, a njihov intenzitet odražava količinu glikogena u hepatocitima. a) Kontrola – zastupljen klasičan obrazac distribucije glikogenskih depozita u okviru lobulusa; odnosno uočava se trend smanjenja količine glikogena od centralnog ka perifernom delu lobulusa, najveće količine glikogena prisutne u pericentralnim hepatocitima, dok su središnji i periportalni hepatociti siromašniji PAS-pozitivnim granulacijama; b) AA25 – uočava se sveukupno smanjenje PAS-pozitivnih granulacija u odnosu na kontrolu, depo glikogena je vidno redukovano u svim regionima lobulusa, posebno u periportalnim regionima gde većina ćelija sadrži izuzetno malu količinu glikogenskih depozita; c) AA50 – prisutno vidno uvećanje glikogenskog depoa u hepatocitima, posebno u pericentralnim i središnjim regionima lobulusa u odnosu na kontrolu i tretman nižom dozom, akumulacija glikogena se uočava u vidu intenzivno crveno-ružičasto obojene citoplazme hepatocita, u periportalnim regionima se uočavaju hepatociti sa manjom količinom crveno-ružičastih granulacija. CV-centralna vena, PA-portalni region. PAS metoda bojenja. Bar: 50 μ m.



Slika 4.3. Depoziti glikogena u jetri juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih akrilamidom. PAS-pozitivne granulacije su predstavljene crveno-ružičastom bojom, a njihov intenzitet odražava količinu glikogena u hepatocitima. a) Kontrola – kod većine hepatocita glikogenske granulacije su dispergovane duže cele citoplazme, pri čemu se kod pericentralnih hepatocita uočava prisustvo veće količine glikogenskog depoa u odnosu na hepatocite periportalnog regiona; b) AA25 – kod većine hepatocita se uočava slabiji intenzitet obojenosti citoplazme, što ukazuje na smanjeno prisustvo PAS-pozitivnih granulacija u citoplazmi hepatocita, manji broj ćelija ima prominentno obojene glikogenske granulacije lokalizovane u blizini nukleusa ili plazma membrane; c) AA50 – uočava se dominacija hepatocita kod kojih je citoplazma kompletno ispunjena glikogenom, najčešće u formi jedne ili nekoliko krupnih, intenzivno obojenih granula, neki hepatociti u centralnom i središnjem regionu lobulusa pored glikogenskih granulacija, u citoplazmi imaju i vakuolama-slične formacije. CV-centralna vena. PAS metoda bojenja. Bar: 20 μm .

Detaljnijom histološkom analizom uzoraka jetre iz svake od eksperimentalnih grupa, uočene su sledeće karakteristike vezane za deponovanje i distribuciju glikogenskih granulacija kako u okviru lobulsa, tako i u okviru samih hepatocita.

Kontrola. U jetri kontrolnih životinja, na uvećanju 100x zapaža se tendencija nagomilavanja glikogena u hepatocitima koji su se nalazili oko centralnih vena, velikih krvnih sudova i pojedinih portalnih trijada. Hepatociti sa većom količinom glikogena su najčešće bile lokalizovane u grupicama od po nekoliko ćelija. Sinusoidni prostori oko hepatocita sa većim sadržajem glikogena bili su jasno definisani, sa većim stepenom dilatacije u odnosu na sinusoidne oko hepatocita sa manjim depoom glikogena (Sl. 4.2) (Tab. 4.2).

Na uvećanju 400x je uočeno da se većina lobulsa koji su zauzimali središnji deo preseka karakteriše prisustvom hepatocita koji su imali sitne, ravnomerno dispergovane granulacije glikogena po celoj citoplazmi (Sl. 4.3). Nasuprot njima, u lobulusima na periferniji preseka dominirali su hepatociti sa gusto nagomilanim glikogenom u formi jedne ili nekoliko krupnih granula. Nukleusi hepatocita sa bogatim sadržajem glikogena često su bili maskirani crveno-ružičastim granulacijama (Sl. 4.3) (Tab. 4.2).

U subkapsularnom delu preseka je zabeleženo prisustvo izduženih, poligonalnih hepatocita sa intenzivno obojenom crveno-ružičastom citoplazmom. U prvom sloju ćelija ispod kapsule je bio prisutan gusto nagomilan glikogen, najčešće u formi par kompaktnih, krupnih granula, koje su ispunjavale kompletnu citoplazmu, što je kod nekih ćelija maskiralo nukelus. Naredni slojevi ćelija su takođe bili intenzivno obojeni, s tim da je uočeno polarizovano nagomilavanje glikogenskih agregata na polu hepatocita koji je orijentisan ka središnjem delu preseka.

Središnji deo preseka zauzimali su lobulusi koji su međusobno imali relativno ujednačenu količinu glikogena, i karakterisali se klasičnim obrascem deponovanja glikogena od centralnog ka periportalnom delu. Pored toga, i u okviru pojedinačnih lobulusa uočeni su hepatociti sa različitim sadržajem glikogena. Na granicama susćicanja dva lobulusa hepatociti su često bili gotovo bez glikogena. Lobulusi sačinjeni od hepatocita sa većim depoom glikogena imali su jasno izražene Remak-ove gredice, tj. sinusoidne prostore. Depo glikogena je bio skoncentrisan u hepatocitima oko centralne vene, dok su hepatociti na periferiji lobulusa imali mali broj granula

(Sl. 4.3) (Tab. 4.2). U regionu portalne trijade, najčešće su bili prisutni hepatociti sa relativno malo glikogena.

Citoplazma većine hepatocita koji su bili neposredno u blizini većih krvnih sudova je često bila ispunjena glikogenskim granulacijama koje su okruživale jedro ćelije. Kako se udaljenost ćelija od lumena krvog suda povećavala, količina glikogena je postepeno opadala, pri čemu su granulacije bile polarizovano lokalizovane u delu ćelije koji je bliži krvnom sudu. Sinusoidi između hepatocita u ovom regionu su bili jasno definisani (Sl. 4.3) (Tab. 4.2).

AA25. Histološka analiza jetre pacova tretiranih dozom do 25 mg/kg tm AA na uvećanju 100x je pokazala da je, u odnosu na kontrolne uzorke, ukupan depo glikogena u hepatocitima bio manji, što se moglo zaključiti na osnovu slabijeg intenziteta obojenosti PAS-pozitivnih granulacija u hepatocitima (Sl. 4.2). Usled slabije obojenosti granulacija, granice između hepatocita i samih lobulusa su bile slabije uočljive. Na mestu susticanja lobulusa hepatociti su bili gotovo bez glikogena. Duž preseka su dominirale svetlo obojene ćelije, sa vrlo malo glikogena, demaskiranog jedra. Uočena je smena regiona gde se nalaze hepatociti sa većim sadržajem glikogena, i oko kojih su sinusoidi dobro izraženi, sa regionima gde dominiraju ćelije sa malom količinom glikogena (Sl. 4.3) (Tab. 4.2).

Analizom preseka jetre na uvećanju 400x utvrđeno je da kod većine hepatocita preovladava sitno zrnast sadržaj glikogena, pri čemu su granule pretežno raposređene u uskom sloju oko jedra i plazma membrane. Uočeni su hepatociti sa izuzetno malim sadržajem glikogena. Pored toga, citoplazma ćelija kod kojih nije uočeno prisustvo zrnastog sadržaja glikogena, odavala je utisak „vakuoliziranosti“. U okviru lobulusa su se naizmenično smenjivale grupice od po nekoliko hepatocita sa relativno bogatijim sadržajem glikogena i grupice hepatocita sa veoma malo ili bez glikogenskih granulacija (Sl. 4.3) (Tab. 4.2).

U subkapsularnom delu preseka su bili prisutni hepatociti izduženog oblika, intenzivno crveno-ružičaste boje i demaskiranog jedra. Naredni slojevi ćelija su bili nešto manje ispunjeni glikogenom u odnosu na kontrolne uzorke. Agregati glikogena nisu bili kompaktni, već su se javljali u vidu manjih granula, svetlo crveno-ružičaste boje.

Središnji deo preseka činili su lobulusi sa manjim intenzitetom obojenosti u odnosu na lobuluse kontrolnih životinja, što je pokazatelj redukovane količine glikogenskih agregata (Sl.

4.2). Duž ovog dela preseka dominirali su slabo obojeni hepatociti sa sitnim granulacijama glikogena. Kod lobulusa koji su u svojoj neposrednoj blizini imali veći krvni sud, uočeno je da su glikogenske granulacije ispoljavale tendenciju nakupljanja uz deo ćelijske membrane koji je bliže datom krvnom sudu. Između hepatocita sa nešto većim sadržajem glikogena, sinusoidi su bili jasno definisani i dilatirani (Sl. 4.3). Ne mestu susticanja lobulusa hepatociti su bili gotovo prazni. Takođe, pojedine ćelije sa potpuno praznom citoplazmom su odavale utisak „vakuoliziranosti“ (Sl. 4.3) (Tab. 4.2). Hepatociti u regionu portalne trijade su najčešće bili bez glikogena. Prisustvo zrnastih granulacija glikogena, dispergovanih po celoj citoplazmi je pronađeno kod malog broja ćelija. Nasuprot njima, veće krvne sudove su okruživali hepatociti bogati glikogenom. Citoplazma hepatocita je bila ispunjena glikogenskim agregatima u vidu sitnih granulacija, koje nisu maskirale jedro, a između ćelija su bili jasno izraženi sinusoidi (Sl. 4.3) (Tab. 4.2).

AA50. Analizom uzoraka jetre pacova tretiranih dozom od 50 mg/kg tm AA na uvećanju 100x uočeno je prominentno uvećanje ukupne količine glikogena u hepatocitima u odnosu na kontrolu i drugi tretman. Prisustvo intenzivno crveno-ružičasto obojenih hepatocita je bio indikator povećane količine deponovanog glikogena u citoplazmi. Tendencija nagomilavanja glikogena oko centralne vene je bila veoma izražena kod svakog pojedinačnog lobulusa (Sl. 4.2). Hepatociti su imali demaskirana jedra i citoplazmu ispunjenu gustim glikogenskim agregatima. Sinusoidi su bili veoma izraženi, posebno u pericentralnim regionim lobulusa gde su hepatociti bili najbogatiji glikogenom. Kod nekih lobulusa su sinusoidi između Remak-ovih gredica i pojedinačnih hepatocita bili veoma dobro definisani, pa je u pojedinim regionima presek imao izuzetno „porozan“ izgled (Sl. 4.2) (Tab. 4.2).

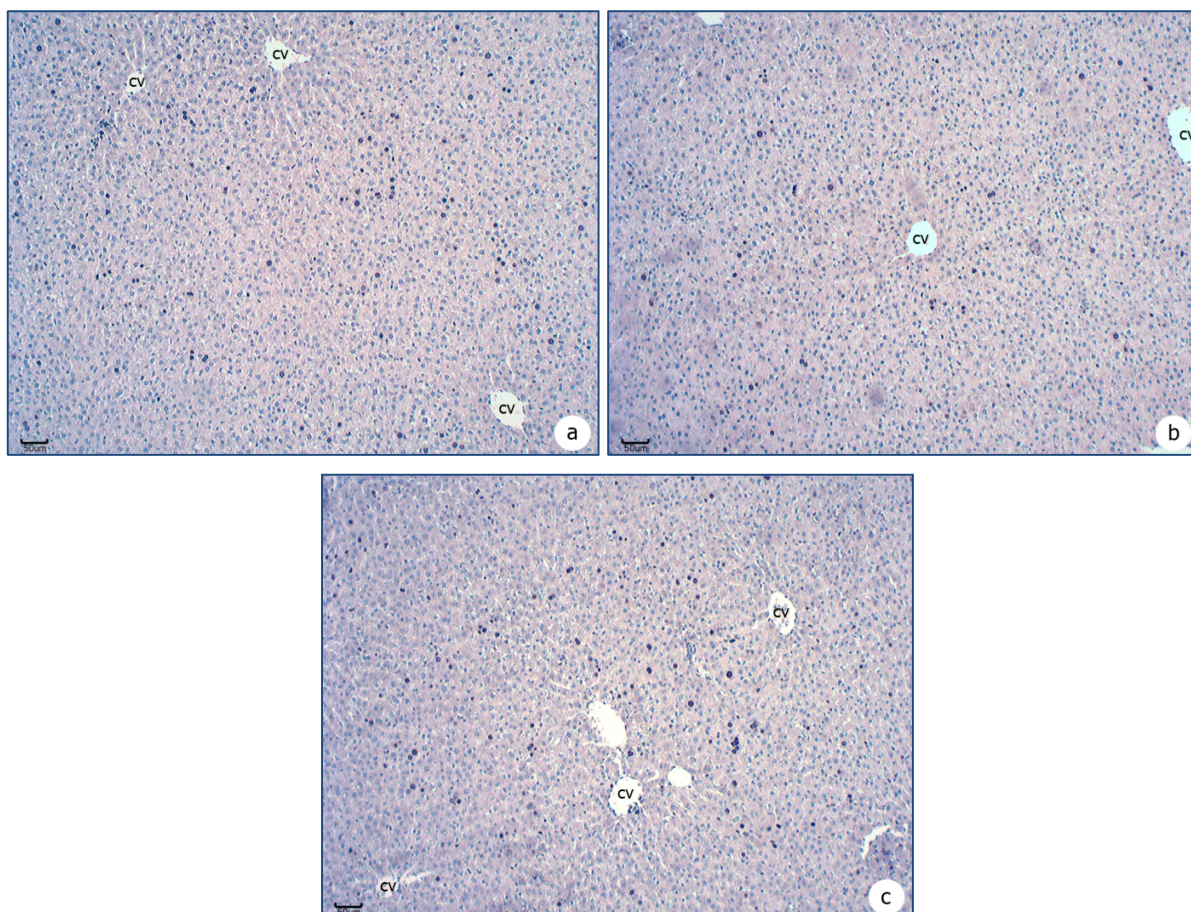
Na uvećanju 400x uočena je dominacija hepatocita bogatog glikogenskog sadržaja (Sl. 4.3). Citoplazma ovih hepatocita je bila ispunjena glikogenskim agregatima u formi jedne ili nekoliko manih granula koje su imale formu tamno obojene crveno-ružičaste vakuole. Svetlo obojene ćelije ili ćelije čija je citoplazma odavala utisak vakuoliziranosti su se retko sretale. Polarizovanost nagomilavanja granulacija u citoplazmi je bila slabije izražena i zapažena samo kod ćelija koje su imale malu količinu granulacija. Takođe, ćelije koje su u citoplazmi imale nekoliko većih agregata glikogena vakuolarnog izgleda imale su ove agregate skoncentrisane pretežno oko nukleusa (Sl. 4.3) (Tab. 4.2).

Subkapsularni region preseka se karakterisao manjim intenzitetom obojenosti hepatocita u odnosu na prethodne dve eksperimentalne grupe. Citoplazma subkapsularnih hepatocita je sadržavala vidno manju količinu glikogena, sa manje izraženom polarizovanošću lokalizacije granulacija. Intenzivno obojeni, kompaktni glikogenski agregati su bili prisutni samo u prvom sloju subkapsularnih hepatocita.

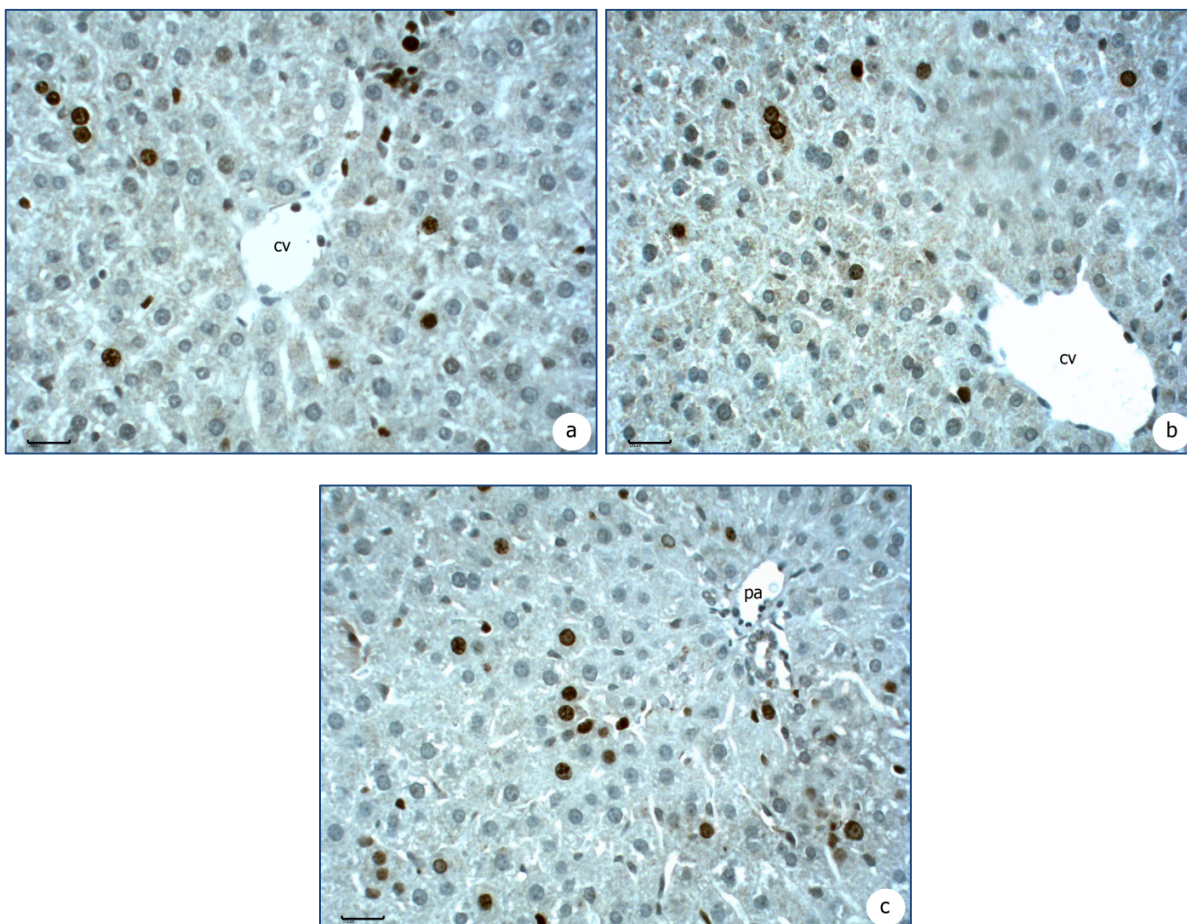
U središnjem delu preseka su dominirali intenzivno obojeni crveno-ružičasti hepatociti, u čijoj citoplazmi su se nalazile sitno granulirane glikogenske granulacije, dispergovane po celoj citoplazmi. Polarizovanost lokalizacije granulacija u ćelijama je prisutna samo kod hepatocita koji se nalaze u blizini većih krvnih sudova. Mestimično su se mogle pronaći grupe hepatocita sa manjim sadržajem glikogenom u vidu crveno-ružičastih vakuola smeštenih pretežno uz jedro (Sl. 4.3) (Tab. 4.2). U regionu portalne trijade su se nalazili hepatociti sa veoma sitno zrnastim sadržajem glikogena. U regionima oko krupnijih krvnih sudova, dominirali su hepatociti čija je citoplazma bila ispunjena sitnim glikogenskim granulacijama (Sl. 4.3) (Tab. 4.2).

4.3 Proliferativne karakteristike hepatocita

Protein Ki-67 predstavlja marker proliferacije, pa je imunobojenje preseka jetre na ovaj protein bilo korišćeno radi procene proliferativnih karakteristika hepatocita nakon AA tretmana. Histološka analiza je pokazala prisustvo nuklearne pozitivnosti hepatocita na ovaj marker kod svih eksperimentalnih grupa. Imunopozitivnost je najvećim delom bila lokalizovana u hepatocitima središnjeg i periportalnog regiona lobulusa. Pored hepatocita, i pojedine neparenhimske ćelije su pokazale imunopozitivnost na Ki-67. Većina imunopozitivnih hepatocita je ispoljavala specifičnu i jaku reakciju nuklearnog bojenja. U odnosu na kontrolu, jetra pacova tretiranih sa 25 mg/kg tm AA je pokazala manji stepen imunopozitivnosti na Ki-67, dok je kod pacova tretiranih sa 50 mg/kg tm AA zapažen suprotan trend (Sl. 4.4) (Tab. 4.3).



Slika 4.4. Imunopozitivnost jetre juvenilnih mužjaka pacova na marker proliferacije Ki-67 nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. Ki-67 pozitivni hepatociti se uočavaju kao ćelije sa mrko obojenim nukleusima. a) Kontrola – Ki-67 pozitivni hepatociti lokalizovani u središnjim i periportalnim regionima; b) AA25 – smanjena imunopozitivnost hepatocita na Ki-67 protein odnosu na kontrolu; c) AA50 – porast imunopozitivnosti hepatocita na Ki-67 protein. CV-centralna vena. Imunohistohemijsko bojenje na Ki-67 protein. Bar: 50 μ m.

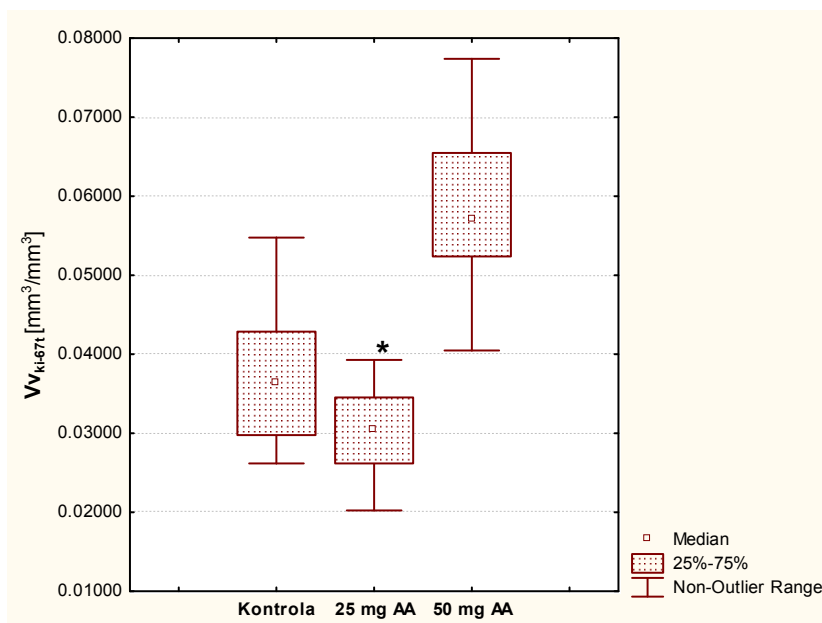


Slika 4.5. Imunopozitivnost jetre juvenilnih mužjaka pacova na marker proliferacije Ki-67 nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. Ki-67 pozitivni hepatociti se uočavaju kao ćelije sa mrko obojenim nukleusima. a) Kontrola – Ki-67 pozitivni hepatociti su većinom lokalizovani u središnjim i periporallnim regionima lobulusa; b) AA25 – smanjen broj Ki-67 pozitivnih hepatocita u odnosu na kontrolu, pozitivnost reakcije dominantno lokalizovana u središnjim regionima lobulusa, ali uz smanjen intenzitet obojenosti imunopozitivnih nukleusa; c) AA50 – uvećanje broja Ki-67 pozitivnih hepatocita u odnosu na kontrolu, pozitivnost reakcije najvećim delom lokalizovana u središnjim i periportalnim regionima lobulusa, pri čemu se uočava različit intenzitet obojenosti imunopozitivnih nukleusa. CV-centralna vena, PA-portalni region. Imunohistohemijsko bojenje na Ki-67 protein. Bar: 20 μ m.

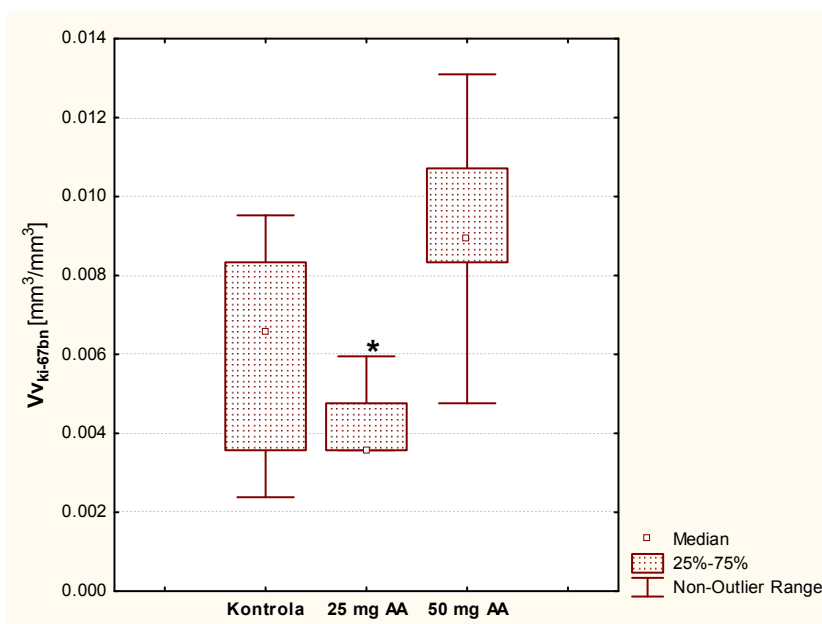
Inicijalni histološki nalaz je kasnije potvrdila kvantitativna stereološka analiza. Kod grupe tretirane nižom dozom AA došlo je do pada vrednosti svih evaluiranih stereoloških parametara u odnosu na kontrolu i grupu tretiranu višom dozom (Tab. 4.3). Nasuprot tome, kod grupe tretirane višom dozom, svi analizirani parametri su bili u porastu u odnosu na druge dve eksperimentalne grupe (Tab. 4.3).

U grupi tretiranoj sa 25 mg/kg tm AA je uočen pad volumenske gustine ukupnih ($V_{V_{ki-67t}}$) i dvojedarnih ($V_{V_{ki-67bn}}$) Ki-67 pozitivnih hepatocita u odnosu na druge dve eksperimentalne grupe, ali se taj pad pokazao značajnim samo u odnosu na grupu tretiranu dozom od 50 mg/kg tm AA

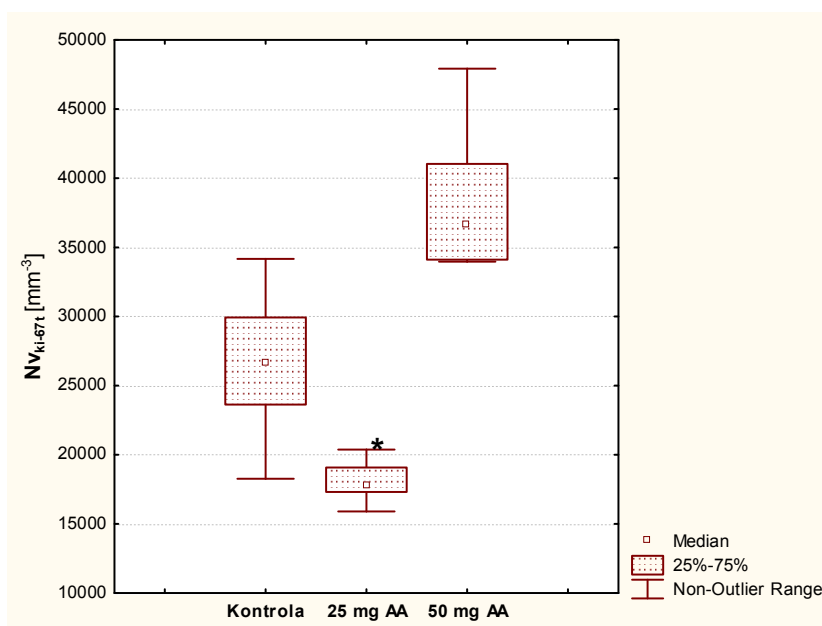
($p < 0,01$) (Graf. 4.5, 4.6) (Tab. 4.3). Smanjenje numeričke gustine ukupnih ($N_{V_{ki-67t}}$) Ki-67 pozitivnih hepatocita u grupi tretiranoj nižom dozom AA se pokazalo statistički značajnim u odnosu na kontrolu i grupu tretiranu višom dozom AA (obe pri $p < 0,001$) (Graf. 4.7) (Tab. 4.3), dok je smanjenje numeričke gustine dvojedarnih ($N_{V_{ki-67bn}}$) Ki-67 pozitivnih hepatocita bilo signifikantno samo u odnosu na grupu tretiranu višom dozom AA ($p < 0,01$) (Graf. 4.8) (Tab. 4.3).



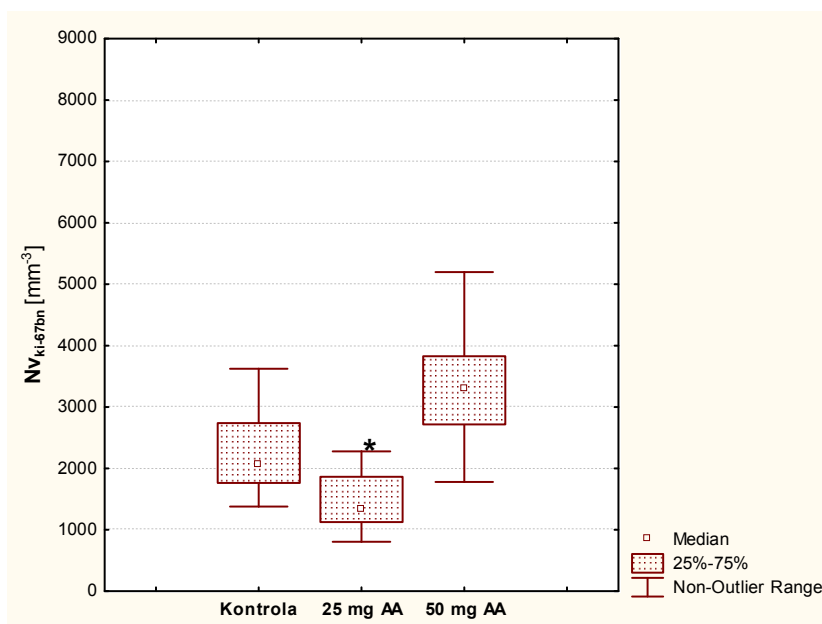
Grafik 4.5. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih hepatocita ($V_{V_{ki-67t}}$) juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na grupu tretiranu dozom od 50 mg/kg tm AA ($p < 0,01$).



Grafik 4.6. Volumenska gustina Ki-67 pozitivnih dvojedarnih hepatocita ($Vv_{Ki-67bn}$) juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na grupu tretiranu dozom od 50 mg/kg tm AA ($p < 0,01$).



Grafik 4.7. Numerička gustina Ki-67 pozitivnih hepatocita (Nv_{Ki-67t}) juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na kontrolu i grupu tretiranu dozom od 50 mg/kg tm AA ($p < 0,001$).



Grafik 4.8. Numerička gustina Ki-67 pozitivnih dvojedarnih hepatocita ($Nv_{Ki-67bn}$) juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu grupu tretiranu dozom od 50 mg/kg tm AA ($p < 0,01$).

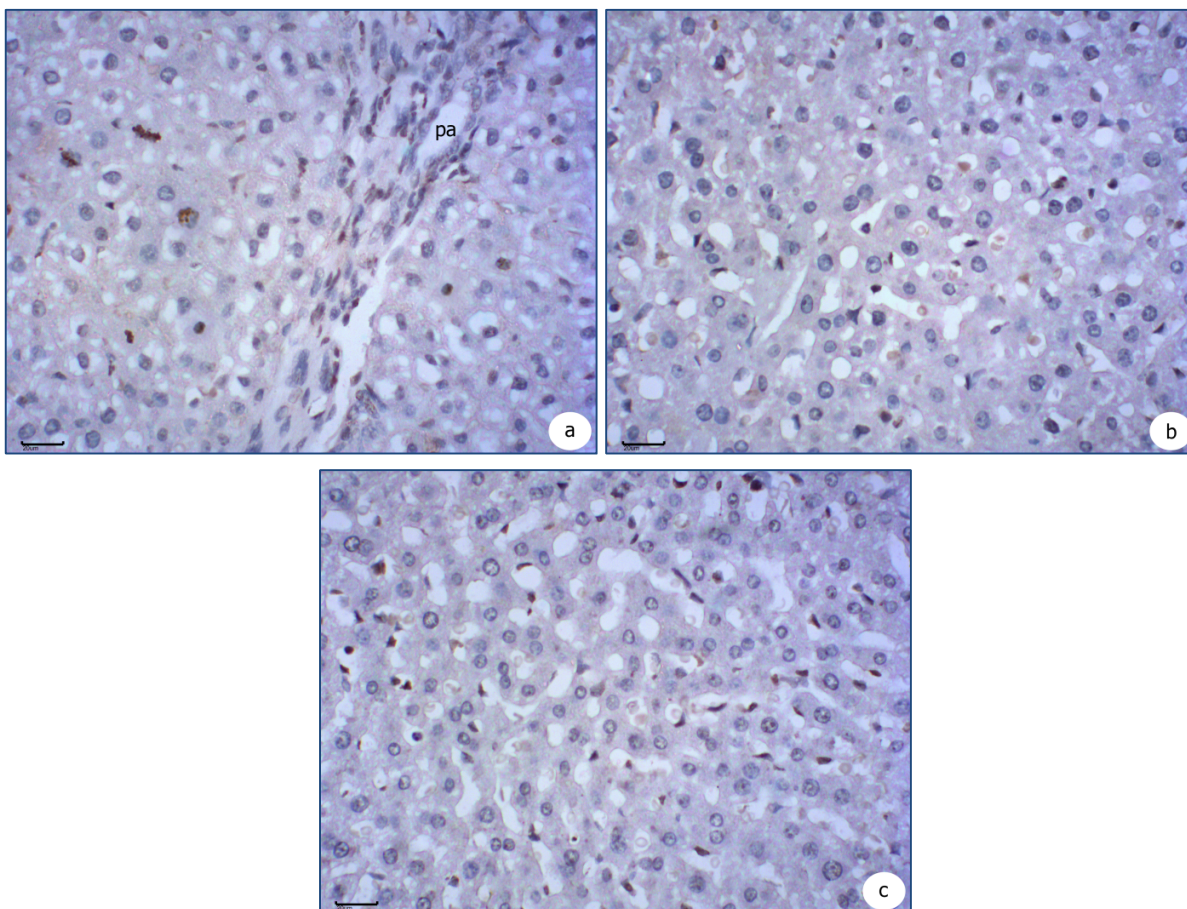
Tabela 4.3. Volumenska i numerička gustina ukupnih (Vv_{Ki-67t} , Nv_{Ki-67t}) i dvojedarnih ($Vv_{Ki-67bn}$, $Nv_{Ki-67bn}$) Ki-67 pozitivnih hepatocita u jetri kontrolnih i pacova tretiranih AA prikazane su kao vrednosti mediane sa gornjim i donjim kvartilima (u zagradi). AA označava akrilamidni tretman.

Stereološki parametar	Kontrola	AA 25 mg/kg tm	AA 50 mg/kg tm
Vv_{Ki-67t} [mm^3/mm^3]	0,036310 ^{a,b} (0,029762) (0,042857)	0,030357 ^a (0,026190) (0,034524)	0,057143 ^b (0,052381) (0,065476)
$Vv_{Ki-67bn}$ [mm^3/mm^3]	0,006548 ^{a,b} (0,003571) (0,008333)	0,003571 ^a (0,003571) (0,004762)	0,008929 ^b (0,008333) (0,010714)
Nv_{Ki-67t} [mm^{-3}]	26629 ^a (23632) (29929)	17734 ^b (17316) (19078)	36565 ^a (34113) (41040)
$Nv_{Ki-67bn}$ [mm^{-3}]	2057 ^{a,b} (1764) (2738)	1337 ^b (1125) (1864)	3289 ^a (2717) (3827)

Sve vrednosti mediane označene istim slovom predstavljaju homogene grupe (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

4.4 Apoptičke karakteristike hepatocita

Caspase 3 proteaza predstavlja važan enzim za pokretanje apoptoze i iz tog razloga se smatra jednim od pokazatelja programirane ćelijske smrti. Imunobojenje preseka jetre na ovaj protein je bilo korišćeno radi procene apoptičkih karakteristika hepatocita i/ili stromalnih ćelija nakon AA tretmana. Histološka analiza je pokazala prisustvo specifične nuklearne pozitivnosti ćelija na ovaj marker kod svih eksperimentalnih grupa, dok je citoplazmatska imunopozitivnost bila skoro u potpunosti odsutna. Imunopozitivnost je najvećim delom bila lokalizovana u hepatocitima središnjeg i periportalnog regiona lobulusa, pri čemu je većina hepatocita ispoljavala specifičnu reakciju nuklearnog bojenja (Sl. 4.6). Pored toga, i pojedine neparenhimske ćelije (npr. endotelne i Kupffer-ove ćelije) su pokazale imunopozitivnost na Caspase 3. U odnosu na kontrolu, hepatociti jetre pacova tretiranih sa 25 odnosno, 50 mg/kg tm AA su pokazali manji stepen imunopozitivnosti na Caspase 3, dok je istovremeno imunopozitivnost stromalnih ćelija na ovaj marker bila veća (Sl. 4.6) (Tab. 4.4).



Slika 4.6. Imunopozitivnost jetre juvenilnih mužjaka pacova na marker apoptoze Caspase 3 nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. Caspase 3 pozitivne ćelije se uočavaju na osnovu prisustva mrke obojenosti. a) Kontrola – imunopozitivnost dominantno prisutna u jedru hepatocita koji se nalaze u nekoj od faza mitoze, citoplazmatska imunopozitivnost veoma retko zastupljena, imunopozitivni hepatociti većinom lokalizovani na periferiji lobulusa; slaba pozitivnost prisutna i u nukleusima stromalnih ćelija b) AA25 – prominentna redukcija imunopozitivnosti parenhimskih ćelija u odnosu na kontrolu, porast imunopozitivnosti uočen kod stromalnih ćelija; c) AA50 – veoma slabo izražena imunopozitivnost ćelija u odnosu na kontrolu, povećana imunopozitivnost uočena kod stromalnih ćelija. Imunohistohemijsko bojenje na Caspase 3. Bar: 20 μ m.

Detaljnija histološka analiza uzoraka jetre iz svake od eksperimentalnih grupa, pokazala je sledeće karakteristike vezane za njenu imunopozitivnost na marker Caspase 3.

Kontrola. Kod jetre kontrolnih životinja je pronađen relativno mali broj hepatocita pozitivnih na Caspase 3. Reakcija imunopozitivnosti je bila specifična i dominantno lokalizovana u jedru hepatocita, i to većinom kod ćelija koje su bile u nekoj od faza ćelijske deobe (Sl. 4.6). Kod pojedinih hepatocita, pored nukleusa, imunopozitivnost je bila lokalizovana u uskom sloju citoplazme neposredno oko nukleusa. Jasna citoplazmatska imunopozitivnost je bila prisutna kod veoma malog broja hepatocita i bila je veoma slabog intenziteta. Imunopozitivnost na Caspase 3

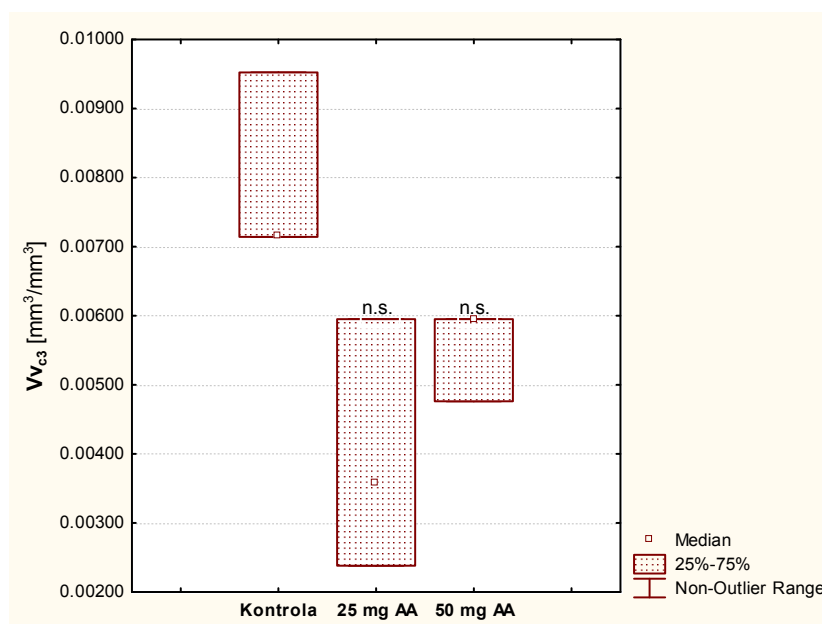
je najčešće bila lokalizovana u hepatocitima u blizini portalne trijade ili većih krvnih sudova (Sl. 4.6). Sama pozitivnost jedara hepatocita je bila dobro definisana u formi sitno zrnastog braon obojenja hromatina odnosno, hromozoma. Na osnovu kondenzovanosti i lokalizacije hromozoma, moglo se pretpostaviti da se većina imunopozitivnih hepatocita nalazi u profazi ili metafazi mitoze, a manji broj je imao pozitivne anafazne hromozome (Sl. 4.6). Imunopozitivna jedra hepatocita u anafazi ćelijske deobe su bila sporadična, kao i imunopozitivna jedra interfaznih hromozoma. Pored toga uočena je imunopozitivnost pojedinih dvojedarnih hepatocita, pri čemu je najčešće samo jedan nukleus bio pozitivan. Tokom histološke analize, nađeno je par hepatocita sa specifičnom, parcijalnom imunopozitivnošću na Caspase 3, ograničenom samo na jedan deo nukleusa (Sl. 4.6). Prisustvo slabe imunopozitivnosti je takođe uočeno i u nukleusima stromalnih ćelija, odnosno kod ćelija sinusoidnih prostora, među kojima je bilo najviše onih koje bi prema morfološkim karakteristikama nukleusa odgovarale Kupffer-ovim i endotelnim ćelijama (Sl. 4.6).

AA25. Preseci jetre pacova tretiranih nižom dozom AA karakterisali su se izuzetno retkim prisustvom Caspase 3 pozitivnih hepatocita u odnosu na kontrolu (Sl. 4.6). Specifična reakcija na Caspase 3 je uočena u jedrima hepatocita u formi sitno-granulirane imunopozitivnosti. Ovi hepatociti su bili krupni i prema morfologiji jedara bili u profazi mitoze. Većina imunopozitivnih hepatocita je bila lokalizovana na periferiji lobulusa, odnosno u regionu portalnih trijada. Interfazni imunopozitivni hepatociti su bili veoma retki. Veća pozitivnost ćelija na Caspase 3 je uočena kod stromalnih ćelija, posebno kod onih u regionu portalne trijade, ali je bila slabog intenziteta (Sl. 4.6). Jedra imunopozitivnih stromalnih ćelija su imala plavo-braon nijansu u odnosu na ostale ćelije koje nisu pokazale imunopozitivnost i karakterisale se svetlo plavim nukleusima (Sl. 4.6).

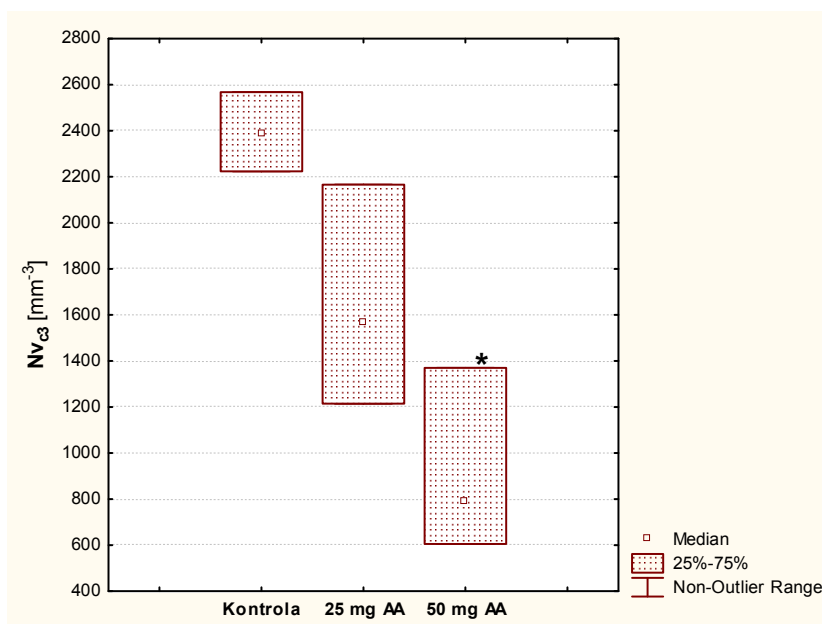
AA50. Uzorci jetre životinja tretiranih višom dozom AA su se karakterisali izuzetno slabom imunopozitivnošću hepatocita u odnosu na kontrolu i tretman nižom dozom AA (Sl. 4.6). Retki imunopozitivni hepatociti su se najčešće nalazili na periferiji lobulusa ili u blizini portalnog regiona. Reakcija imunopozitivnosti je većinom bila prisutna u profaznom odnosno, metafaznom nukleusu. Uočeno je prisustvo hepatocita sa blago imunopozitivnim jedrima koji su odavali utisak interfaze ili rane profaze. Dvojedarni hepatociti koji su se pokazali pozitivnim na Caspase 3 su imali specifičnu reakciju u oba nukleusa. Pored toga, u ovoj grupi je pokazano uvećanje stromalnih ćelija koje su imunopozitivne na Caspase 3 kako u odnosu na kontrolu, tako i u

odnosu na grupu tretiranu nižom dozom AA (Sl. 4.6). Jedra pozitivna na Caspase 3 su po morfologiji najvećim delom odgovarala Kupffer-ovim ćelijama. Histološka analiza je zabeležila tendenciju da na mestima sa jasno definisanom imunopozitivnošću hepatocita, imunopozitivnost stromalnih ćelija u njihovoj neposrednoj blizini odsustvuje, odnosno svaka Kupffer-ova ćelija koja se pokazala imunopozitivnom, u neposrednoj blizini je imala imunonegativan hepatocit (Sl. 4.6).

Kvantitativna stereološka analiza je potvrdila histološki nalaz. Oba tretmana AA su izazvala smanjenje volumena i broja Caspase 3 pozitivnih hepatocita u odnosu na kontrolu (Tab. 4.4). Smanjenje volumenske gustine Caspase 3 pozitivnih hepatocita ($V_{V_{c3}}$) je bilo prominentnije u grupi tretiranoj dozom od 25 mg/kg tm AA, nego što je to bio slučaj u grupi tretiranoj dozom od 50 mg/kg tm AA u odnosu na kontrolnu grupu (Graf. 4.9) (Tab. 4.4). Ipak, ovo smanjenje se nije pokazalo statistički značajnim. Smanjenje numeričke gustine Caspase 3 pozitivnih hepatocita ($N_{V_{c3}}$) u obe grupe tretirane AA sugerišu na dozno-zavisni karakter, pri čemu se pomenuto smanjenje pokazalo statistički značajnim pri poređenju kontrole i grupe tretirane višom dozom AA ($p < 0,05$) (Graf. 4.10) (Tab. 4.4).



Grafik 4.9. Volumenska gustina Caspase 3 pozitivnih hepatocita ($V_{V_{c3}}$) juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. n.s. - bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$).



Grafik 4.10. Numerička gustina Caspase 3 pozitivnih hepatocita (N_{vc3}) juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

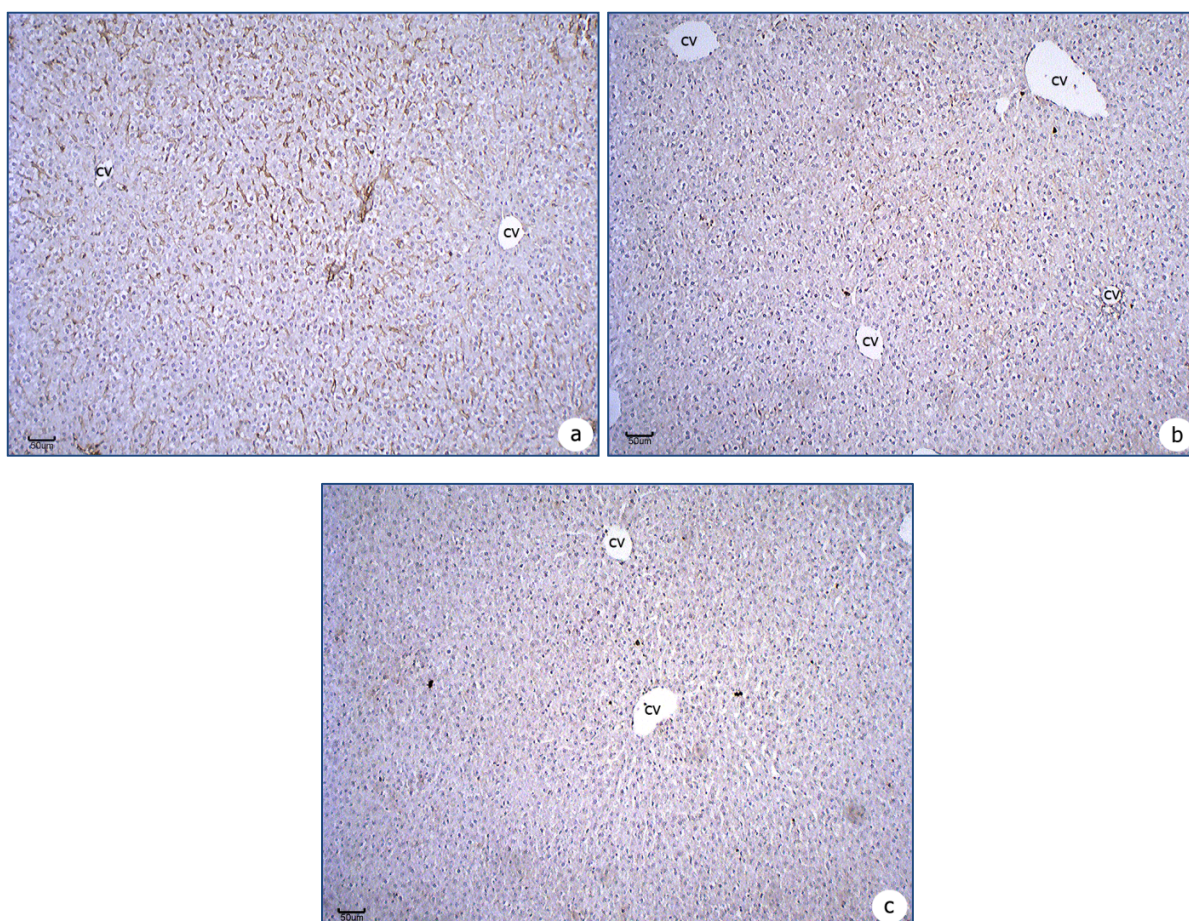
Tabela 4.4. Volumenska (V_{vc3}) i numerička (N_{vc3}) gustina Caspase 3-pozitivnih hepatocita u jetri kontrolnih i pacova tretiranih AA prikazane su kao vrednosti mediane sa gornjim i donjim kvartilima (u zagradi). AA označava akrilamidni tretman.

Stereološki parametar	Kontrola	AA 25 mg/kg tm	AA 50 mg/kg tm
V_{vc3} [mm^3/mm^3]	0,007143 ^a (0,007143) (0,009524)	0,003571 ^a (0,002381) (0,005952)	0,005952 ^a (0,004762) (0,005952)
N_{vc3} [mm^{-3}]	2386 ^a (2223) (2567)	1568 ^{a,b} (1214) (2165)	789 ^b (605) (1369)

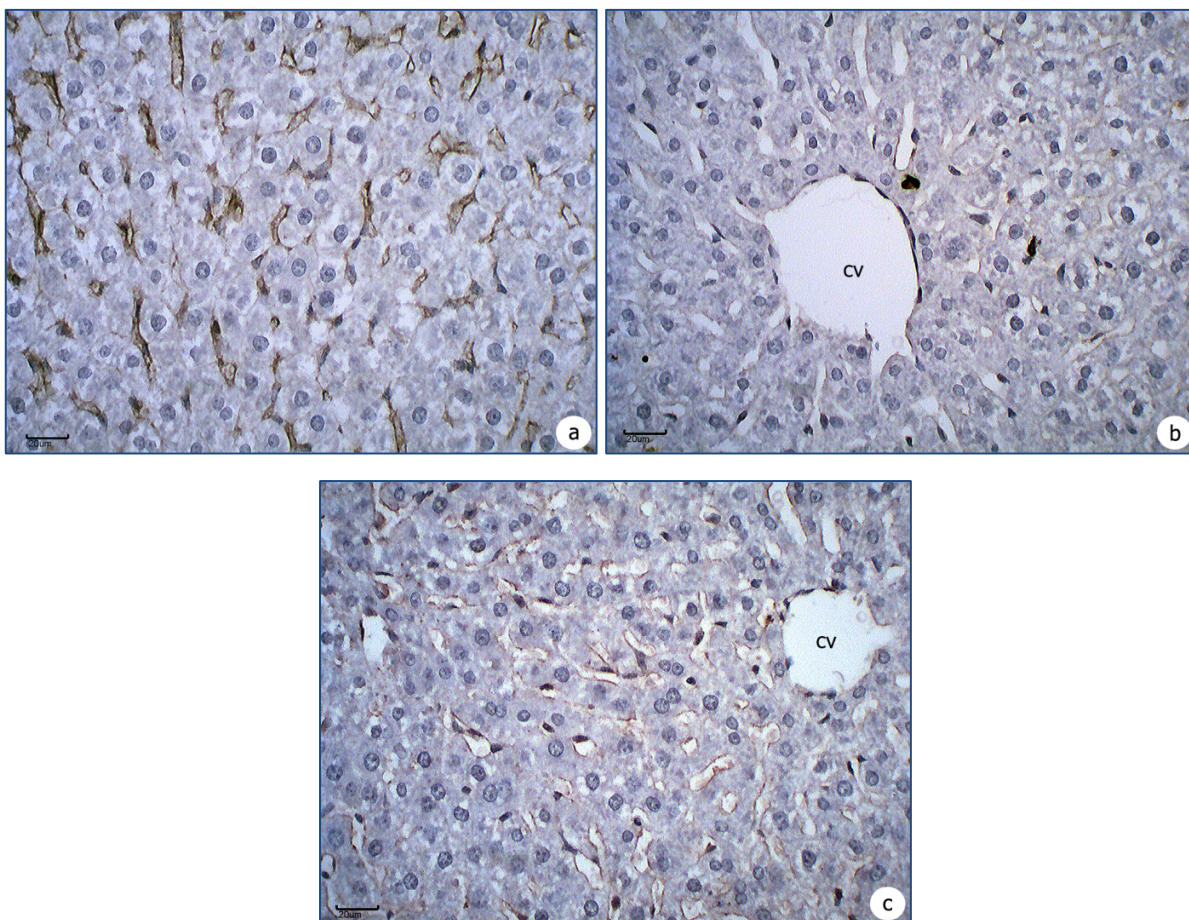
Sve vrednosti mediane označene istim slovom predstavljaju homogene grupe (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

4.5 Kupffer-ove ćelije

Kupffer-ove ćelije predstavljaju rezidentne makrofage u jetri. Njihova detekcija urađena je imunohistohemijski, bojenjem preseka jetre na marker CD68, koji je potvrđeni marker tkivnih makrofaga. Histološka analiza kontrolnih uzoraka jetre pacova je u najvećoj meri pokazala prisustvo specifične imunopozitvnosti na CD68 duž sinusoida, a u manjoj meri u citoplazmi Kupffer-ovih ćelija (Sl. 4.7, 4.8). Za razliku od kontrole, preseci jetre oba AA tretmana karakterisali su se izuzetno redukovanim ili skoro potpunim odsustvom pozitivnosti na CD68, koje se manifestovalo izrazito slabom reakcijom imunobojenja (Sl. 4.7).



Slika 4.7. Imunopozitivnost jetre juvenilnih mužjaka pacova na CD68, marker Kupffer-ovih ćelija, nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. Prisustvo mrke obojenosti predstavlja pozitivnu imunoreakciju. a) Kontrola – pozitivna imunoreakcija specifično lokalizovana u okviru sinusoida, pretežno na periferiji lobulusa; b) AA25 – smanjenje imunopozitivnosti duž sinusoidnih prostora u odnosu na kontrolu; c) AA50 – izrazito redukovana imunopozitivnost duž sinusoida u odnosu na kontrolu i drugi tretman. CV-centralna vena. Imunohistohemijsko bojenje na CD68 marker. Bar: 50 μ m.



Slika 4.8. Imunopozitivnost jetre juvenilnih mužjaka pacova na CD68, marker Kupffer-ovih ćelija, nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. Prisustvo mrke obojenosti predstavlja pozitivnu imunoreakciju. a) Kontrola – pozitivna imunoreakcija specifično lokalizovana u okviru sinusoida, pretežno na periferiji lobulusa, imunopozitivne Kupffer-ove ćelije prisutne u pericentralnom i središnjem regionu lobulusa; b) AA25 – smanjenje imunopozitivnosti Kupffer-ovih ćelija i sinusoidnih prostora u odnosu na kontrolu; c) AA50 – smanjena imunopozitivnost sinusoida, uz slabu pozitivnost Kupffer-ovih ćelija u odnosu na kontrolu i drugi tretman. CV-centralna vena. Imunohistohemijsko bojenje na CD68 marker. Bar: 20 µm.

Detaljnijom histološkom analizom imunobojenih preseka jetre pacova na marker Kupffer-ovih ćelija CD68 uočeno je prisustvo sledećih karakteristika u svakoj od eksperimentalnih grupa.

Kontrola. U jetri kontrolnih životinja, većina lobulusa se karakterisala specifičnom imunopozitivnošću na CD68 marker u okviru sinusoida, i to pretežno na periferiji lobulusa, u području portalnih trijada i na mestima susticanja više lobulusa (Sl. 4.8). Intenzitet imunoreakcije je varirao duž lobulusa, kao i između pojedinačnih lobulusa. Centralni i središnji regioni lobulusa su najčešće bili manje pozitivni u odnosu na

periferiju. Kod manjih lobulusa se imunopozitivnost prostirala celom dužinom Remak-ovih gredica, dok je kod većih ona bila najintenzivnija na periferiji, nešto slabija u središnjim regionima i odusustvala u centralnim regionima. Kupffer-ove ćelije sa imunopozitivnom citoplazmom su najčešće bile lokalizovane u pericentralnom i središnjem delu lobulusa (Sl. 4.8). Manji broj imunopozitivnih Kupffer-ovih ćelija zabeležen je u regionima gde su sinusoidi bili izrazito imunopozitivni. Jak intenzitet obojenosti sinusoida često je maskirao imunopozitivnost Kupffer-ovih ćelija, koje su se mogle identifikovati na osnovu morfologije njihovih jedara. U pericentralnim regionima pojedinih lobulusa, kod kojih inače nije bilo izrazite imunopozitivnosti sinusoida, uočena je jasna imunopozitivnost Kupffer-ovih ćelija, pri čemu je reakcija pozitivnosti bila ograničena na uzak pojas citoplazme neposredno oko jedra.

AA25. Kod pacova tretiranih nižom dozom AA zabeležen je prominentan pad pozitivnosti jetre na marker CD68 u odnosu na kontrolu, što se posebno odrazilo redukovanom imunopozitivnošću u sinusoidima (Sl. 4.8). Lobulusi kod kojih je zabeležena određena reakcija imunopozitivnosti duž sinusoida na CD68 marker, ona je bila dominantno lokalizovana na periferiji, oko portalnih trijada i na mestima susticanja nekoliko lobulusa. Imunopozitivne Kupffer-ove ćelije su bile retke i mogle su se naći u pericentralnim i središnjim regionima lobulusa. Većina ovih ćelija je imala blago obojenu citoplazmu, dok je kod manjeg broja ćelija intenzitet imunotreakcije bio izraženiji, pri čemu je takva imunopozitivnost bila skoncentrisana na uzak sloj citoplazme oko nukleusa.

AA50. Jetra pacova tretiranih višom dozom AA je pokazala još prominentniji pad imunopozitivnosti na marker CD68 u odnosu na jetru kontrolnih i pacova tretiranih nižom dozom AA. Većina lobulusa se karakterisala slabom i mestimičnom imunopozitivnošću sinusoidnih prostora na periferiji ili u blizini portalne trijade (Sl. 4.8). Kod nekoliko lobulusa je uočen jači intenzitet imunoobojenosti sinusoidnih prostora. Retke imunopozitivne Kupffer-ove ćelije su se dominantno nalazile u središnjem i pericentralnom regionu lobulusa, a reakcija pozitivnosti na CD68 marker bila je pretežno lokalizovana u regionu citoplazme oko jedra (Sl. 4.8). Kod pojedinih, izrazito imunopozitivnih Kupffer-ovih ćelija mogla se uočiti jasno definisana, sitno-granulirana imunopozitivnost citoplazme neposredno oko nukleusa.

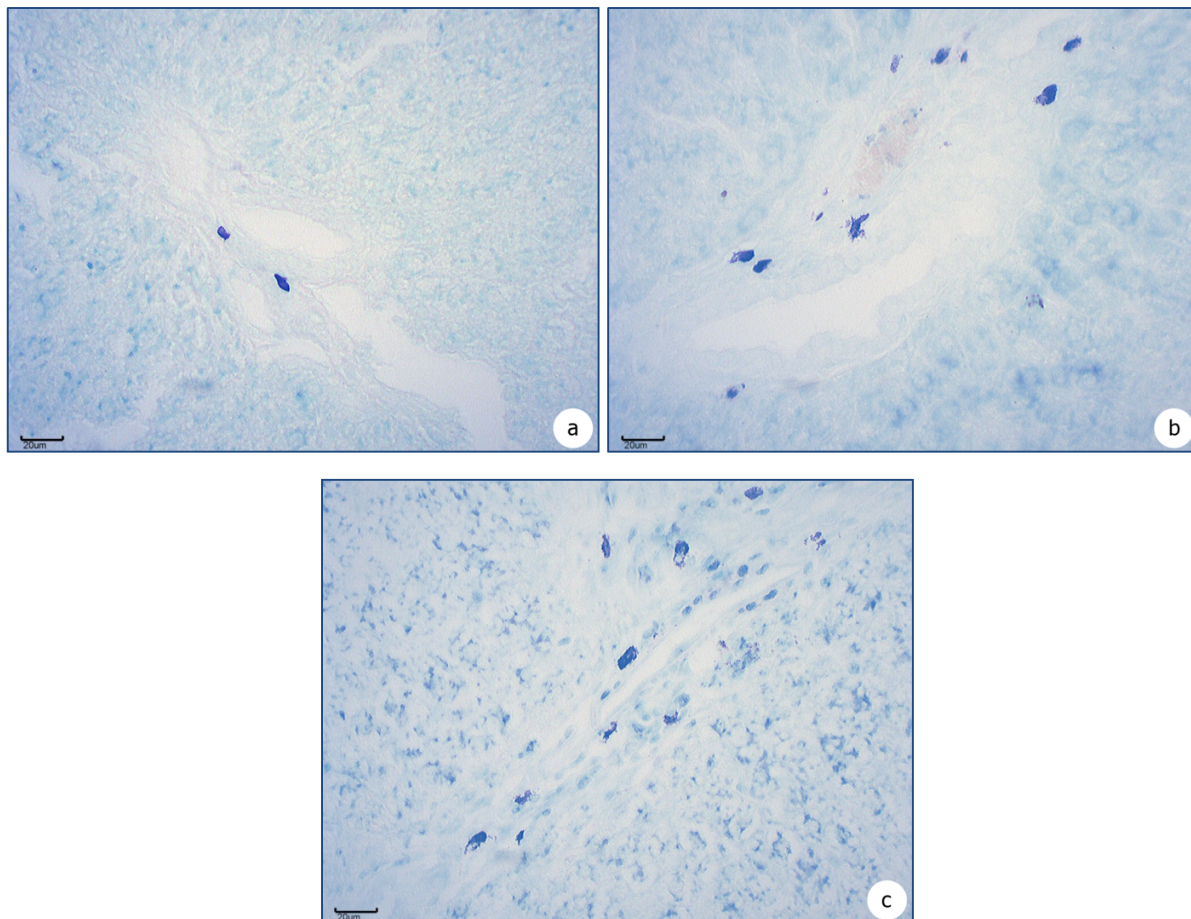
4.6 Mastociti

Mastociti su u jetri juvenilnih pacova su prikazani TB metodom bojenja. TB metahromatski boji glikozaminoglikane, koji su komponenta sekretornih granula u citoplazmi mastocita, i prikazuju se kao sitno-zrnaste, tamno ljubičaste granulacije. Količina i distribucija TB-pozitivnih granualcija uz analizu opšte ćelijske morfologije omogućili su razlikovanje intaktnih ćelija sa dobro očuvanim ćelijskim integritetom od ćelija sa izmenjenom morfologijom. Na ovaj način je bilo moguće odrediti brojnost i funkcionalno stanje mastocita.

Kontrola. Histološka analiza jetre kontrolnih životinja na uvećanju 100x pokazala je dobru naseljenost ovog organa mastocitima. Ćelije su se većinom nalazile u manjim grupicama i bile lokalizovane oko krvnih sudova portalne trijade i/ili drugih većih krvnih sudova (Sl. 4.9). U manjoj meri se njihovo prisustvo moglo uočiti duž granice između pojedinačnih lobulusa. Mastociti su većinom bili jasno definisanog, pravilnog, ovalnog oblika, sa citoplazmom intenzivno ljubičaste boje. Na uvećanju 400x, citoplazma većine mastocita se karakterisala bogatim sadržajem TB-pozitivnih granulacija, što joj je davalo sitno-granulirani izgled, i kod većine ćelija maskiralo nukleus. Na osnovu morfologije ćelija, u jetri kontrolnih životinja mogla se uočiti predominatnost intaktne subpopulacije mastocita. Kod manjeg broja ćelija je bio primetan određeni stepen narušenog ćelijskog integriteta, odnosno degranuliranosti. Ovakve ćelije su imale izdužen izgled, demaskirano jedro, a u svojoj neposrednoj okolini malobrojne granulacije koje su iz citoplazme oslobođene u ekstracelularni prostor (Sl. 4.9).

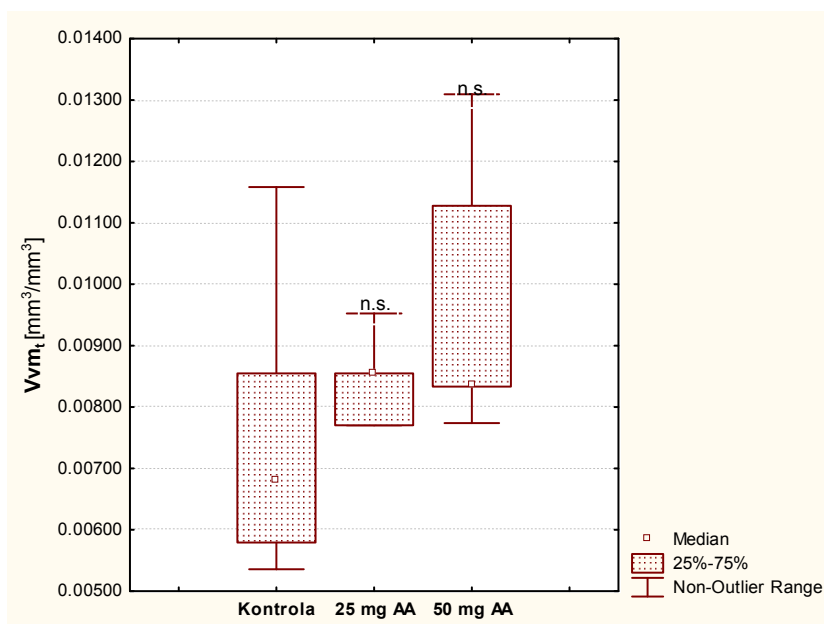
AA25 i AA50. Na uvećanju 100x, mikroskopska analiza preseka jetre pacova iz oba AA tremana je pokazala uvećanje brojnosti mastocita kod obe grupe u odnosu na kontrolu, pri čemu je ono bilo izraženije u grupi tretiranoj sa 25 mg/kg tm AA (Sl. 4.9). Mastociti su se kod obe tretirane grupe nalazili u grupicama i imali tendenciju nakupljanja oko krvnih sudova portalnih trijada i/ili većih krvnih sudova (Sl. 4.9). Na presecima jetre obe tretirane grupe, dominirala je subpopulacija mastocita sa narušenim ćelijskim integritetom i smanjenim sadržajem TB-pozitivnih granulacija u citoplazmi (Sl. 4.9). Analiza preseka na uvećanju 400x pokazala je da je većina ćelija bila u podmaklom procesu degranulacije, odnosno uvećanom stepenu aktivnosti. Mastociti u tretiranim grupama su imali izduženu, vretenastu ili zvezdastu formu, demaskirana jedra i vidno narušen integritet ćelijske membrane, sa brojnim granulacijama koje su se nalazile slobodne u ekstracelularnom prostoru (Sl. 4.9). Aktivirani mastociti koji su egzocitozom

oslobađali veću količinu granulacija su najčešće bili lokalizovani neposredno uz veće krvne sudove.

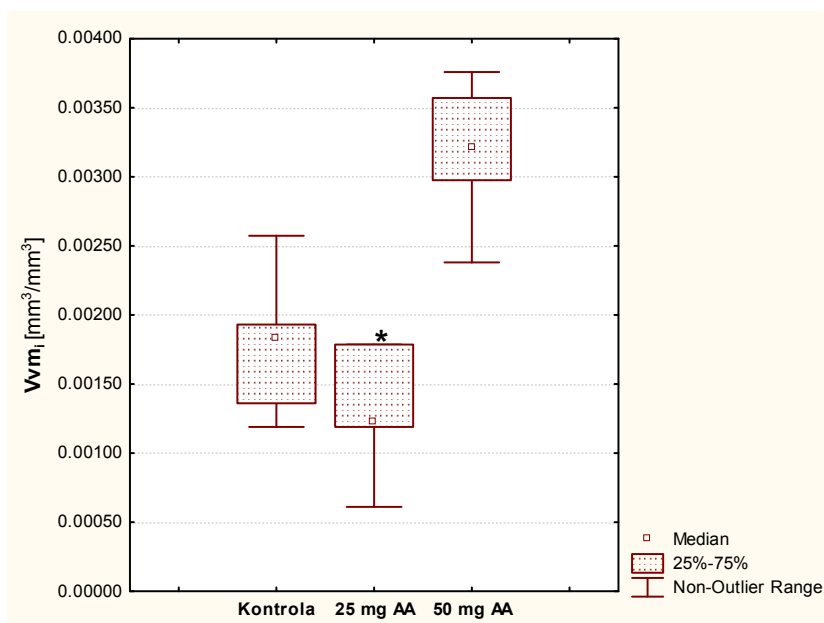


Slika 4.9. Prisustvo mastocita u vezivnom tkivu jetre juvenilnih mužjaka pacova nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. Metahromatski obojene granulacije mastocita se uočavaju na osnovu njihove prominentne ljubičaste obojenosti. a) Kontrola – relativno ujednačena brojnost intaktnih i degranulisanih mastocita; b) AA25 – prominentno povećanje ukupnog broja mastocita u odnosu na kontrolu, posebno njihove degranulisane subpopulacije; c) AA50 – povećanje broja degranulisanih mastocita u odnosu na kontrolu. TB bojenje. Bar: 20 µm.

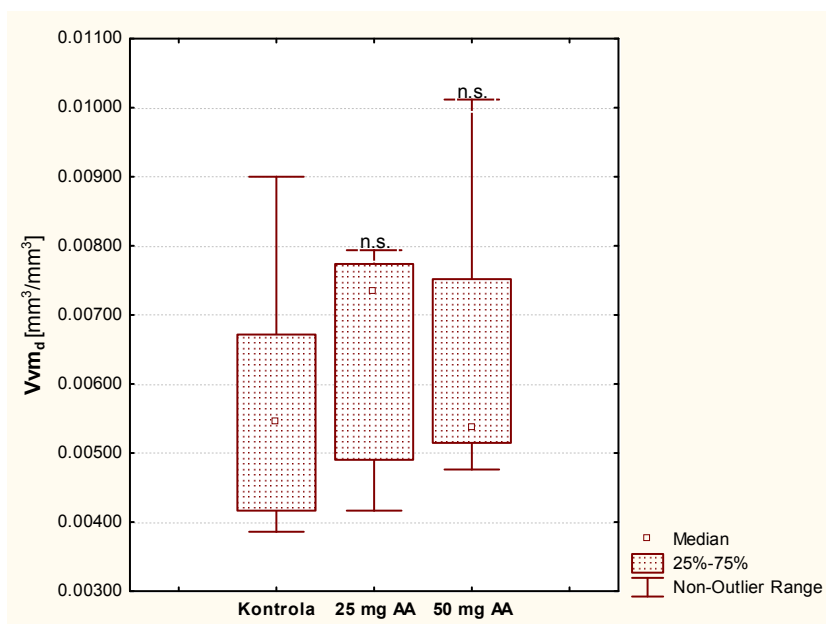
Kvantitativna stereološka analiza je potvrdila histološki nalaz. Oba AA tretmana izazvala su uvećanje brojnosti mastocita i povećanje stepena njihove aktivnosti, odnosno degranulacije u juvenilnoj jetri u odnosu na kontrolu, s tim da je ovo uvećanje bilo izraženije u grupi tretiranoj dozom od 25 mg/kg tm AA. Volumenska gustina ukupnih mastocita (V_{vm_t}) je bila uvećana kod oba tretmana u odnosu na kontrolu (Graf. 4.11) (Tab. 4.5). Volumenska gustina intaktnih mastocita (V_{vm_i}) je bila smanjena u grupi tretiranoj nižom dozom, a uvećana u grupi tretiranoj višom dozom AA u odnosu na kontrolne uzroke. Promene u V_{vm_i} su bile statistički značajne pri međusobnoj komparaciji tretmana AA ($p < 0,05$) (Graf. 4.12) (Tab. 4.5). Volumenska gustina degranulisanih mastocita (V_{vm_d}) je bila uvećana kod oba tretmana u odnosu na kontrolu, pri čemu je to uvećanje bilo prominentnije u grupi tretiranoj nižom dozom AA, ali bez statističke značajnosti (Graf. 4.13) (Tab. 4.5). Numerička gustina ukupnih mastocita (N_{vm_t}) je bila uvećana u oba tretmana, pri čemu se uvećanje u grupi tretiranoj nižom dozom pokazalo statistički značajnim pri komparaciji sa kontrolom ($p < 0,01$) (Graf. 4.14) (Tab. 4.5). Numerička gustina intaktnih mastocita (N_{vm_i}) je bila uvećana kod oba tretmana u odnosu na kontrolu (Graf. 4.15) (Tab. 4.5). Numerička gustina degranulisanih mastocita (N_{vm_d}) je, takođe, bila uvećana kod oba tretmana, ali je to uvećanje bilo prominentnije i statistički signifikantno u grupi tretiranoj nižom dozom u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$) (Graf. 4.16) (Tab. 4.5).



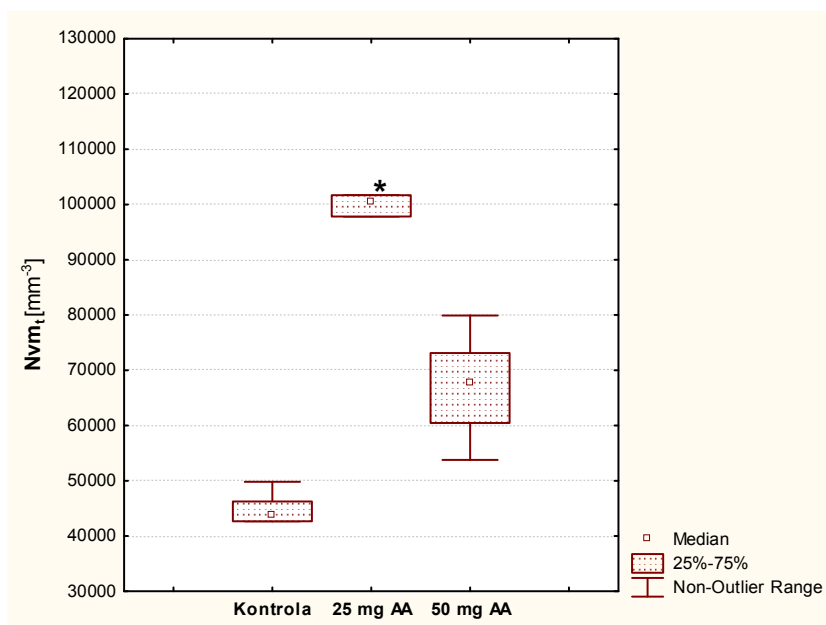
Grafik 4.11. Volumenska gustina ukupnih mastocita (Vvm_t) u jetri juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. n.s. - bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$).



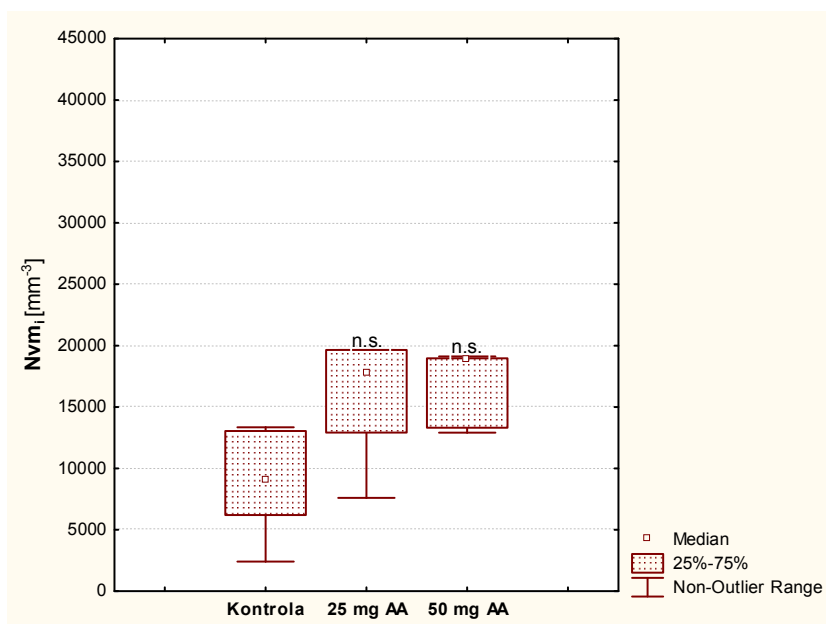
Grafik 4.12. Volumenska gustina intaktnih mastocita (Vvm_i) u jetri juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na grupu tretiranu dozom od 50 mg/kg tm AA ($p < 0,05$).



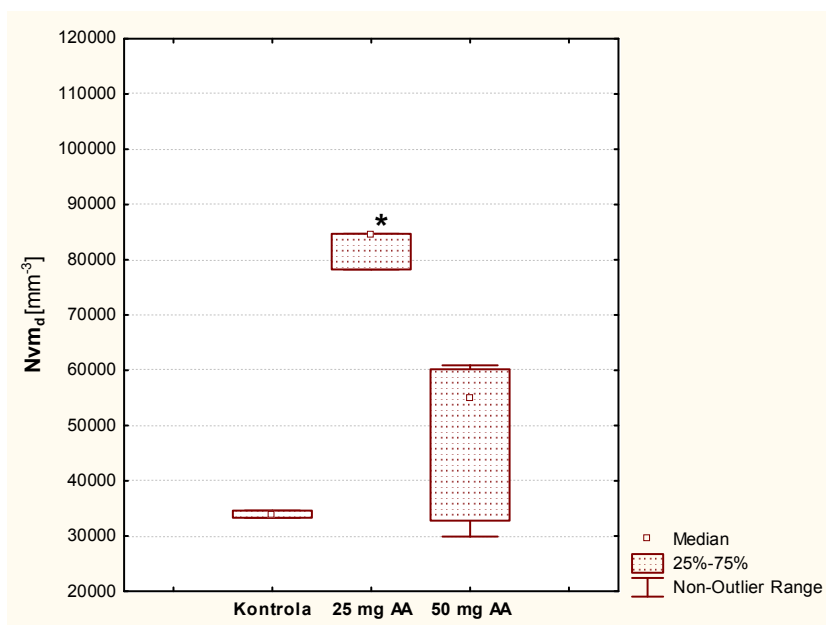
Grafik 4.13. Volumenska gustina degranulisanih mastocita (Vvm_d) u jetri juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. n.s. - bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$).



Grafik 4.14. Numerička gustina ukupnih mastocita (Nvm_t) u jetri juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$).



Grafik 4.15. Numerička gustina intaktnih mastocita (Nvm_i) u jetri juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. n.s. - bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$).



Grafik 4.16. Numerička gustina degranuliranih mastocita (Vvn_d) u jetri juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$).

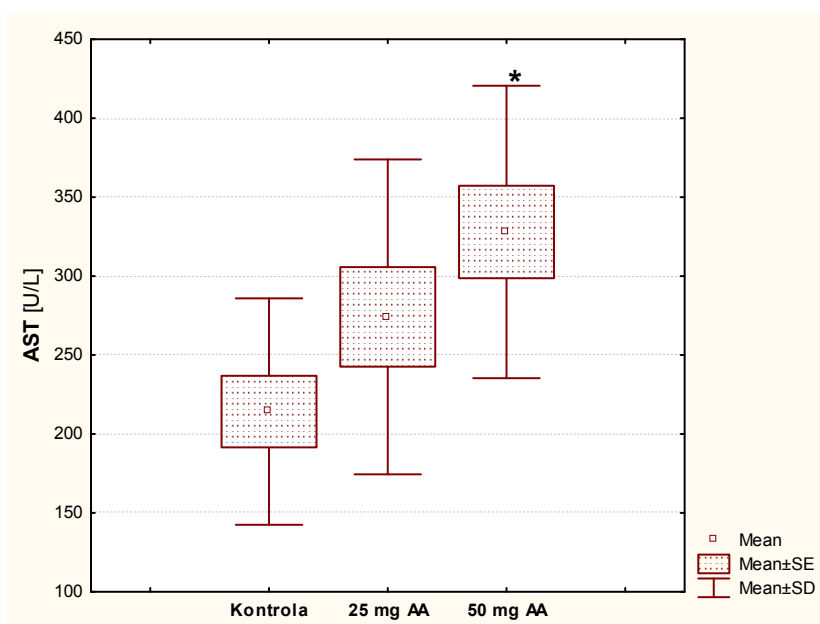
Tabela 4.5. Vrednosti evaluiranih stereoloških parametara za mastocite u jetri kontrolnih i pacova tretiranih AA prikazani su kao vrednosti mediane sa gornjim i donjim kvartilima (u zagradi). Vv predstavlja volumensku, a Nv numeričku gustinu ukupnih (Vv_t ; Nv_t), intaktnih (Vv_i ; Nv_i) i degranulisanih (Vv_d ; Nv_d) mastocita. AA predstavlja akrilamidni tretman.

Stereološki parametar	Kontrola	AA 25 mg/kg tm	AA 50 mg/kg tm
Vv_t [mm^3/mm^3]	0,006802 ^a (0,005792) (0,008547)	0,008547 ^a (0,007703) (0,008547)	0,008365 ^a (0,008333) (0,011278)
Vv_i [mm^3/mm^3]	0,001832 ^{a,b} (0,001361) (0,001931)	0,001221 ^a (0,001190) (0,001786)	0,003217 ^b (0,002976) (0,003571)
Vv_d [mm^3/mm^3]	0,005442 ^a (0,004167) (0,006716)	0,007326 ^a (0,004902) (0,007738)	0,005357 ^a (0,005148) (0,007519)
Nv_t [mm^{-3}]	43577 ^a (42662) (46257)	100550 ^b (97822) (101679)	67741 ^{a,b} (60461) (73116)
Nv_i [mm^{-3}]	8995 ^a (6205) (13048)	17798 ^a (12916) (19643)	18870 ^a (13311) (18970)
Nv_d [mm^{-3}]	33649 ^a (33306) (34592)	84549 ^b (78258) (84694)	54920 ^{a,b} (32793) (60173)

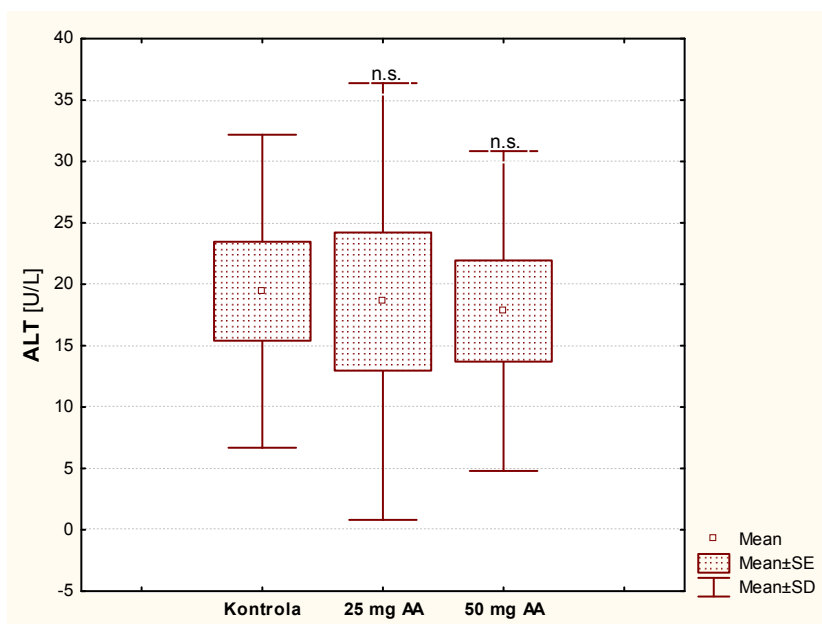
Sve vrednosti mediane označene istim slovom predstavljaju homogene grupe (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

4.7 Serološke analize

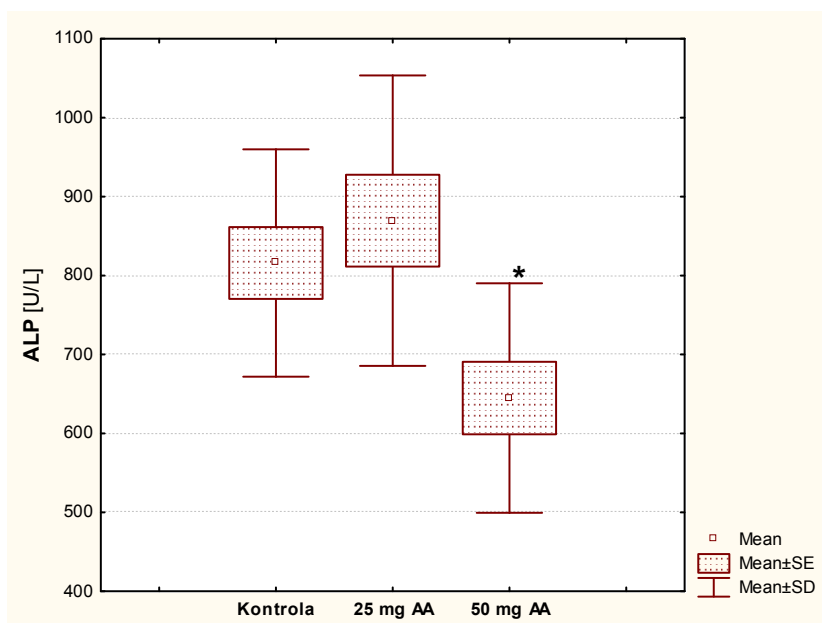
Rezultati serumske analize su pokazali da su oba tretmana AA izazvala promene u aktivnosti ispitivanih enzima (AST, ALT i ALP) u odnosu na njihove izmerene vrednosti kod kontrolnih životinja. Obe tretirane grupe pacova su imale povećanu aktivnost AST u odnosu na kontrolu, pri čemu se povećanje AST aktivnosti u grupi tretiranoj sa 50 mg/kg tm AA pokazalo statistički značajnim ($p < 0,05$) (Graf. 4.17) (Tab. 4.6). Nasuprot tome, kod obe tretirane grupe je zabeležen nesignifikantan pad ALT aktivnosti u odnosu na kontrolnu grupu (Graf. 4.18) (Tab. 4.6). Nivo ALP aktivnosti je bio povećan u grupi tretiranoj sa 25 mg/kg tm AA, a smanjen u grupi tretiranoj sa 50 mg/kg tm AA u odnosu na njen nivo kod kontrolne grupe. Pad aktivnosti ALP u grupi tretiranoj višom dozom AA se pokazao statistički značajnim u odnosu na njenu aktivnost u grupi tretiranoj nižom dozom AA ($p < 0,05$) (Graf. 4.19) (Tab. 4.6). Vrednosti koncentracija ukupnih serumskih proteina nisu pokazale značajnije promene između eksperimentalnih grupa (Graf. 4.20) (Tab. 4.6). Koncentracija CRP je, u odnosu na kontrolu, bila povećana u grupi tretiranoj nižom dozom, a snižena u grupi tretiranoj višom dozom AA. Ipak, zabeležene promene u koncentraciji CRP nisu dostigle nivo statističke značajnosti (Graf. 4.21) (Tab. 4.6).



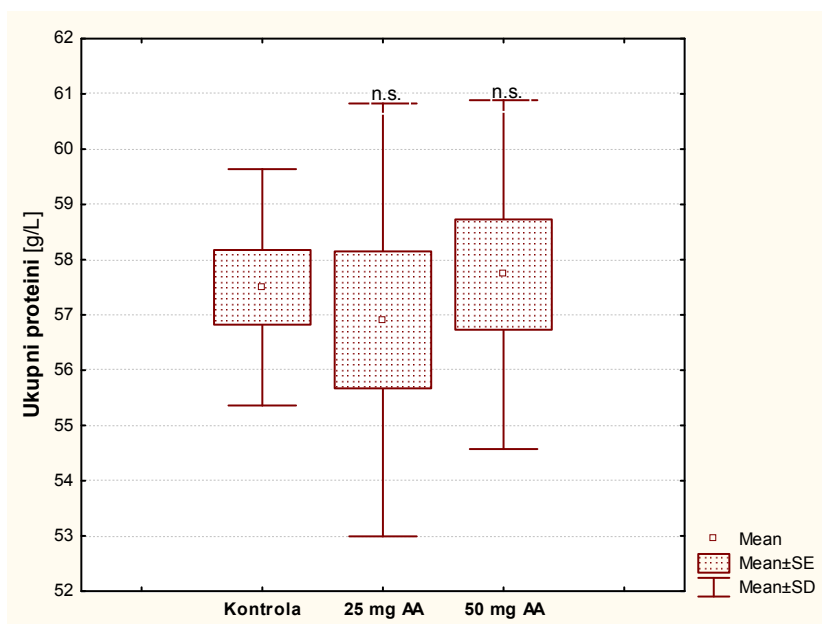
Grafik 4.17. Vrednosti aspartat aminotransferaze (AST) u serumu juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).



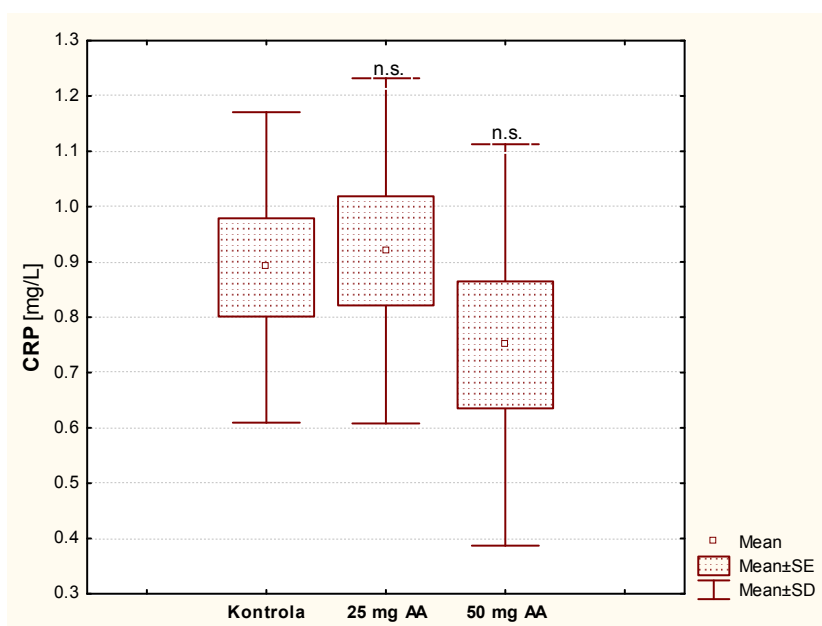
Grafik 4.18. Vrednosti alanin aminotferaze (ALT) u serumu juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. n.s. - bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$).



Grafik 4.19. Vrednosti alkalne fosfataze (ALP) u serumu juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na grupu tretiranu sa dozom od 25 mg/kg tm AA ($p < 0,05$).



Grafik 4.20. Koncentracija ukupnih proteina u serumu juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. n.s. - bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$).



Grafik 4.21. Koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. n.s. - bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$).

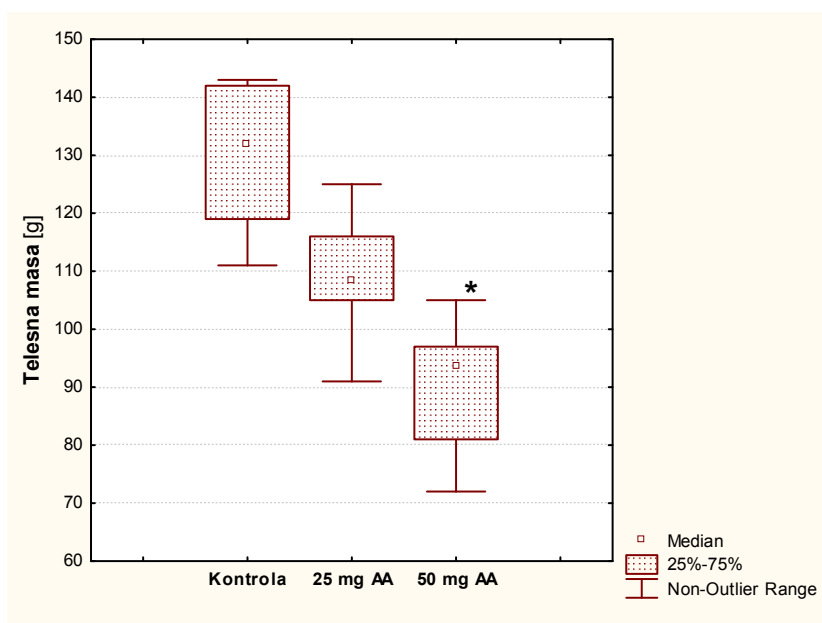
Tabela 4.6. Vrednosti ispitanih biohemijskih parametara: aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP), C-reaktivnog proteina (CRP) i ukupnih proteina; za jetru kontrolnih i pacova tretiranih AA date su kao srednje vrednosti sa standardnom greškom (\pm SE). AA označava akrilamidni tretman.

Parametar	Kontrola	AA 25 mg/kg tm	AA 50 mg/kg tm
AST [U/L]	214,16 \pm 22,68 ^a	274,16 \pm 31,52 ^{a,b}	327,94 \pm 29,29 ^b
ALT [U/L]	19,43 \pm 4,03 ^a	18,59 \pm 5,62 ^a	17,82 \pm 4,11 ^a
ALP [U/L]	815,90 \pm 45,52 ^{a,b}	869,60 \pm 58,17 ^a	644,80 \pm 45,96 ^b
CRP [mg/L]	0.890000 \pm 0.088757 ^a	0.920000 \pm 0.098658 ^a	0.750000 \pm 0.114746 ^a
Ukupni proteini [g/L]	57,50 \pm 0,67 ^a	56,910 \pm 1,23 ^a	57,73 \pm 0,99 ^a

Sve srednje vrednosti označene istim slovom predstavljaju homogene grupe (Bonferroni post-hoc, $p > 0,05$).

4.8 Telesne mase životinja

Gubitak telesne mase usled subhroničnog AA tretmana je bio prisutan kod obe grupe tretiranih pacova u odnosu na kontrolne životinje. Pored toga, merenjem telesnih masa životinja na početku, tokom i na kraju eksperimenta kod pacova tretiranih AA zabeležen je kontinuirani zaostatak na dobijanju telesne mase u odnosu na kontrolne pacove, kod kojih je telesna težina bila u konstantnom porastu. Telesne mase životinja, izmerene 24 h nakon poslednjeg tretmana AA, odnosno neposredno pre njihovog žrtvovanja, su prikazane u Tab. 4.7. Gubitak telesne mase životinja u grupi tretiranoj dozom od 50 mg/kg tm AA je bio veoma izražen i pokazao se statistički značajnim u odnosu na kontrolu i grupu tretiranu dozom od 25 mg/kg tm AA (obe pri $p < 0,001$) (Graf. 4.22) (Tab. 4.7).



Grafik 4.22. Telesne mase juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih dozom od 25, odnosno 50 mg/kg tm AA. *Statistički značajno u odnosu na kontrolu i grupu tretiranu dozom od 25 mg/kg tm AA ($p < 0,001$).

Tabela 4.7. Telesne mase pacova kontrole i grupa tretiranih AA, izmerene 24 h nakon poslednje aplikovane doze, prikazane su kao vrednosti mediane sa gornjim i donjim kvartilima (u zagradi). AA označava akrilamidni tretman.

	Kontrola	AA 25 mg/kg tm	AA 50 mg/kg tm
Telesna masa [g]	132,00 ^a (119,00) (142,00)	108,50 ^a (105,00) (116,00)	93,50 ^b (81,00) (97,00)

Sve vrednosti mediane označene istim slovom predstavljaju homogene grupe (Kruskal-Wallis, $p > 0,001$).

Pored svih prethodno navedenih promena, takođe je važno napomenuti da je tokom eksperimenta kod obe grupe pacova tretiranih AA primećeno prisustvo simptoma neurotoksičnosti, koji su posebno bili izraženi kod grupe tretirane većom dozom AA. Pacovi tretirani dozom od 25 mg/kg tm AA ispoljavali relativno blage znakove oštećenja nervnog sistema i najvećim delom su se manifestovali kroz sporiju motoriku. Doza od 50 mg/kg tm AA je kod pacova izazvala poteškoće u održavanju ravnoteže, nemogućnost koordinacije pokreta zadnjih ekstremiteta, dok je kod nekih primećena i potpuna paraliza zadnjih udova. Ove životinje su bile lošeg opšteg zdravstvenog stanja, što se između manifestovalo i gubitkom dlake u manjem stepenu.

Diskusija

V DISKUSIJA

Danas je AA, u manjoj ili većoj meri, postao neizbežna komponenta svakodnevnog načina ishrane. Rizik od zdravstvenih posledica koje sa sobom nosi svakodnevni unos AA putem hrane značajno je uvećao interes naučne i stručne javnosti, te inicirao brojna istraživanja i javne diskusije na ovu temu (FAO/WHO, 2002). Na osnovu do sada objavljenih studija, prisustvo AA može kompromitovati zdravstvenu bezbednost pojedinih prehrambenih namirnica. Uzimajući u obzir savremeni tempo života i prehambene navike društva, pored interesa za AA i njegove potencijalno štetne posledice po zdravlje ljudi, istovremeno se osmišljaju strategije eliminisanja i/ili redukcije njegovog nivoa u namirnicama.

Postoje razlike u stepenu izlaganja pojedinih delova društva monomerima AA, pa je važno odrediti da li i koliki faktor rizika predstavlja određeni unos AA po zdravstveno stanje date zajednice, tj. dela populacije. Brojne studije su izdvojile decu i omladinu kao deo društva čije prehrambene navike karakteriše povećani unos AA u odnosu na odrasle (FAO/WHO, 2002; Dybing i sar., 2005; JECFA, 2005; Erkekoğlu i Baydar, 2010). Iako još uvek nije poznato da li i u kom stepenu je organizam mladih osoba podložniji toksičnim efektima AA. Opasnost od potencijalno štetnih manifestacija po zdravlje beba i dece izazvanih povećanom konzumacijom hrane bogate AA dodatno naglašava potrebu društva za detaljnim uvidom u sve biološke efekte ovog molekula.

Nakon oralne konzumacije, AA se veoma efikasno distribuira do svih tkiva u organizmu, što se pripisuje njegovom visokom stepenu hidrosolubilnosti i reaktivnosti (Dearfield i sar., 1988). Podjednako efikasno se distribuira i GA, koji je produkt oksidacije AA u hepatocitima i po svojoj prirodi predstavlja još reaktivniji i štetniji molekul (Sumner i sar., 1992; 1997). Oba molekula poseduju potencijal za izazivanje toksičnih efekata putem interakcija sa vitalnim komponentama ćelije, od esencijalnih enzima i proteina, do DNK (Shipp i sar., 2006; Baum i sar., 2008). Izuzev eritrocita, u kojima je zabeležena akumulacija AA i GA, kod ostalih tkiva ovaj efekat nije pokazan (Dejongh i sar., 1999; Kirman i sar., 2003; Dybing i sar., 2005).

Efekti AA na različite organe životinja bili su predmet brojnih istraživanja. Studije koje se odnose na dužinu izlaganja AA, njegovu biorasplošivost i dozno-zavisne posledice kako kod ljudi, tako i kod životinja, često imaju kontradiktorne rezultate. Većina istraživanja je sprovedena na adultnim životinjama i/ili izolovanim ćelijama, odnosno ćelijskim kulturama (Burek i sar., 1980; Awad i sar., 1998). Manji broj studija se bavio ispitivanjem efekata AA

na juvenilnim životinjama (Allam i sar., 2010; Rawi i sar., 2012). Kod pacova koji su u ranim fazama adultnog doba tretirani AA bili su prisutni efekti neurotoksičnosti i genotoksičnosti (Tyl i sar., 2000). Pretpostavlja se da bi metabolizam AA mogao biti uslovljen starošću i/ili polom organizma. Ukoliko bi to bio slučaj, i oni bi se mogli uvrstiti među relevantne faktore koji bi figurisali prilikom evaluacije rizika od štetnih zdravstvenih posledica nastalih kao rezultat izlaganja AA.

Podaci o efektima AA na jetru najvećim delom se baziraju na molekularnim ispitivanjima glavnih enzima koji učestvuju u metabolizmu AA i ukazuju da bi AA, kao i njegov metabolit, GA, mogli indukovati efekat hepatotoksičnosti i kancerogenosti (Yousef i El-Demerdash, 2006). AA ima potencijal da indukuje pad nivoa GSH u hepatocitima i time ih učini podložnim oštećenjima izazvanim oksidativnim stresom (Tong i sar., 2004; Kurebayashi i Ohno, 2006). GSH čini važnu komponentu glavnog antioksidativnog sistema ćelije (Zhang i sar., 2010), pri čemu nivo GSH u ćeliji može značajno modulirati citotoksičnost datog ksenobiotika i njegov efekat na preživljavanje ćelije (Kurebayashi i Ohno, 2006). Narušavanjem antioksidativnog odbrambenog sistema ćelije, AA bi potencijalno ostvarivao efekte citotoksičnosti i genotoksičnosti (Zhang i sar., 2008). Prema tome, oksidativni stres bi mogao biti dominantan način kojim AA remeti funkcionalnost hepatocita, a time i jetre. Uticaj AA na druge tipove ćelijskih populacija prisutnih u jetri, između ostalog i na ćelije imunog sistema, kao što su Kupffer-ove ćelije ili mastociti, nije poznat. Postoje indicije o imunosupresivnom efektu AA kod ljudi i životinja, obzirom da je zabeleženo da smanjuje težinu slezine, timusa i mezenteričnih limfnih čvorova, smanjuje brojnost populacije cirkulišućih limfocita, može odložiti reakciju hipersenzitivnosti, i supresuje ćelijski i humoralni imunitet (Zaidi i sar., 1994).

Promene na jetri koje se mogu javiti na višem nivou organizacije, kao što su nivo tkiva ili organa, usled metabolisanja AA, ispitane su u manjoj meri. Histološki nalazi nekoliko studija rađenih na eksperimentalnom modelu pacova sugerišu potencijalno hepatotoksičan efekat AA kako na ćelijskom, tako i na nivou tkiva jetre (El-Bohi i sar., 2011; Rawi i sar., 2012). Imajući na umu da jetra predstavlja centralni organ u metabolizmu AA, definisanje svih potencijalno štetnih efekata koje ovaj molekul ili produkti njegove biotransformacije mogu izazvati na ovom organu, jeste od velikog interesa. Značaj ovakvih istraživanja posebno je naglašen ukoliko se radi o štetnim posledicama koje ovaj molekul može izazvati na jetri mladog organizma.

U ovom istraživanju, rezultati histološke analize jetre i njenih biohemijskih svojstava kod juvenilnih mužjaka pacova, tretiranih dozama od 25 ili 50 mg/kg tm AA, 5 puta nedeljno, tokom 3 nedelje, ukazuju da obe doze mogu poremetiti svojstva kako njenog parenhima, tako i njenih neparenhimskih ćelija. Nalazi, takođe, sugerišu da bi reakcija jetre na AA mogla zavisiti od doze, ali i kapaciteta jetre da vrši efikasnu biotransformaciju i eliminaciju AA. Naime, neke studije ukazuju da jetra adultnog organizma može biti efikasnija u metabolisanju toksičnih i/ili kancerogenih hemikalija od jetre juvenilnih pacova (Behroozikha i sar., 1992).

Obe primenjene doze AA, u našem istraživanju, dovele su do narušavanja homeostaze parenhimskih i neparenhimskih ćelija, a to se manifestovalo promenama na nivou njihovih mikrostrukturnih i biohemijskih karakteristika, uz potencijal da se sa ćelijskog prenesu na nivo tkiva, a zatim i organa. Trend većine zabeleženih promena sugeriše na njihov dozno-zavisni karakter. Ipak, kod pojedinih promena takav trend nije uočen. Na bazi dostupnih podataka o štetnim posledicama AA na nivou ćelije, najverovatniji mehanizam koji posreduje nastanku zabeleženih promena u jetri, nakon relativno kratkog perioda intoksikacije životinja ovim molekulom, je stvaranje „adukata“ AA i/ili GA sa esencijalnim ćelijskim komponentama, kao što su proteini i enzimi, i izazivanje oksidativnog stresa u ćeliji.

Histološka analiza preseka jetre obojenih H&E metodom kod obe grupe životinja tretiranih AA u ovom istraživanju nije pokazala veće strukturne i morfološke promene u odnosu na kontrolne uzorke. Opšta strukturno-funkcionlna organizacija jetre, kao što je građa lobulusa, centralne vene i periportalnog regiona ostala je očuvana kod sve tri eksperimentalne grupe. Nasuprot tome, kvantitativna stereološka analiza je zabeležila mikrostrukturne promene na hepatocitima i sinusoidnim prostorima kod obe grupe tretiranih životinja u odnosu na kontrolu. Oba tretmana AA su izazvala uvećanje volumenske gustine hepatocita, njihovih nukleusa i citoplazme (Tab. 4.1), uz istovremeno smanjenje volumena sinusoidnih prostora u odnosu na kontrolu (Tab. 4.1). Linearno povećanje volumena parametara vezanih za hepatocite, kao i linearno smanjenje volumena sinusoida, sugeriše da ovakve promene mogu imati dozno-zavisni karakter (Tab. 4.1).

Ranija istraživanja su pokazala da oštećenje ćelija može biti izazvano toksičnim supstancama i da je najčešće praćeno povećanjem ćelijskog volumena (Smith i Orrenius, 1984). Poznato je da molekul AA poseduje bipolarnu hemijsku karakteristiku koje mu omogućavaju interakciju sa hidrofilnim i hidrofobnim komponentama plazma membrane

(Chinoy i Memon, 2001). Zahvaljujući ovoj osobini, AA može izmeniti strukturu ćelijske membrane, utičući time i na promenu njene permeabilnosti (Chinoy i Memon, 2001).

Pretpostavlja se da bi AA putem izazivanja oksidativnog stresa i remećenjem metabolizma lipida i proteina mogao izazvati strukturne promene na jetri pacova u razvoju (Allan i sar., 2010). Značajno redukovanje GSH nivoa u ćelijama čini ćelije osetljivim za oksidativna oštećenja, koje vodi progresivnom narušavanju strukture makromolekula, ćelijskog integriteta i, potencijalno, izaziva ćelijsku smrt (Reed, 1994; Kurose i sar., 1997; Kurebayashi i Ohno, 2006). Ukoliko bi nivo raspoloživog GSH drastično opao, ili bi čak došlo do njegovog nedostatka usled intoksikacije AA, hepatociti juvenilnih životinja bi pored gubitka kapaciteta za dalju biotransformaciju AA u derivate merkapturične kiseline, mogli trpeti posledice i po samu ćelijsku vijabilnost. Redukovanje nivoa GSH doprinosi narušavanju funkcionalnosti mitohondrija i membrane hepatocita kao barijere (Kurose i sar., 1997), pa bi pad nivoa GSH u hepatocitima, izazvan AA, uz nastanak oksidativnog stresa, mogao narušiti balans između života i smrti ćelije (Tong i sar., 2004). Pored toga, zabeleženo je da jetra mladih pacova soja Wistar (starosti 24 ± 5 dana) u normalnim fiziološkim uslovima sadrži oko 57% zaliha GSH prisutnog kod adultnih jedinki (starosti oko 3-4 meseca) (Allameh i sar., 1997). Dakle, kapacitet jetre za održavanje diskretnog balansa između efikasnog metabolisanja AA i neutralisanja njegovih oksidativnih svojstava u velikoj meri može odrediti da li će i u kom stepenu toksičnost AA doći do izražaja prvo u jetri, a kasnije i celom organizmu.

Oksidativni stres izazvan AA postaje izraženiji pri većim dozama ovog monomera (Yousef i El-Demerdash, 2006). Pokazano je da aktivnost enzima GST u humanim hepatocitima raste sa porastom doze AA, a pri koncentraciji od 5 mM AA dostiže plato (Awad i sar., 1998). Paralelno sa tim, katalitičkom aktivnošću enzima CYP2E1 formiraće se GA, čija štetnost po ćelije prevazilazi onu koja se pripisuje AA. Rezultati nekih studija ukazuju da AA može inhibisati GST, čime bi se indirektno favorizovao proces bioaktivacije AA, odnosno povećalo stvaranje GA (Dixit i sar., 1981; 1984; Srivistava i sar., 1986). Međutim, utvrđena je inverzna zavisnost između epoksidacije AA u GA i doze AA (Bergmark i sar., 1991; Calleman i sar., 1992). Kod pacova se sa povećanjem oralne doze AA, njegova konverzija u GA odvija u manjem stepenu (Young i sar., 2007). Naime, pri višim dozama AA javlja se saturacija njegove oksidativne biotransformacije (Calleman i sar., 1992; Gamboa da Costa i sar., 2003), pošto se formiranje GA odvija po reakciji koju karakteriše Michaelis-Menten kinetika (Kurebayashi i Ohno, 2006). Takođe je nađeno da nivo aktivnosti

CYP2E1 enzima u *in vitro* uslovima opada pri ≥ 10 mM AA (Awad i sar., 1998), odnosno da AA ujedno inhibiše aktivnost enzima koji vrši njegovu biotransformaciju. U skladu s tim, ishod bi mogla biti predominacija molekula AA nad molekulima GA u ćeliji. Vezivanje AA za GSH je, takođe, reakcija koju karakteriše saturacija, što značajno utiče na koncentraciju slobodnog AA dostupnog za reakcije sa drugim ćelijskim makromolekulima, i moglo bi objasniti ne-linearne dozno-zavisne reakcije i kinetiku kod pojedinih DNK oštećenja (Dourson i sar., 2008). Pokazano je da se konjugacija pojedinih toksikanata sa GSH, kao u slučaju acetaminofena (paracetamola), odvija efikasnije kod mlađih u odnosu na adultne životinje (Allameh i sar., 1997), što bi značilo da se nivo GSH za isti vremenski interval brže troši u juvenilnoj jetri u odnosu na adultnu. Sve navedeno bi doprinelo nagomilavanju slobodnih molekula AA i GA u hepatocitima, pa bi oštećenja enzima, ćelijske membrane, efekti na lipidnu peroksidaciju i oštećenja DNK bili neizbežni. Konačno, interakcije sa enzimima, i uopšte, ćelijskim proteinima koje AA ostvaruje mogu biti osnova njegovog mehanizma toksičnosti (Shipp et al, 2006; Baum et al, 2008).

Prema tome, povećanje volumena hepatocita u obe grupe životinja tretiranih AA, posebno njihove citoplazme (Tab. 4.1), upućuje na promene u transportu vode u ćeliji, narušen integritet plazma membrane, i može biti pokazatelj remećenja funkcionalnog kapaciteta hepatocita (Tab. 4.1). Dozno-zavisno smanjenje volumena sinusoidnih kapilara u obe grupe tretirane AA sugeriše na poremećaj lobularne mikrocirkulacije, odnosno smanjenog dotoka krvi što bi dodatno doprinelo narušavanju funkcionalnosti hepatocita, posebno onih u pericentralnom regionu (Tab. 4.1). Dakle, oksidativni stres, kao jedan od najverovatnijih efekata toksičnosti AA, mogao bi narušiti funkcionalni integritet hepatocita, što bi u kombinaciji sa smanjenim dotokom krvi u lobulus, moglo voditi ishemiji i konačno, nastanku nekrotičnih promena u parenhimu jetre.

Ovi nalazi su konzistentni sa studijom gde su mladi pacovi tretirani dozom od 15 mg/kg tm AA, tokom 28 dana, što je izazvalo degenerativne promene na hepatocitima, a kod pojedinih su bili detektovani i znakovi apoptoze (Rawi i sar., 2012). Veenapani i sar. (2010) su zabeležili strukturne promene u jetri adultnih mužjaka pacova, uključujući degenerativne promene, prisustvo hiperplastičnih i binuklearnih hepatocita, kao i promene u sinusodima, što je posebno bilo uočljivo pri dozama ≥ 24 mg AA. Takođe, tretman adultnih mužjaka pacova dozama od 50 ili 100 mg/kg tm AA, tokom 21 dana, na jetri je izazvao dozno-zavisna oštećenja kao što su nekrotične i degenerativne promene u nekim hepatocitima, degenerativne promene na Kupffer-ovim ćelijama, proliferaciju epitela žučnih kanala, mestimičnu dilataciju

ili opstruiranost krvnih sudova i pojavu edema u nekim periportalnim regionima, kao i infiltraciju limfocita (El-Bohi i sar., 2011). Vodeći se time, zabeležene mikrostrukturne promene u lobulusima jetre životinja tretiranih AA mogu biti indikator narušene homeostaze, koja bi neizbežno imala posledice po normalno odvijanje fizioloških procesa u jetri.

Smanjena količina deponovanog glikogena u hepatocitima životinja tretiranih dozom od 25 mg/kg tm AA u odnosu na kontrolu sugerise na uvećan utrošak energije i/ili smanjenu sintezu glikogena (Sl. 4.2) (Tab. 4.2). Redukovana količina glikogena može biti rezultat preusmeravanja ćelijskog metabolizma ka efikasnijoj biotransformaciji AA preko mobilizacije veće količine GSH i povećanja aktivnosti GST. Pokazano je da AA stimuliše hepatocite na oslobađanje GSH u cilju zaštite ovih ćelija od toksičnih molekula (Veenapani i sar., 2010). Ukoliko bi odgovor hepatocita na intoksikaciju AA bio intenziviranje konjugacije AA sa GSH, tada bi to neizostavno podrazumevalo i mobilisanje raspoloživih energetskih resursa u ćeliji. Smanjenje glikogena posebno u periportalnim zonama lobulosa (Sl. 4.2) (Tab. 4.2), može se objasniti činjenicom da periportalni hepatociti prvi dolaze u kontakt sa najvećom količinom toksičnih molekula koji putem cirkulacije dospevaju u jetru. Smanjenje glikogenskih rezervi može delimično biti pripisano i razgradnji glikogena u molekule glukoze kako bi se održala njena adekvatna koncentracija u krvi. Naime, glukoza koja se skladišti u formi glikogena u hepatocitima, predstavlja glavni izvor za regulaciju nivoa glukoze u krvnoj plazmi (Michalopoulos, 2007). Kod pacova je uočena pozitivna korelacija između administracije AA i povećanja serumskog nivoa glukoze (Rawi i sar., 2012). Doza od 15 mg/kg tm AA je kod juvenilnih ženki i mužjaka pacova, tokom četvoronedeljnog tretmana, izazvala rast serumskog nivoa glukoze, koncentracije ukupnih lipida, ukupnog holesterola i uree (Rawi i sar., 2012). Redukciji glikogenskih rezervi moglo bi doprineti i remećenje mikrocirkulacije lobulosa, izazvano smanjenim volumenom sinusoida. Naime, u uslovima ishemije se smanjenjuje depo glikogena, što je najviše izraženo u perifernim zonama lobulosa gde su inače fiziološke rezerve manje (Vuković, 1994). Finalni ishod redukovane količine glikogena u hepatocitima bi vodio nedostatku energetskih rezervi za podršku metaboličkih reakcija, što bi moglo voditi i ćelijskoj smrti (Gerlach i sar., 1963).

Akumulacija glikogenskih granulacija u hepatocitima životinja tretiranih dozom od 50 mg/kg tm AA u odnosu na kontrolu (Sl. 4.2; 4.3), sugerise na poremećaj u metabolizmu ovog ugljenog hidrata i na narušen funkcionalni status hepatocita. Naime, oštećenje hepatocita i/ili promena u membranskoj permeabilnosti može se manifestovati akumulacijom glikogena (Ramaiah, 2007). Takođe, nagomilavanje glikogena, odnosno glukoze u ćelijama, smatra se

indikatorom oksidativnog stresa (Ramaiah, 2007), gde većina proteina u ćeliji može postati disfunkcionalna, i time narušiti fiziologiju hepatocita. Akumulacija glikogena u hepatocitima sama po sebi može biti toksična za ćelije i tkiva (Zhang i sar., 2010), pa bi pored potencijalne primarne hepatotoksičnosti, AA mogao izazvati i efekat sekundarne toksičnosti posredovane negomilavanjem glikogena. Nakupine granula su bile posebno uočljive u ćelijama pericentralne i središnje zone lobulusa i često zauzimale celu citoplazmu hepatocita (Sl. 4.2; 4.3). Hepatociti ova dva regiona imaju veću količinu glukokinaze, enzima koji promoviše glikogenezu, u odnosu na periportalne ćelije, i u njima se depo glikogena sporije stvara, ali i sporije troši (Gebhardt, 1992; MacSween i sar., 2002). Pojedini hepatociti pericentralnog regiona pored akumuliranog glikogena, u svojoj citoplazmi su imali vakuolama-slične formacije nepoznatog karaktera. S druge strane, izraženo smanjenje glikogena u periportalnim hepatocitima (Sl. 4.2) uslovljeno je položajem ovih ćelija u odnosu na krvotok lobulusa, ali i narušenom mikrocirkulacijom lobulusa (Vuković, 1994). Hepatociti periportalnog regiona karakterišu se najvećom ekspresijom enzima glukoza-6-fosfataze, koja razgrađuje glikogen, i najvećim nivoom GSH u odnosu na hepatocite ostala dva regiona lobulusa (Gebhardt, 1992; MacSween i sar., 2002), pa je očekivano da one budu metabolički najangažovanije u eliminisanju AA koji dolazi u jetru krvotokom.

Kod ljudi je pokazano da AA može smanjiti nivo insulina u krvi, a pretpostavlja se i da može redukovati stepen rezistentnosti jetre na insulin (Lin i sar., 2009), pa bi se i ovo moglo odraziti na količinu glikogena u hepatocitima. Insulinska rezistentnost ćelije je povezana sa narušenom propagacijom signala nastalih aktivacijom insulinskog receptora, inače membranskog receptora iz grupe tirozin kinaza (Shulman, 2000). Pokazano je da se insulinska rezistenost i ekspresija CYP2E1 enzima u hepatocitima međusobno nalaze u pozitivnoj korelaciji (Schattenberg i sar., 2005). Naime, povećana ekspresija CYP2E1 enzima u hepatocitima „redukuje“ insulinski signaling i povećava insulinsku rezistenost jetre (Schattenberg i sar., 2005; Leclercq i sar., 2007). U ćelijskim linijama hepatocita, prekomerna ekspresija CYP2E1 enzima dovodi do izmenjene fosforilacije tirozinskih i serinskih aminokiselinskih ostaka na proteinima IRS-1 i IRS-2 (engl. *insulin receptor substrate 1 i 2*; IRS-1, IRS-2). Pomenuti proteini (IRS-1 i IRS-2), u normalnim uslovima, interaguju sa insulinskim receptorom nakon što se za njega veže insulin i esencijalni su za dalji prenos signala kompleksnim sistemom adapternih i signalnih proteina, koji će u jetri rezultovati skladištenjem glukoze u formi glikogena, inhibicijom glikogenolize i glukoneogeneze, i preveniranjem oslobađanja glukoze u krvotok (Leclercq i sar., 2007). Izmenjeni tip

fosforilacija, koji se javlja pri prekomernoj ekspresiji CYP2E1 enzima, dovodi do terminacije prenosa signala od insulinskog receptora ka efektornim molekulima, pa se signalni put prekida i time izostaju pomenuti efekti (Schattenberg i sar., 2005). Obzirom da AA smanjuje ekspresiju i aktivnost CYP2E1 enzima (Tareke i sar., 2002; El-Bohi i sar., 2011), insulinska rezistentnost hepatocita bi mogla biti umanjena, što bi doprinelo deponovanju glukoze u vidu glikogena.

Prilikom tumačenja rezultata histološke analize o količini glikogena u jetri koja je prethodno fiksirana u formalinu, što je bio slučaj i u našem eksperimentu, potrebno je uzeti u obzir činjenicu da se ovakvom fiksacijom ne fiksiraju ugljeni hidrati, odnosno glikogen, u ćelijama (Carson i Hladik, 2009). Međutim, ovaj fiksativ vrši stabilizaciju i fiksiranje proteina na takav način da glikogen u najvećoj meri biva „zarobljen“ u ćelijama (Carson i Hladik, 2009). Prema tome, bojenje preseka jetre PAS metodom, nakon fiksiranja tkiva u 10% neutralom puferisanom formalinu, omogućuje kompariranje depoa glikogena u jetri tretiranih u odnosu na netretirane životinje. Obzirom da tretman nekom toksičnom supstancom može uticati na sintezu proteina u jetri, količina glikogena koja biva zadržana u ćelijama može zavisiti od količine ćelijskih proteina, koji podležu fiksaciji formalinom. Shodno tome, na indirektan način, relativna kvantifikacija glikogena, bi ujedno mogla dati indicije o razlici u sintezi i/ili količini proteina u hepatocitima eksperimentalnih životinja. U skladu sa tim, moguće je pretpostaviti da je u hepatocitima pacova tretiranih nižom dozom AA došlo do redukcije u sintezi proteina, a u hepatocitima pacova tretiranih višom dozom, do njihove povećane sinteze. Ovo bi korespondiralo sa nalazom proliferativnih karakteristika jetre u svakoj od grupa, obzirom da nalaz imunopozitivnosti jetre na marker Ki-67 može, u određenoj meri, pružiti uvid u promene vezane za sintezu proteina.

Ćelijska proliferacija, kao odgovor jetre na oštećenje, uvek je u zavisnosti od razmera tog oštećenja (Zhou i sar., 2006). Proces regeneracije jetre se može pokrenuti nakon delimične hepatektomije ili usled povrede tkiva i podrazumeva aktivaciju brojnih signalnih molekula i transkripcionih faktora (Fausto i sar., 2006; Michalopoulos i DeFrances, 2005). Ipak, kod pojedinih oboljenja jetre, uprkos oštećenju tkiva, proliferativni potencijal parenhima može se smanjivati kako bolest napreduje, kao što je to slučaj sa cirozom (Delhaye i sar., 1996; Clouston i sar., 2005; Lunn i sar., 2005). Kod pacijenata sa dijagnostikovanim cirozom jetre, koja je izazvana konzumiranjem alkohola, regeneracija jetre je supresovana i korelira sa smanjenjem aktivacije transkripcionog faktora STAT3 (engl. *Signal transducer and activator of transcription 3*) (Horiguchi i sar., 2007). Postojeći nalazi o uticaju AA na proliferaciju

hepatocita imaju nekonzistentne rezultate (Lafferty i sar., 2004; Bowyer i sar., 2008a,b; Veenapani i sar., 2010).

U ovoj studiji, redukcija proliferativnih karakteristika, evaluiranih posredstvom Ki-67 markera, u jetri pacova tretiranih dozom od 25 mg/kg tm AA u odnosu na kontrolu, ukazuje na remećenje njenog regenerativnog potencijala kao posledice tretmana (Sl. 4.4) (Tab. 4.3). Ovo korespondira sa nalazima Bowyer i sar. (2008a,b) gde je pokazano da AA može 5-40 puta smanjiti stepen proliferacije parenhima u tireoidnoj žlezdi, adenohipofizi i jetri. Istraživanja su pokazala da stepen sinteze proteina, ujedno i nivo GSH opada nakon ekspozicije neuroblastoma ćelija monomeru AA (Odland i sar., 1994). U hepatocitima pacova, nakon tretmana sa 50 ili 100 mg/kg tm AA tokom 21 dana, javlja se poremećaj sinteze iRNK, sinteze proteina i „izlazak“ proteina van ćelija, što sugerise na narušenu strukturu i integritet ćelijske membrane (El-Bohi i sar., 2011). Prema rezultatima studije Veenapani i sar. (2010), AA može indukovati oštećenja hepatocita već pri dozi ≥ 24 mg. Prema tome, niža doza (25 mg/kg tm AA) primenjena u ovom istraživanju može biti svrstana u donji granični nivo potencijalno štetnih doza, pa je mogla narušiti homeostazu hepatocita. Nadalje, ključni enzim za metaboličku konverziju AA u GA je CYP2E1, pri čemu AA ujedno i redukuje njegovu ekspresiju u hepatocitima (El-Bohi i sar., 2011). Povećana ekspresija CYP2E1 enzima u hepatocitima pacova, koja je rezultat njihovog izlaganja etanolu, smatra se važnim faktorom hepatokancerogeneze (Ye i sar., 2012). Pretpostavlja se da ovaj enzim, verovatno preko oksidativnog stresa, posreduje inicijaciji inflamatornog odgovora, ćelijskoj proliferaciji i redukovanju apoptoze koja se vezuje za hepatokancerogenezu (Ye i sar., 2012). Inhibicijom CYP2E1 enzima smanjuje se ekspresija TNF- α , aktivacija NF- κ B, oksidativno oštećenje DNK i proliferacija ćelija (Ye i sar., 2012). Činjenica da AA može redukovati ekspresiju i aktivnost CYP2E1 enzima (El-Bohi i sar., 2011) može biti jedan od razloga uočenog smanjenja regenerativnog potencijala jetre, koji se manifestovao padom brojnosti mono i binuklearnih hepatocita pozitivnih na Ki-67 protein (Tab. 4.3). Obzirom da je u ovoj grupi zabeležena smanjena količina glikogena, za očekivati je da bi smanjena količina raspoloživih energetske resursa ugrozila odvijanje metaboličkih procesa, izazvala smanjenu sintezu proteina i narušila regenerativnu sposobnost juvenilne jetre.

Povećana proliferacija parenhima jetre kod pacova tretiranih dozom od 50 mg/kg tm AA u odnosu na kontrolu, i grupu tretiranu nižom dozom (Sl. 4.4) (Tab. 4.3), ukazuje na intenzivan proces regeneracije parenhima. Pimenjena doza AA od 50 mg/kg tm je izazivanjem oksidativnog stresa mogla značajno oštetiti ćelijski integritet hepatocita i

poremetiti njihovu funkcionalnost, sa potencijalnom mogućnošću blokiranja metaboličkih funkcija ovih ćelija. U uslovima kada intracelularna koncentracija GSH padne ispod 10-15% od inicijalne, preostali GSH nije raspoloživ za zaštitu ćelije od oksidativnog oštećenja (Reed, 1994). Obzirom da je nalaz Allameh i sar. (1997) pokazao da juvenilna jetra pacova raspolaže manjom količinom GSH u odnosu na adultnu, moguće je da nivo GSH, ali i aktivnost GST i CYP2E1 enzima nisu bili dovoljni za efikasno metabolisanje i neutralisanje AA. U skladu sa tim, prisustvo slobodnog AA u citoplazmi hepatocita bi dovelo do oksidativnog stresa, što bi vodilo prominentnom biohemijskom disbalansu i blokadi ćelijskih procesa. Nadalje, značajno oštećenje hepatocita bi zahtevalo obnovu parenhima novim, funkcionalno sposobnim ćelijama. Proliferacija hepatocita je bila dominantno lokalizovana u periportalnom regionu (Sl. 4.5) (Tab. 4.3), što može biti objašnjeno lokalizacijom ovih ćelija u odnosu na cirkulaciju, odnosno da se ove ćelije prve susreću sa toksinima iz krvi i prve podležu oštećenjima. S druge strane, ove ćelije su ujedno najmanje izložene nedostatku nutrijenata u uslovima limitirane snabdevenosti lobulusa krvlju, što im omogućava da prve u najvećoj meri zadovolje sve neophodne zahteve za pokretanje i odvijanje regenerativnih procesa.

Moguće je pretpostaviti da je u jetri ove grupe životinja formirana veća količina GA u odnosu drugu tretiranu grupu, obzirom da se radi o većoj dozi AA. Imajući u vidu veću reaktivnost GA i veći afinitet za molekul DNK u odnosu na AA, količina formiranog GA bi mogla uticati na stepen replikacije DNK (Bolt, 2003; Friedman, 2003; Tyl i Friedman, 2003). Promene u mitozu i povećana pojava hiperplastičnih i binuklearnih hepatocita je pokazana pri tretmanu mužjaka pacova AA u dozama ≥ 12 mg (Veenapani i sar., 2010). Nasuprot tome, nalaz Lafferty i sar. (2004) sugeriše da AA ispoljava selektivni efekat na DNK sintezu u pojedinim tkivima. Tako je subhronični tretman adultnih mužjaka pacova dozom od 15 mg/kg tm AA u tireoidnoj žlezdi, testistima i adrenalnoj meduli doveo do povećanja sinteze DNK, dok je u jetri i adrenalnom korteksu ovaj efekat izostao (Lafferty i sar., 2004). Ni u jednom od ispitivanih tkiva nije pokazan poremećaj mitoze ili pojava apoptoze (Lafferty i sar., 2004). Razlog zabeleženih promena, kao i njihov mehanizam, koji doprinosi povećanom stepenu replikacije DNK kod jednih u odnosu na druga tkiva, još uvek nije razjašnjen.

Akumulacija glikogena (Tab. 4.2) u kombinaciji sa najvećim volumenom hepatocita i njihove citoplazme (Tab. 4.1) ukazuju da je u grupi životinja tretiranih višom dozom AA došlo do značajnog stepena oštećenja parenhima jetre u odnosu na grupu tretiranu nižom dozom AA. Poznato je da hepatociti imaju veliku moć regeneracije (Michalopoulos, 2007), kao i da se proliferacija hepatocita javlja u uslovima kada su oni izloženi stresu (Kahn i sar.,

1988). U skladu sa tim, jedan od načina za saniranje novonastalih oštećenja parenhima mogao biti pokretanje regenerativnih procesa što se odrazilo uvećanim prisustvom mono i binuklearnih hepatocita pozitivnih na Ki-67 protein (Tab. 4.3). Snabdevanjem organa novim hepatocitima, punog kapaciteta za procese detoksifikacije, jetra juvenilnog organizma bi kompenzovala oštećenja izazvana AA i GA.

Jedan of potencijlanih faktora koji može doprineti proliferaciji hepatocita je i insulin, budući da ovaj hormon, preko kontrole ćelijskog ciklusa, promovisanja anti-apoptotskih signala i sinteze proteina, učestvuje u kontroli sinteze proteina, ćelijskog rasta, proliferacije, preživljavanja i diferencijacije (Leclercq i sar., 2007). Prethodna istraživanja sugerišu da AA može izazvati promene u nivou insulina i glukoze u krvi, ali i modulirati senzitivnost jetre na ovaj hormon (Schattenberg i sar., 2005; Leclercq i sar., 2007; Lin i sar., 2009; Rawi i sar., 2012). Moguće je pretpostaviti bi se u uslovima AA-indukovane smanjene rezistencije jetre na insulin (Lin i sar., 2009), koja korelira sa smanjenom ekspresijom CYP2E1 enzima (Schattenberg i sar., 2005), uz povećano deponovanje glikogena, mogla javiti i povećana ćelijska proliferacija. Dakle, povećanje imunopozitivnosti hepatocita na marker Ki-67 u ovoj grupi životinja bi se moglo posmatrati i indirektno, preko efekata koje insulin ostvaruje na jetri, a koji bi u uslovima njene povećane insulinske senzitivnosti bili dodatno naglašeni. Obzirom da su periportalni hepatociti izloženi najvećim koncentracijama insulina, njegov proliferativni efekat najviše bi bio izražen u ovom regionu, što korespondira sa prisustvom najveće imunopozitivnosti hepatocita na marker Ki-67 u ovom regionu.

Kod obe grupe pacova tretiranih AA pokazan je pad imunopozitivnosti parenhima jetre na marker apoptoze, Caspase 3, u odnosu na kontrolu (Sl. 4.6) (Tab. 4.4). Kaspaze su poznate i kao ICE-slične proteaze (engl. *interleukin 1 β -converting enzyme-like; ICE-like protease*), i ključni su medijatori apoptoze (Porter i Jänicke, 1999). Procesi apoptoze često obuhvataju aktivaciju ove tzv. proteaze „smrti“ koja katališe specifično isecanje ključnih ćelijskih proteina (Porter i Jänicke, 1999). Aktivacija Caspase 3 se može odvijati signalnim putevima koji mogu biti zavisni i nezavisni od otpuštanja citohroma c iz mitohondrija i Caspase 9 (Porter i Jänicke, 1999). Caspase 3 je ključna za karakteristične promene u ćelijskoj morfologiji i biohemijskim svojstvima koje su povezane sa izvršavanjem i kompletiranjem procesa apoptoze (Porter i Jänicke, 1999). Veoma je važna za nastanak tipičnih „obeležja“ apoptoze, i neizostavna je komponenta u procesima kondenzacije hromatina i DNK fragmentacije kod svih tipova ćelija u kojima je inicirana apoptoza (Porter i Jänicke, 1999). Kod sisara su kaspaze, posebno Caspase 3, uključene u kaskadnu reakciju proteaza koje vode neadekvatnoj

aktivaciji ili brzom razdruživanju (engl. *dissassembling*) ključnih strukturnih proteina i enzima važnim za signaling, regulaciju ćelijske homeostaze i popravke (Nicholson i Thornberry, 1997). Dakle, Caspase 3 je esencijalan enzim za procese vezane za razgradnju ćelije i formiranje apoptotičkih tela, ali može biti aktivna i u procesima pre ili tokom procesa kojima se determiniše pokretanje procesa za gubitak ćelijske vijabilnosti (Porter i Jänicke, 1999).

Nalazi ove studije sugerišu da parenhim jetre ni na jednu od aplikovanih doza AA nije reagovao pokretanjem programirane ćelijske smrti hepatocita. Zhang (2009) je pokazano da AA u kombinaciji sa kukuruznim uljem može dovesti do inhibicije ćelijske apoptoze i stimulacije ćelijske proliferacije u mukozi debelog creva kod pacova. Naime, pomenuti tretman životinja je doveo do povećanja ekspresije Bcl-2, smanjenja ekspresije Bax, inhibicije otpuštanja citohroma c iz mitohondrija u citosol i redukcije nivoa i aktivnosti Caspase 3 (Zhang, 2009). Prema nekim istraživanjima, AA pokazuje veći potencijal ka izazvanju degenerativnih i nekrotičnih promena u parenhimu jetre, kao što je to bio slučaj u tretmanu mužjaka pacova dozom od 50 ili 100 mg/kg tm AA, tokom 21 dana, gde je uočena granuliranost citoplazme i karioliza pojedinih hepatocita (El-Bohi i sar., 2011). Prisustvo oštećenja u formi tamnih mrlja, nekroze i krvarenja je primećeno u jetri mužjaka pacova kojima je davana hrana u kombinaciji sa 7% recikliranog ulja koje sadrži AA (Totani i sar., 2006; Totani i Ojiri, 2007a). Dakle, prema do sada raspoloživim podacima, tendencija AA ka indukciji apoptoze u hepatocitima ima slabiju naučnu podršku naspram njegovog potencijala za izazivanje nekroze, čemu govore u prilog i rezultati našeg istraživanja.

Histološka analiza Kupffer-ovih ćelija i mastocita u obe grupe pacova tretiranih AA je zabeležila promene u broju i funkcionalnosti ovih ćelija, uz indicije da toksičnost AA može biti podjednako ili više izražena na nivou neparenhimskih populacija ćelija kao i na nivou parenhima, odnosno hepatocita.

Kod obe grupe pacova tretiranih AA, u ovom eksperimentu, zabeležena je smanjena imunopozitivnost Kupffer-ovih ćelija na marker CD68 u odnosu na kontrolu (Sl. 4.7; 4.8) (Tab. 4.5), kao i uvećana imunopozitivnost neparenhimskih ćelija na Caspase 3 (Sl. 4.6) (Tab. 4.4), posebno u ćelijama koje prema morfologiji i lokalizaciji u sinusoidima odgovaraju Kupffer-ovim ćelijama. Kupffer-ove ćelije predstavljaju rezidentne makrofage jetre, vode poreklo od monocita i pripadaju mononukleusno fagocitnom sistemu (Anđelković i sar., 2002). Ova ćelijska populacija ima važnu ulogu u normalnim fiziološkim reakcijama i održavanju homeostaze jetre, kao i pri njenim akutnim i hroničnim reakcijama na toksične

supstance (Roberts i sar., 2007). Kupffer-ove ćelije su aktivno angažovane u otklanjanju štetnih materija i produkata njihove biotransformacije iz jetre (Roberts i sar., 2007). Predstavljaju primarni izvor signala „toksičnosti“ koje oslobađaju u reakciji na intoksikaciju jetre hemijskim supstancama, i ujedno čine dodatnu kariku u sveukupnom odgovoru hepatocita, i jetre kao organa, na primljene signale „toksičnosti“ (Roberts i sar., 2007). Marker CD68 je transmembranski glikoprotein čije je prisustvo karakteristično za zrele Kupffer-ove ćelije (AbD Serotec, Kidlington, UK). CD68 može imati ulogu u fagocitotičkim aktivnostima tkivnih makrofaga, kako u intracelularnom lizozomalnom metabolizmu, tako i u ekstracelularnim interakcijama između ćelija ili ćelija i patogena. Ovaj glikoprotein se vezuje za lektine ili selektine, koji su ekspresovani na ćelijama i/ili tkivima, čime se omogućava dolazak makrofaga na određeno mesto u tkivu i/ili organu. Brza recirkulacija CD68 iz endozoma i lizozoma na plazmamebranu omogućava makrofazima da se kreću preko određenog supstrata ili ćelija koji nose selektine (www.abcam.com).

Aktivacija Kupffer-ovih ćelija toksikantima, na direktan ili indirektan način, ima za posledicu otpuštanje velikog broja inflamatornih medijatora, faktora rasta i reaktivnih kiseoničnih vrsta (kiseoničnih radikala), kojima se moduliše akutno oštećenje hepatocita, ali i hronično oboljenje jetre kao što je kancer (Roberts i sar., 2007). Prema novim saznanjima, Kupffer-ove ćelije su medijatori u razvoju hepatotoksičnosti, pa je rasvetljavanje njihove uloge u indukciji oštećenja hepatocita od esencijalne važnosti za razumevanje mehanizama koji vode oštećenju jetre (Roberts i sar., 2007).

Pretpostavlja se da je oštećenje jetre, nastalo kao posledica hronične konzumacije etanola, modulirano aktivacijom Kupffer-ovih ćelija. Pojedini negenotoksični kancerogeni mogu aktivirati Kupffer-ove ćelije, a one otpuštanjem citokina i/ili reaktivnih kiseoničnih radikala mogu indukovati proliferaciju hepatocita, povećati klonalnu ekspanziju preneoplastičnih ćelija koje će voditi nastanku neoplazije (Roberts i sar., 2007). Pretpostavlja se da Kupffer-ove ćelije mogu pružiti podršku u prvim fazama razvoja kancera u jetri. Studije na miševima su zabeležile da supstance koje iniciraju DNK sintezu i proliferaciju ćelija u jetri (lipopolisaharid bakterija; LPS), ostvaruju slabiji efekat ukoliko se simultano inicira apoptoza Kupffer-ovih ćelija (Roberts i sar., 2007).

Postojeći podaci o ulozi Kupffer-ovih ćelija u akutnoj hepatotoksičnosti ukazuju da one pored protektivne uloge, mogu posredovati i u oštećenju tkiva jetre. Inhibicija Kupffer-ovih ćelija ili smanjenje njihove brojnosti štiti od oštećenja jetre koje izazivaju: alkilujućí agens

melfalan (Kresse i sar., 2005), mikotoksin fumonisin B1 (He i sar., 2005), industrijska hemikalija tioacetamid (Andres i sar., 2003) i imunostimulansi: concanavalin A i egzotoksin *Pseudomonas*-a (Schumann i sar., 2000).

Kupffer-ove ćelije mogu doprineti oštećenju jetre tokom ishemije, koja je praćena reperfuzijom (ponovnim uspostavljanjem dotoka krvi) (Tsung i sar., 2005). Nasuprot tome, smanjenje broja Kupffer-ovih ćelija povećava stepen oštećenja tkiva jetre koje je prethodno već bilo izazvano parcijalnom hepatektomijom (Prins i sar., 2004), što sugeriše na njihovu zaštitnu ulogu u ovom stanju.

Na osnovu navedenog, moguće je zaključiti da toksini, posredstvom Kupffer-ovih ćelija, mogu ostvariti i/ili dodatno povećati svoj štetni efekat, dok u stanju parcijalne hepatektomije ovi makrofazi imaju protektivnu ulogu. Međutim, kod hepatotoksičnosti izazvane acetaminofenom tj. paracetamolom, Kupffer-ove ćelije mogu doprineti oštećenju tkiva jetre (Laskin i sar., 1986; Michael i sar., 1999; Ito i sar., 2003), ali mogu i štititi od nastanka hepatocelularnog oštećenja (Ju i sar., 2002). U ovom slučaju, Kupffer-ove ćelije mogu biti primarno mesto inicijalnog, protektivnog odgovora na acetaminofen (paracetamol), ali se daljom stimulacijom, reakcija ovih ćelija odvija na način da izaziva oštećenje tkiva (Roberts i sar., 2007).

Mehanizmi preko kojih Kupffer-ove ćelije učestvuju u akutnom ili hroničnom oštećenju jetre i kancerogenezi, mogu varirati, ali su najčešće posredovani oslobađanjem medijatora Kupffer-ovih ćelija, kao što su citokini (tumor nekrosis faktor alfa; TNF- α) i interleukini, reaktivni kiseonični radikali, reaktivni azotni molekuli (engl. *nitrogen species*), proteaze i lipidni metaboliti (prostaglandini, tromboksani) (Roberts i sar., 2007). Ovi medijatori mogu delovati direktno na hepatocite, izazivajući njihovu ćelijsku smrt ili indirektno, aktivacijom drugih ćelija. TNF- α predstavlja signal za preživljavanje hepatocita, ali postaje potentan signal „smrti“ ukoliko dođe do inhibicije sinteze proteina u ćeliji (West i sar., 1999). Medijatori iz Kupffer-ovih ćelija mogu voditi aktivaciji stelatnih ćelija i izazvati kontrakciju sinusoida u lobulusu (Kharbanda i sar., 2004), što će usloviti zadržavanje neutrofila. Kontrakcija sinusoida je preduslov za migraciju neutrofila u parenhim jetre, promovisanu ekspresijom adhezionih molekula na endotelnim ćelijama sinusoida, koje su prethodno već aktivirane medijatorima oslobođenim iz Kupffer-ovih ćelija (Roberts i sar., 2007). Medijatori koji aktiviraju stelatne ćelije, doprinose aktivaciji neutrofila, koji za uzvrat mogu oštetiti hepatocite oslobađanjem proteaza i drugih faktora (Mavier i sar., 1988; Harbrecht i sar., 1993;

Ganey i sar., 1994; Ho i sar., 1996). Dakle, oslobađanje medijatora Kupffer-ovih ćelija, usled izlaganja jetre nekoj hemijskoj supstanci, može pokrenuti niz reakcija i procesa koje inicijalno mogu stimulisati preživljavanje ćelija i zaštitu tkiva, ali kontinuirano izlaganje ili izlaganje većim dozama date supstance, ovi medijatori mogu dovesti do oštećenja ovog organa (Roberts i sar., 2007).

Obzirom da ova populacija ćelija prva reaguje na toksikante koji ulaze u jetru cirkulacijom, smanjenje imunopozitivnosti Kupffer-ovih ćelija na marker CD68 u našim tretmanima (Sl. 4.7; Sl. 4.8) (Tab. 4.5) ukazuje na pad njihove funkcionalnosti i sposobnosti fagocitoze, a time sugeriše na toksično delovanje AA. Istovremeno, uvećanje imunopozitivnosti Kupffer-ovih ćelija na Caspase 3 (Sl. 4.6) (Tab. 4.4) je pokazatelj pokretanja apoptoze, i mogao bi biti jedan od mehanizama toksičnosti AA. Ovi nalazi koreliraju sa nalazom degenerativnih promena Kupffer-ovih ćelija u jetri pacova nakon njihovog subhroničnog tretmana AA (El-Bohi i sar. 2011). Prema nekim studijama, AA ima imunosupresivni efekat (Zaidi i sar., 1994), pa bi ovim nalazom taj efekat imao dodatnu potvrdu. Konačno, moguće je pretpostaviti da populacija neparenhimskih ćelija poseduje manje efikasne mehanizme i kapacitet otpornosti na toksikante, u odnosu na parenhim jetre, obzirom na funkcije koje on vrši.

Uzimajući sve navedeno u obzir, gubitak Kupffer-ovih ćelija, usled intoksikacije AA, bi mogao inicijalno delovati protektivno na vijabilnost i funkcionalnost hepatocita (Roberts i sar., 2007 pri dozi od 25 mg/kg tm AA, ali ne nužno i pri dozi od 50 mg/kg tm AA. Takođe, ukidanje medijatora poreklom iz ovih ćelija bi moglo umanjiti proliferativni potencijal hepatocita (Roberts i sar., 2007), što je pokazano u grupi tretiranoj dozom od 25 mg/kg tm AA. Ipak, poznato je da su Kupffer-ove ćelije angažovane pri otkanjanju štetnih materija i njihovih metabolita iz jetre (Roberts i sar., 2007), pa bi njihova smanjenjena funkcionalnost mogla voditi nagomilavanju štetnih produkata metabolizma. Ovo bi moglo bitno ugroziti strukturno-funkcionalni integritet hepatocita. U takvoj situaciji bi povećana proliferacija hepatocita bila jedna od mogućih reakcija parenhima jetre, koja je i pokazana kod pacova tretiranih dozom od 50 mg/kg tm AA.

Mastociti spadaju u populaciju neparenhimskih ćelija jetre, i u njoj su prisutni kako u normalnim tako i u patološkim uslovima (Farrell i sar., 1995). Oni predstavljaju lutajuće ćelije vezivnog tkiva, vode poreklo od prekursora smeštenih u kosnoj srži, i primarno su poznati po svom aktivnom participiranju u alergijskim reakcijama i reakcijama hipersenzitivnosti (da

Silva i sar., 2014). Pored imunomodulatorske uloge, mastociti aktivno učestvuju u održavanju integriteta i funkcije tkiva (da Silva i sar., 2014). Akumulacija mastocita u jetri dovodi se u vezu sa različitim oboljenjima ovog organa (Farrell i sar., 1995). Novija istraživanja ukazuju na njihovu potencijanu ulogu u različitim patofiziološkim stanjima koja se karakterišu povećanim stvaranjem ekstracelularnog matriksa, čime se povećava rizik of nastanka i razvoja fibroze različitih organa (Bradding i Holgate, 1999; Abd-El-Aleem i sar., 2005).

Mastociti se, kod glodara, dele u dve velike grupe: mastociti vezivnog tkiva, u čijim glikozaminoglikanskim granulama dominira heparin; i mastociti mukoznih membrana, lokalizovani u digestivnom i respiratomom traktu, u čijim glikozaminoglikanskim granulama dominira hondroitin-sulfat (Chan i sar., 2001; da Silva i sar., 2014). U jetri pacova je identifikovana subpopulacija mastocita koja je fenotipski heterogena i ne može biti svrstana ni u mukozne niti u mastocite vezivnog tkiva, obzirom da poseduje svojstva koja su prethodno pripisivana nezrelim mastocitima, a odnose se na sastav pojedinih triptaza i himaza (Chan i sar., 2001). Postojanje različitih tipova mastocita je ustanovljeno i kod čoveka (Metcalf i sar., 1997), ali su generalno podeljeni na bazi sadržaja njihovih granulacija, i to na mastocite koji sadrže himaze, triptaze i karboksipeptidaze i mastocite koji u svojim granulama sadrže samo triptaze (Irani i sar., 1986; da Silva i sar., 2014). Važno je napomenuti da su maturacija, fenotip i funkcija mastocita direktna posledica njihovog lokalnog mikrokruženja (da Silva i sar., 2014).

Mastociti mogu biti aktivirani različitim stimulusima posredstvom receptora na svojoj površini, a priroda i intenzitet reakcije može značajno zavisiti od unutrašnjih faktora ili faktora mikrokruženja, koji menjaju ekspresiju ili funkcionalnost receptora na membrani i/ili signalnih molekula koji učestvuju pri samom odgovoru mastocita (Galli i sar., 2005b; Metcalf i sar., 2009). Najbolje istražen način aktivacije mastocita jeste aktivacija posredovana IgE receptorom visokog afiniteta u alergijskim reakcijama, koje su deo adaptivnog (specifičnog) imunog sistema (Galli i sar., 2005a). Kao ćelije urođenog (nespecifičnog) imunog sistema, mastociti mogu rano i brzo prepoznati invaziju mikroorganizama kao što su bakterije, paraziti, gljivice i virusi (Marshall, 2004). Dodatno, mastociti mogu biti aktivirani od strane drugih stimulusa, kao što su neuropeptidi, citokini, faktori rasta, toksini, komplement, imuni kompleksi, fizički stimulusi, određeni lekovi, lektini i sl. (Tkaczyk i sar., 2004; Gilfillan i sar., 2009; da Silva i sar., 2014).

Aktivirani mastociti mogu oslobađati širok spektar medijatora, koji mogu biti svrstani u 3 klase:

- a. medijatori koji su prethodno sintetisani i uskladišteni u formi citoplazmatskih granula (histamin, heparin, serotonin, dopamin, himaze, triptaze, karboksipeptidaze, neki citokini: TNF- α , različiti faktori rasta);
- b. neoformirani (lipidni) medijatori nastaju iz molekula ćelijske membrane (derivati arahidonske kiseline poznati kao eikosanoidi: leukotrijeni, prostaglandini i tromboksani);
- c. neosintetisani medijatori stvaraju se nakon aktivacije mastocita, koja vodi transkripcionoj aktivaciji, čija regulacija zavisi od tipa stimulusa i specifičnog receptora koji posreduje u aktivaciji (anti-inflamatorni citokini: TGF- β , IL-10, proinflamatorni citokini: IL-4, IL-5, IL-6, IL-1, IL-2, IL-3, IL-12, IL-18, TNF- α ; i hemokini: CCL5, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2) (da Silva i sar., 2014).

Mastociti aktivno učestvuju u procesima važnim za održavanje homeostaze tkiva i organa (da Silva i sar., 2014). Oslobađanjem medijatora poput: NGF (engl. *nerve growth factor*), PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*), VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), FGF (engl. *fibroblast growth factor*), histamina i triptaza, mastociti indukuju proliferaciju epitelnih ćelija i fibroblasta (Abe i sar., 2000). Učestvuju u reparaciji tkiva, od inicijalnih koraka inflamacije do remodeliranja ekstracelularnog matriksa (Noli i Miolo, 2001). Sekretijom PAF (engl. *platelet activating factor*), leukotrijena, citokina IL-1 i IL-8, doprinose aktivaciji i agregaciji trombocita i ekstracelularnoj depoziciji fibrina. S druge strane, sekretijom heparina, triptaze i t-plazminogena regulišu mehanizme fibrinolize omogućavajući adekvatnu perfuziju i ishranu koji su neophodni za reparativne procese (Huang i sar., 1997; Thomas i sar., 1998). U kasnim fazama reparacije, mastociti posredstvom citokina IL-1, IL-4 i IL-6 uz faktore rasta (FGF i TGF) utiču na fenotip aktiviranih fibroblasta indukujući pojavu miofibroblasta, važnih za kontrakciju i zarastanje rana (Hebda i sar., 1993; Moulin i sar., 1998).

Naš tretman AA kod obe grupe pacova je izazvao uvećanje broja mastocita u odnosu na kontrolne životinje, koja je posebno bila uočljiva uvećanim prisustvom njihove degranulisane subpopulacije (Sl. 4.9) (Tab. 4.5). Imajući na umu veliki broj biološki aktivnih molekula koje sintetišu i sekretuju, mastociti imaju potencijal da promovišu proliferaciju ćelija, učestvuju u angiogenezi i remodeliranju ekstracelularnog matriksa, što ih kvalifikuje kao potencijalno

važne aktivne učesnike u procesima koji vode oštećenju jetrinog parenhima, kao i njegovom kasnijem remodeliranju i regeneraciji (Farrell i sar., 1995). Prema Jeong i sar. (2005), prisustvo mastocita u jetri pacova tokom fibroze jetre je proporcionalno stepenu njenog oštećenja. Pokazano je da aktivaciju mastocita mogu izazvati određeni toksini i lekovi (Tkaczyk i sar., 2004; Gilfillan i sar., 2009; da Silva i sar., 2014). U skladu sa tim, histološki nalaz mastocita sugeriše da je uvećana migracija i aktivnost mastocita u jetri rezultat metaboličkih promena, narušene homeostaze i potencijalnog oštećenja u tkivu jetre nastalih subhroničnom intoksikacijom pacova AA. Mastociti mogu promovisati mobilizaciju cirkulišućih leukocita koji doprinose uklanjanju mikrobiološkog i tkivnog debrisa (Kanwar i Kubes, 1994). Pokazano je da tretman pacova dozom od 100 mg/kg tm AA može izazvati infiltraciju jetre mononuklearnim ćelijama kako u portalnim regionu, tako i u okolnom intersticijelnom tkivu (El-Bohi i sar., 2011). Imajući na umu potencijalnu hepatotoksičnost AA, sam molekul AA i/ili oštećeno tkivo jetre bi mogli pokrenuti promene u broju i aktivnosti mastocita koji bi kako sopstvenim angažovanjem, tako i posredovanjem u hemotaksiji leukocita u jetru, doprineli uklanjanju oštećenih segmenata ćelija i tkiva i doprineli njihovom oporavku. Neke studije ističu važnost interakcije između mastocita, makrofaga i miofibroblasta u mikrokruženju zahvaćenom inflamacijom (Jeong i sar., 2005). Gubitak funkcionalnosti Kupffer-ovih ćelija, rezidentnih makrofaga jetre, mogao bi dodatno usloviti potrebu da angažovanjem i mobilizacijom mastocita zbog narušenog mikrokruženja izazvanog AA tretmanom.

Pored toga, smanjen dotok krvi, nastao kao posledica smanjenog volumena sinusoida, može biti dodatan razlog za uvećanom infiltracijom i aktivnošću mastocita u jetri, budući da su ove ćelije poznate po svom angažovanju u regulaciji vazodilatacije krvnih sudova. Naime, oslobađanjem svojih biološki aktivnih molekula (posebno histamina, molekula sa vazodilatatornim delovanjem; i heparina, kao antikoagulansa), mastociti bi mogli uticati na diskretne promene u lobularnoj mikrocirkulaciji i tako doprineti ublažavanju potencijalno štetnih posledica nastalih kao rezultat ishemije (da Silva i sar., 2014). Pored toga, istraživanja su pokazala da mastociti posredstvom angiogenih medijatora kao što su: angiopoetin-1, FGF-2, VEGF, IL-8, TGF- β , TNF- α , histamin, hepatin, triptaze i himaze mogu značajno angiogenezi, dinamičnom procesu kome je svojstven razvoj i rast krvnih sudova (Crivellato i sar., 2004; da Silva i sar., 2014). S druge strane, blago smanjenje brojnosti mastocita u grupi pacova tretiranih višom dozom u odnosu na grupu tretiranu nižom dozom AA (Sl. 4.9) (Tab. 4.5), sugeriše na određen stepen imunosupresivnog delovanja AA, i može biti u funkciji

aplikovane doze. Prethodno je pokazano da AA ostvaruje imunosupresivni efekat, pa tako smanjuje brojnost populacije cirkulišućih limfocita, odlože reakciju hipersenzitivnosti, i supresuje ćelijski i humoralni imunitet (Zaidi i sar., 1994). Prema tome, zabežen pad brojnosti i aktivnosti mastocita u grupi tretiranoj višom dozom AA u odnosu na grupu tretiranu nižom dozom, mogao bi biti pokazatelj imunosupresivnog efekta AA i na ovu ćelijsku populaciju imunog sistema.

Biohemijske, odnosno serološke analize se često primenjuju u okviru toksikoloških studija i predstavljaju veoma senzitivnan i relevantan metod pri evaluaciji funkcionalnog statusa nekoliko organa, a neretko i kompletnog organizma. Adekvatan odabir biohemijskih parametara može pružiti uvid u funkcionalna svojstva jetre. Prilikom evaluacije oštećenja jetre mogu se koristiti: enzimi markeri oštećenja plazma membrane hepatocita, gde usled narušenog integriteta plazmaleme, enzimi izlaze (engl. *enzyme leakage*) iz ćelije (npr. AST, ALT); enzimi markeri opstrukcije žučnih puteva (npr. ALP); indikatori funkcionalnog deficita jetre (promene u sintezi serumskih proteina: albumina, faktora koagulacije, glukoze, triglicerida, ukupnog bilirubina, žučnih kiselina, amonijaka, uree i sl.) (Ramaiah, 2007).

Aktivnosti serumske AST i ALT spadaju među najsenzitivnije indikatore pri analizi oštećenja jetre, obzirom da se ovi enzimi oslobađaju iz oštećenih hepatocita prvo u ekstracelualni prostor, a potom i u krvotok (Pari i Kumar, 2002; Rawi i sar., 2012). Nivo AST u serumu raste pri akutnom oštećenju jetre. Veći nivoi ovog enzima se, pored jetre, mogu naći i u eritrocitima, srčanim i mišićnim ćelijama. Nivo ALT u serumu, takođe, raste pri oštećenju parenhima jetre. Ovaj enzim je relativno specifičniji za hepatocite nego što je to slučaj sa AST, pa se smatra pouzdanijim markerom pri evaluaciji njenog oštećenja (Ramaiah, 2007). Fosfataze predstavljaju ključne enzime za procese detoksifikacije, metabolizma i biosinteze makromolekula koji se koriste kao izvori energije za druge važne ćelijske procese (Yousef i El-Demerdash, 2006). Nivo ALP u plazmi raste prilikom opstrukcije žučnih puteva ili intrahepatične holestaze. Ovaj enzim je najvećim delom lokalizovan u žučnim kapilarima i epitelnim ćelijama žučnih kanala (Ramaiah, 2007). Svaki poremećaj aktivnosti nekih od navedenih enzima (AST, ALT, i/ili ALP) može voditi biohemijskom disbalansu, narušavanju ćelijskih funkcija, što se kasnije može odraziti i kroz formiranje lezija u tkivima (Khan i sar., 2001).

Prikupljeni serumski pacova podvrgnuti su biohemijskoj analizi kako bi se evaluirale funkcionalne karakteristike juvenilne jetre nakon subhroničnog AA tretmana. Rezultati

serološke analize ukazuju da su obe doze AA izazvale promene u vrednostima analiziranih parametra, što indirektno govori o promenama u funkcionlanom statusu jetre pod uticajem AA, ali i o narušenoj homeostazi kompletnog organizma. Kod obe grupe životinja tretiranih AA, u našem eksperimentu, zabeleženo je povećanje aktivnosti AST u odnosu na kontrolne pacove, pri čemu je ono bilo najveće kod pacova tretiranih sa 50 mg/kg tm AA (Tab. 4.6). Nasuprot tome, obe grupe tretiranih pacova ispoljile su trend smanjenja aktivnosti ALT u odnosu na kontrolu (Tab. 4.6).

U slučaju oštećenja hepatocita i/ili promena u membranskoj permeabilnosti, što se može manifestovati i akumulacijom glikogena ili lipida, enzimi poput AST i ALT bivaju oslobođeni sa ćelijske membrane u ekstracelularni prostor, odnosno u perifernu krv (Ramaiah, 2007). AST se smatra indikatorom oštećenja membrane mitohondrija, dok ALT ukazuje na stepen oštećenja ćelijske membrane (Yousef i El-Demerdash, 2006). U odnosu na intracelularnu lokalizaciju, AST je prisutan u citosolu i mitohondrijama, dok je ALT je prisutan u citosolu (Ramaiah, 2007). Potrebno je istaći da nivoi AST i ALT koji dospeju u krvotok i čije se aktivnosti analiziraju, mogu biti uslovljeni putevima njihovog uklanjanja iz jetre i/ili samim poluživotom ovih enzima (Radi i sar., 2011). Naime, pretpostavlja da uklanjanje ALT iz jetre predominantno obavljaju endotelne ćelije, dok su u uklanjanjanju AST angažovanije Kupffer-ove ćelije (Radi i sar., 2011). Polu-život ALT je duži od AST, i kod pacova za ALT iznosi 40-60 h, a za AST se kreće oko 12 h. Odnos AST/ALT može biti koristan pri determinaciji uzroka oštećenja jetre (Ramaiah, 2007). Nakon akutnog oštećenja jetre, koji izaziva nekrozu srednjeg ili visokog stepena, javlja se relativno izraženiji rast aktivnosti AST i ALT, koja se vraća na normalan nivo u roku od nekoliko dana, a indikator je stepena oštećenja jetre. Perzistentna, blago do srednje povećana serumska aktivnost AST i ALT tokom dužeg perioda sugerše na prisustvo inflamatornog procesa, kao što je to hronični hepatitis (Ramaiah, 2007).

Efekat AA na vijabilnost hepatocita, izlazak ALT i AST iz ćelija, ćelijski nivo GSH i aktivost enzima GST je uslovljena dozom i vremenskim intervalom izlaganja hepatocita AA (Awad i sar., 1998). Prema nalazima, AA svoje toksične efekte ostvaruje i na nivou citoplazme, i na nivou mitohondija (Awad i sar., 1998). U skladu sa tim, a na bazi rezultata serološke analize za AST i ALT, moglo bi se pretpostaviti da su primenjene doze AA (25 i 50 mg/kg tm) izazvale oštećenja membrana kako mitohondrija, tako i ćelijske membrane hepatocita. Međutim, obzirom da AST nije isključivo specifična za hepatocite, zabeležena aktivnost ovog enzima u serumu ne može u potpunosti biti posmatrana kroz prizmu oštećenja mitohondrija i membrane hepatocita. Takođe, u slučaju pada broja ili funkcionalnosti

Kupffer-ovih ćelija u jetri, aktivnost AST u krvi bi očekivano porasla (Radi i sar., 2011). Zabeleženo smanjenje aktivnosti ALT može biti rezultat smanjenog izlaska enzima iz hepatocita u krvotok, njenog efikasnog uklanjanja od strane endotelnih ćelija i/ili direktnog, inhibitorynog delovanja AA na sam enzim, kao što je to slučaj sa GST (Dixit i sar., 1981; 1984). Kod nekih toksikoloških studija se povremeno javljao pad aktivnosti AST i ALT ispod referentnih nivoa, što je ove enzime učinilo nesenzitivnim parametrima za evaluaciju datog oštećenja jetre (Solter i sar., 2000). Pokazano je da subhroničan tretman mikrocistinom-LR može dovesti do značajne inhibicije sinteze ALT proteina u jetri (Solter i sar., 2000). Uzimajući to u obzir, inhibitoran efekat AA na aktivnost ALT može figurisati kao jedno od relevantnih objašnjenja za pad serumske aktivnosti ovog enzima.

Pri analizi aktivnosti ALP enzima, dve grupe tretiranih životinja u ovom eksperimentu, su ispoljile međusobno suprotan trend promena u njegovoj aktivnosti. Pacovi tretirani dozom od 25 mg/kg tm AA imali su najveću aktivnost ALP među eksperimentalnim grupama, što ukazuje na potencijalni poremećaj oticanja žuči iz lobulusa, i/ili tendenciju presumeravanja metaboličkih aktivnosti hepatocita ka procesu detoksifikacije (Tab. 4.6). Kod pacova je pokazano da nivo ALP brzo raste nakon jela, pa zato ne može biti pouzdan marker žučne staze (Amacher, 2002). Takođe, intestinalna mukoza pacova ima veću aktivnost ALP od njene aktivnosti u jetri (Amacher, 2002), pa u nekim situacijama faktor konzumiranja hrane može imati značaja za tumačenje rezultata. Kod pacova tretiranih dozom od 50 mg/kg tm AA pokazana je najmanja aktivnost ALP među eksperimentalnim grupama. Pad aktivnosti ALP izazvan većom dozom AA pokazao se značajnim u odnosu na rast aktivnosti ALP izazvan nižom dozom AA (Tab. 4.6). Ukoliko AA ima potencijal da inhibira GST (Dixit i sar., 1981; 1984), moguće je očekivati da isti efekat ostvaruje i na aktivnost ALP. Inhibitoran efekat AA na aktivnost ALP enzima sugerišu Rawi i sar. (2012) pošto je kod oba pola juvenilnih pacova zabeleženo smanjenje njegove aktivnosti nakon tretmana dozom od 15 mg/kg tm AA, tokom 28 dana.

Aktivnosti AST, ALT i ALP enzima koje su zabeležene u ovom istraživanju imaju kontradiktoran karakter. Uzimajući u obzir već objavljene podatke, još uvek je teško izvesti finalan zaključak o prirodi odgovora enzima na određenu dozu AA. Neke studije sugerišu na nelinearan dozno-zavisni odgovor enzima na izlaganje AA (Tardiff i sar., 2010), dok druge ukazuju na dozno-zavisne promene kako njihove aktivnosti, tako i oksidativnog statusa hepatocita (Yousef i El-Demerdash, 2006). Tretman mladih pacova sa 15 mg/kg tm AA tokom 28 dana izazvao je povećanje serumske aktivnosti AST i ALT enzima, što ukazuje na

oštećenja mitohondrija u hepatocitima, kao i samih ćelija (Rawi i sar., 2012). Međutim, istovremeno je zabeležen pad aktivnosti ALP, što može biti pokazatelj inhibicije detoksificirajućih procesa (Rawi i sar., 2012). Zabeležene nekonzistentnosti pojedinih parametara u odnosu na našu studiju mogu biti rezultat primenjene doze AA, ali i dinamike ekspozicije životinja AA, pošto je studija Rawi i sar. (2012) pratila protokol svakodnevne aplikacije AA u dozi od 15 mg/kg tm tokom 4 nedelje. Suprotno tome, tretman adultnih mužjaka pacova dozama od 0,5; 5; 25; 50; 250 ili 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tm AA u pijaćoj vodi tokom 10 nedelja izazvao je smanjenje aktivnosti AST, ALT u jetri, dok su aktivnost serumske ALP i količina serumskih proteina bili uvećani (Yousef i El-Demerdash, 2006). Na osnovu ovih podataka se može izvesti zaključak da veoma niske doze AA (reda veličine μg) aplikovane svakodnevno tokom 10 nedelja nisu dovele do značajnijih funkcionalnih promena, kao ni oštećenja hepatocita. Parenhim jetre je održao kapacitet za metabolisanje i eliminaciju AA tokom relativno dužeg vremenskog perioda intoksikacije životinja. Odstupanja koja su pokazana u pomenute dve studije mogu biti pripisana dozama i stepenu izlaganja AA, kao i starosnom dobu oglednih životinja. Pokazano je da je bioraspoloživost AA veća kod mlađih pacova nego kod starijih (Sánchez i sar., 2008), ali i da nivo GSH kojim raspolaže juvenilna jetri može biti skoro upola manji od onog kojim raspolaže jetra adultnog organizma (Allameh i sar., 1997), što bitno menja kapacitet jetre za metabolisanje AA.

Kod mužjaka pacova tretiranih tokom 12 nedelja hranom u kombinaciji sa 7% recikliranog ulja koje sadrži AA, serološke analize nisu pokazale razlike u nivou glukoze, triacilglicerola i fosfolipida, ali su zato nivoi AST i ALT bili povećani (Totani i sar., 2006). Jetra ovih životinja se karakterisala prisustvom tamnih mrlja, nekroze i krvarenja (Totani i sar., 2006; Totani i Ojiri, 2007). U drugom eksperimentu je korišćeno sveže sojino ulje i ulje uljane repice (Totani i sar., 2007). Kako bi se formirao AA, ovo ulju su prethodno dodati prekursori AA (glukoza i asparagin), a zatim je zagrevano na 180 °C (Totani i sar., 2007). Tretman mužjaka pacova tokom 12 nedelja hranom koja je imala 7% pomenutog ulja je pokazao značajno snižen nivo triacilglicerola i insulina u odnosu na kontrolne životinje (Totani i sar., 2007). Nivoi AST i ALT su takođe bio povišeni, ali ne u meri u kojoj je to bio slučaj nakon tretmana pacova sa recikliranim uljem (Totani i sar., 2007). Rezultati sugerišu da štetnost AA može biti modulirana svojstvima medijuma u kome se formira AA, načinom njegovog dobijanja, ali i prisustvom drugih komponenti u smeši.

Promene u količini ukupnih serumskih proteina (albumini, faktori koagulacije, amonijak, urea, trigliceridi itd.) jesu jedan od pokazatelja smanjenja funkcionalnog kapaciteta

jetre, odnosno prisustva funkcionalnog deficita. Promene vrednosti ovih parametara u krvi obično su praćene značajnim gubitkom funkcije jetre, čak od 70-80%, obzirom da jetra poseduje veliki rezervni kapacitet za sintezu ovih molekula (Ramaiah, 2007). Ipak, promene u vrednostima ovih parametara nisu nužno uvek posledica oštećenja jetre, već i nekih drugih patofizioloških stanja u organizmu, kao što su inflamacija, malnutricija i dr. (Ramaiah, 2007).

Smanjenje koncentracije ukupnih proteina, albumina i globulina u serumu, kao i pad njihovog nivoa u hepatocitima povezuje se sa višim dozama AA, i može biti posledica usporene sinteze proteina, promene u njihovom metabolizmu ili njihovom izlasku iz hepatocita (Sharma i sar., 2008). Neznatan pad ukupne koncentracije serumskih proteina zabeležen je u tretmanu juvenilnih mužjaka i ženki pacova dozom od 15 mg/kg tm AA, tokom 28 dana (Rawi i sar., 2012). U subhroničnom tretmanu adultnih mužjaka pacova dozama 50 odnosno, 100 mg/kg tm AA, tokom 21 dana, pokazan je značaj pad koncentracije ukupnih proteina, albumina i globulina u serumu, koji je bio posebno izražen kod mužjaka tretiranih višom dozom (El-Bohi i sar., 2011). Pored toga, pacovi su ispoljili relativno visok stepen mortaliteta, i to 31% u grupi tretiranoj nižom dozom, odnosno 38% u grupi tretiranoj višom dozom AA (El-Bohi i sar., 2011).

U okviru naše studije nisu zabeležene promene u količini serumskih proteina među eksperimentalnim grupama nije bilo (Tab. 4.6). Nalaz sugerise da primenjene doze (25 i 50 mg/kg tm AA) i dinamika ekspozicije životinja (5 dana tretmana, 2 dana pauze, tokom 3 nedelje) nisu poremetile kapacitet jetre za sintezu proteina. Istraživanje Rawi i sar. (2012), ukazuje na postojanje diskretnih razlika u reakciji organizma juvenilnih mužjaka i ženki na AA tretman. Rezultati analize hematoloških, biohemijskih i neuroloških parametara, kao i histopatološki nalazi jetre, bubrega, mozga, testisa, sugerisu da se pojedini parametri više menjaju kod jednog, odnosno drugog pola (Rawi i sar., 2012). Međutim, još uvek ne postoji dovoljan kvantum podataka kako bi se izveo jedinstven zaključak da li i u kojoj meri pol i starost organizma mogu imati udela u štetnim posledicama AA po organizam.

C reaktivni protein (CRP) je protein tipičan za akutno-fazni odgovor organizma, deo je prirodnog (urođenog) imunog odgovora i ima ulogu opsonina, a ujedno može i povezati prirodni i adaptivni imunitet putem aktivacije sistema komplementa i interakcijom sa Fc γ delom receptora (Black i sar., 2004; Peisajovich i sar., 2008). Primarno mesto sinteze CRP je jetra, odnosno hepatociti (Peisajovich i sar., 2008). Kod čoveka, njegova koncentracija u serumu rapidno raste (tokom 24-48 h) u reakcijama organizma na infekciju, inflamaciju ili

povredu tkiva (Black i sar., 2004; Peisajovich i sar., 2008). Pri normalnim fiziološkim uslovima CRP se, u serumu čoveka, nalazi u koncentracijama manjim od 3 mg/l, ali se njegova sinteza dramatično i rapidno povećava kao sastavi deo akutno-faznog odgovora (Peisajovich i sar., 2008). Prema nekim studijama, blago povećanje nivoa CRP se može dovesti u vezu sa kardiovaskularnim oboljenjima (Black i sar., 2004).

Pokazano je da postoje razlike u kontroli CRP sinteze između miševa i ljudi. Kod ljudi, CRP jeste tipičan protein akutno-faznog odgovora, dok se kod miševa sintetise u veoma malim količinama, čiji se nivo relativno skromno povećava u odgovoru na inflamatorne stimuluse (Pepys i sar., 1979). Nasuprot miševima, kod pacova nivo CRP u serumu raste prilikom inflamacije (Nunomura, 1990). Kod adultnih pacova, se koncentracija CRP u serumu kreće između 0,4-0,8 mg/ml (de Beer i sar., 1982; Nunomura, 1990), dok je kod mladih jedinki (starosti oko 3 nedelje), niža i iznosi oko 0,096 mg/ml (de Beer i sar., 1982).

U našem tretmanu pacova nižom dozom AA je izazvao blago povećanje koncentracije CRP u serumu u odnosu na kontrolu, što može sugerisati na oštećenje tkiva jetre, ali i drugih organa (Tab. 4.6). Kod pacova tretiranih višom dozom AA detektovano je njegovo blago smanjenje u odnosu na kontrolu, što može biti indikator smanjene sinteze proteina (Tab. 4.6), što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim studijama o inhibitornom delovanju AA na sintezu proteina (El-Bohi i sar., 2011). Ipak, nalazi koncentracije CRP ne pokazuju da je i jedan od tretmana izazvao veća variranja u sintezi ovog proteina, koji bi potvrdio prisustvo uznapredovalog inflamatornog procesa u organizmu. Pojeini nalazi ukazuju da polni hormoni mogu uticati na koncentraciju CRP u serumu (Nunomura i sar., 1994). Obzirom da se ovde radi o prepubertalnim (starost 23 dana na početku eksperimenta), odnosno juvenilnim životinjama (starost 44 dana na kraju eksperimenta), moguće variranje u količini CRP može biti rezultat i početka sinteze polnih hormona.

Telesna masa često može biti veoma senzitivna pokazatelj štetnih efekata nekog ksenobiotika po organizam (Rawi i sar., 2012). Rezultati merenja telesnih masa pacova na početku, tokom i na kraju našeg eksperimenta, jasno pokazuju da su oba tretmana AA izazvala njen kontinuirani gubitak kod tretiranih životinja, dok su pacovi kontrolne grupe imali kontinuiran rast telesne težine (Tab. 4.7). Izrazito negativan efekat AA na masu životinja je bio prisutan kod pacova tretiranih dozom od 50 mg/kg tm (Tab. 4.7), kod kojih je primećen i vidljiv gubitak krzna, što takođe ukazuje na opšte zdravstveno stanje organizma. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa nalazima Sharma i Jain (2008), Park i sar. (2010), Raju i sar. (2011) i Rawi i

sar. (2012) i potvrđuje da oralna administracija AA kod juvenilnih pacova izaziva pad njihove telesne mase. Redukacija telesne mase tokom razvoja organizma može biti posledica malnutricije (Abdul-Hamid i sar., 2007), izražene razgradnje tkivnih proteina (Chatterreja i Shinde, 2002) ili smanjene sinteze plazma i tkivnih proteina (Yousef i El-Demerdash, 2006). Prema Wang i sar. (2010), AA ispoljava škodljiv efekat na rast i razviće juvenilnih mužjaka pacova, a jedno od objašnjenja gubitaka telesne mase može biti deficijencija proteina koja je nastala kao posledica tretmana AA (Rawi i sar., 2012). Gubitak telesne mase, koji je zabeležen u ovoj studiji ukazuje na negativan efekat AA na organizam, ali obzirom da ukupna količina serumskih proteina nije ispoljila varijacije između eksperimentalnih grupa, potencijalno objašnjenje se može naći u izraženoj razgradnji tkivnih proteina. Ovome u prilog govori i nalaz da su obe grupe tretiranih životinja ispoljavale sindrome neurotoksičnosti. Uz pretpostavku da je mehanizam neurodegenerativnih efekata AA posredovan njegovim interakcijama sa proteinima (Sickles, 1992; Lehning i sar., 2002a; 2002b; 2003; LoPachin i sar., 2006), kada se narušava njihova struktura i funkcija, hipoteza o pojačanoj razgradnji tkivnih proteina dobija dodatnu potvrdu.

Svi aspekti delovanja AA na organizam, a time i na jetru, još uvek nisu potpuno razjašnjeni. Pored limitiranosti nalaza vezanih za delovanje AA na humanu populaciju, značajan broj podataka ima kontraditkoran karakter. Uz to, obzirom da je najveći deo podataka dobijen na animalnim ekperimentalnim modelima i/ili ćelijskim kulturama, njihova sama relevantnost za ljudsku populaciju može biti ograničena.

Zaključci

VI ZAKLJUČCI

U okviru ove doktorske disertacije ispitane su glavne histološke i biohemijske karakteristike jetre juvenilnih mužjaka pacova soja Wistar, tretiranih *per os*, vodenim rastvorom AA u dozi od 25, odnosno 50 mg/kg tm, 5 puta nedeljno, tokom 3 nedelje. Dobijeni rezultati upućuju na sledeće:

1. Na jetri juvenilnih pacova tretiranih dozom od 25 mg/kg tm AA, po prethodno opisanoj dinamici, zabeleženo je:
 - a) Uvećanje volumena hepatocita, posebno njihove citoplazme, što ukazuje na poremećaj integriteta membrane i promene u njenoj permeabilnosti, a može biti rezultat oksidativnog stresa koji je potvrđeni efekat AA. Smanjenje volumena sinusoida bi rezultovalo smanjenim dotokom krvi u lobulus, što dodatno uvećava štetne posledice izazvane intoksikacijom AA.
 - b) Smanjena količina glikogena u hepatocitima u odnosu na kontrolu sugerise na njegovu povećanu razgradnju u cilju dobijanja glukoze neophodne za metaboličke procese biotransformacije AA.
 - c) Smanjena proliferacija hepatocita ukazuje na smanjeni regenerativni kapacitet hepatocita, što može biti posledica direktnog delovanja AA, ali i indirektno, rezultat gubitka funkcionalnosti i/ili broja Kupffer-ovih ćelija, obzirom da pad broja Kupffer-ovih ćelija može smanjiti proliferaciju hepatocita.
 - d) Smanjenje apoptotičkih karakteristika jetre ukazuju da niža doza AA nije izazvala pokretanje procesa programirane ćelijske smrti u hepatocitima.
 - e) Smanjena imunopozitivnost Kupffer-ovih ćelija na CD68 marker, zajedno sa njihovom povećanom imunopozitivnošću na marker apoptoze, sugerise na toksičan efekat AA na ove ćelije i njegov potencijalno imunosupresivni efekat.
 - f) Povećanje broja mastocita, posebno njihove degranulisane populacije, kao i njihovog volumena, sugerise na povećanu aktivnost ovih ćelija i može biti posledica povećane metaboličke aktivnosti hepatocita i nagomilavanja produkata metabolizma u ekstracelularnom prostoru u uslovima smanjene funkcionalnosti Kupffer-ovih ćelija. Smanjen volumen sinusoida može biti dodatan razlog za povećanu infiltraciju

parenhima jetre mastocitima kako bi se modifikovala mikrocirkulacija lobulusa, prethodno narušena intoksikacijom AA.

- g) Pokazane vrednosti AST i ALT ukazuju na oštećenje membrane hepatocita, kao i njihovih mitohondrija. Porast aktivnosti AST jednim delom može biti posledica oštećenja drugih organa i/ili tkiva u organizmu, ali i smanjenog odstranjivanja AST u jetri usled gubitka funkcije Kupffer-ovih ćelija. Pad ALT aktivnosti u serumu može biti rezultat inhibitorynog efekta AA na ovaj enzim, ali i njegovog efikasnijeg odstranjivanja iz jetre od strane endotelnih ćelija. Porast serumske aktivnosti ALP ukazuje na intenziviranje metaboličkih procesa u jetri, ali i mogućnost narušenog oticanja žuči iz jetre.
- h) Diskretno povećanje nivoa CRP može biti indikator oštećenja tkiva kako u jetri tako i u drugim organima, a smanjenje telesne težine pacova u ovoj grupi potvrđuje toksične posledice AA po juvenilni organizam.

2. Na jetri juvenilnih pacova tretiranih dozom od 50 mg/kg tm AA, po prethodno opisanoj dinamici, zabeleženo je:

- a) Izraženo uvećanje volumena hepatocita i njihove citoplazme, kao i izraženo smanjenje volumena sinusoida u lobulusu, u odnosu na druge dve eksperimentalne grupe, ukazuju na prominentno oštećenje ćelijske membrane, njenog integriteta, i propustljivosti, kao i na redukovanu mikrocirkulaciju lobulusa.
- b) Akumulacija glikogena u hepatocitima sugeriše na poremećaj njihove funkcionalnosti, odnosno oksidativni stres, koji je mogao poremetiti aktivnost svih ćelijskih enzima, pa time i onih koji učestvuju u sintezi i/ili razgradnji glikogena. Nalazi upućuju na izražene efekte oksidativnog stresa i blokadu ćelijskog metabolizma u hepatocitima.
- c) Obzirom da je u većini slučajeva regeneracija jetre povezana sa stepenom njenog oštećenja, uočena povećana proliferacija hepatocita, uz smanjenje apoptotičkih karakteristika sugeriše da je intoksikacija sa AA izazvala značajno oštećenje jetrinog parenhima, koje zahteva intenzivan proces regeneracije.
- d) Smanjeno prisustvo Kupffer-ovih ćelija pozitivnih na CD68 marker, u kombinaciji sa povećanjem njihove apoptoze ukazuje na oštećenje ovih ćelija usled intoksikacije AA i na potencijalni imunosupresivni efekat. Istovremeno, oštećenje parenhima moglo je

- nastati i indirektno, usled nagomilavanja produkata metabolizma AA, obzirom da su u njihovom uklanjanju angažovane Kupffer-ove ćelije, čiji je gubitak pokazan.
- e) Povećanje brojnosti mastocita i njihove degranulacije sugeriše na potrebu za angažovanjem mastocita u tkivu u kom je doza od 50 mg/kg tm AA u značajnoj meri narušila funkcionalnost i strukturni integritet kako parenhima, tako i neparenhimskih ćelija jetre, i time ugrozila odvijanje metaboličkih procesa. Međutim, blago smanjenje broja mastocita u odnosu na grupu tretiranu nižom dozom AA, može biti indikator toksičnog i/ili imunosupresivnog delovanja AA i na ove ćelije.
 - f) Pokazane vrednosti AST i ALT ovde ukazuju na prominentno oštećenje funkcionalnog integriteta u membrani hepatocita, kao i njihovih mitohondrija, gde je rast serumske aktivnosti AST još veći, a pad aktivnosti ALT još niži u odnosu na grupu tretiranu nižom dozom AA. I ovde porast aktivnosti AST delimično može biti posledica oštećenja drugih organa i/ili tkiva, ali i smanjenog odstranjivanja AST u jetri zbog gubitka Kupffer-ovih ćelija. Konstatovani pad ALT aktivnosti u serumu može se smatrati posredstvom inhibitornog efekta AA na ovaj enzim i/ili njegovog efikasnijeg odstranjivanja iz jetre aktivnošću endotelnih ćelija. Pad serumske aktivnosti ALP ukazuje na potencijano inhibitorno delovanje AA na ovaj enzim.
 - g) Izražen gubitak telesne težine pacova u ovoj grupi ukazuje na visok stepen narušene homeostaze juvenilnog organizma, koje su nastale kao rezultat intoksikacije životinja AA.
3. Prema rezultatima ove studije, i uz postojeće podatke o subcelularnim efektima AA, moguće je pretpostaviti da obe doze AA, prema opisanoj dinamici ekspozicije, izazivaju oštećenje hepatocita, remete mikrocirkulaciju lobulusa, i funkcionalnost neparenhimskih ćelija jetre. Doza od 50 mg/kg tm AA predstavlja aproksimativno 1/3 LD₅₀ za adultne životinje, a pokazano je da AA izaziva oštećenja na hepatocitima pri dozama ≥ 24 mg. Uzimajući u obzir da juvenilna jetra poseduje manje zalihe GSH u odnosu na adultnu i ima potencijalno efikasniju kanjugaciju AA sa GSH, juvenilni organizam bi imao slabiju zaštitu od oksidativnog stresa izazvanu ovim molekulom.

4. Moguće je pretpostaviti da juvenilna jetra poseduje kapacitet za relativno uspešno metabolisanje doze od 25 mg/kg tm AA, a da doza od 50 mg/kg tm AA prevazilazi metabolički kapacitet hepatocita i izaziva izrazito remećenje njihovog funkcionalnog statusa koje vodi blokadi njihovih metaboličkih procesa. Naime, uprkos oštećenju hepatocita, koje se ogledalo u promenama mikrostrukturnih i biohemijskih svojstava jetre, nalazi upućuju da su ćelije ostale funkcionalno sposobne i održale metabolički kapacitet pri dozi od 25 mg/kg tm AA, pa je dominirajući efekat bio angažovanje svih raspoloživih resursa ćelija ka metabolisanju i eliminaciji AA. Nasuprot tome, doza od 50 mg/kg tm AA je dovela do izrazitog biohemijskog disbalansa u jetri, prvenstveno u hepatocitima, što se odrazilo kroz izraženije mikrostrukturne promene u tkivu jetre. Pojava oksidativnog stresa, a time i visok stepen oštećenja parenhima uz blokadu metaboličkih procesa, mogli su biti okidač za iniciranje regenerativnih procesa u parenhimu.

5. Dakle, dobijeni nalazi histološke i serološke analize govore u prilog hepatotoksičnosti AA, i ukazuju da se ona sa subcelularnog nivoa može, u relativno kratkom vremenskom intervalu, preneti na viši nivo organizacije u jetri, kao što je nivo tkiva, a potom i organa u celini. Pored toga, toksični potencijal AA bi mogao biti višestruko naglašen kod mladog organizma u odnosu na adultni.

Sve navedeno naglašava neophodnost daljeg istraživanja kako bi se što preciznije sagledali svi biološki efekti AA, i sa većom pouzdanošću mogli utvrditi rizici i preventivne mere zaštite, a posebno dece od štetnih efekata koje izaziva svakodnevno konzumiranje namirnica bogatih AA.

Literatura

VII LITERATURA

- Aalto-Korte K, Jolanki R, Suuronen K, Estlander T. (2002). Biochemist's occupational allergic contact dermatitis from iodoacetamide and acrylamide. *Contact Dermatitis*. 47(6), 361-362.
- Abd-El-Aleem SA, Morgan C, Ferguson MWJ, McCollum CN, Ireland GW. (2005). Spatial distribution of mast cells in chronic venous leg ulcers. *Eur. J. Histochem*. 49(3), 265-272.
- Abdul-Hamid M, Allam A, Hussein MB. (2007). Effect of ethanol administration during gestation on the cerebral cortex and spinal cord of albino rat newborns and on the development of their sensorimotor reflexes. *Egypt. J. Zool*. 48, 137-162.
- Abe M, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi Y. (2000). Effect of mast cell-derived mediators and mast cell-related neutral proteases on human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *J. Allergy Clin. Immunol*. 106 (1 Pt 2), S78-S84.
- Abramsson-Zetterberg L. (2003). The dose-response relationship at very low doses of acrylamide linear in flow cytometer-base mouse micronucleus assay. *Mutat. Res*. 535(2), 215-222.
- ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) (2001). Acrylamide. TA:ACGIH. Documentation of the threshold limit values and biological exposure PB, 3. Cincinnati, Ohio.
- Adler I, Parry J. (1993). Development for screening tests for aneuploidy induction by environmental pollutants. *Environ. Health Perspect*. 101, 5-9.
- Adler I; Ingwersen I, Kliesch U, el Tarras A. (1988). Clastogenic effects of acrylamide in mouse bone marrow cells. *Mutat. Res*. 206, 379-385.
- Adler ID, Baumgartner A, Gonda H, Friedman MA. (2000). 1-Amino-benzotriazole inhibits acrylamide-induced dominant lethal effects in spermatids of male mice. *Mutagenesis*. 15, 133-136.
- Adler ID, Schmid TE, Baumgartner A. (2002). Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the present data base. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen*. 504, 173-182.
- Adler ID, Zouh R, Schmid E. (1993). Perturbation of cell division by acrylamide *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res*. 301, 249-254.
- Ali SF, Hong J, Wilson WE, Uphouse LL, Bondy SC. (2003). Effect of acrylamide on neurotransmitter metabolism and neuropeptide levels in several brain regions and upon circulating hormones. *Arch. Toxicol*. 52, 35-43.
- Allam AA, El-Ghareeb AW, Abdul-Hamid M, Bakery AE, Gad M, Sabri M. (2010). Effect of prenatal and perinatal acrylamide on the biochemical and morphological changes in liver of developing albino rat. *Arch Toxicol*. 84(2), 129-141.

- Allameh A, Vansoun EY, Zarghi A. (1997). Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mech. Ageing Dev.* 95(1-2), 71-79.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87(2), 171.
- Amacher DE. (2002). A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. *Human. Exp. Toxicol.* 21, 253-262.
- Ambu R, Crisponi G, Sciort R, Van Eyken P, Parodo G, Iannelli S, Marongiu F, Silvagni R, Nurchi V, Costa V. (1995). Uneven hepatic iron and phosphorus distribution in beta-thalassemia. *J. Hepatol.* 23(5), 544-549.
- American Cyanamid Co. (1969). Chemistry of Acrylamide, Bulletin PRC 109. Process Chemicals Department, Wayne, NJ, US. pp. 1-64.
- Andelković Z, Somer Lj, Matavulj M, Lačković V, Lalošević D, Nikolić I, Milosavljević Z, Danilović V. (2002). Čelija i tkiva. Bonafides, Niš.
- Andelković Z, Somer Lj, Perović M, Avramović V, Milenkova Lj, Kostovska N, Petrović A. (2001). Histološka gradnja organa. Žlezde pridodate digestivnom traktu. Bonafides, Niš. pp. 55-62.
- Andres D, Sanchez-Reus I, Bautista M, Cascales M. (2003). Depletion of Kupffer cell function by gadolinium chloride attenuates thioacetamide-induced hepatotoxicity. Expression of metallothionein and HSP70. *Biochem. Pharmacol.* 66, 917-926.
- Annola K, Karttunen V, Keski-Rahkonen P, Myllynen P, Segerbäck D, Heinonen S, Vähäkangas K. (2008). Transplacental transfer of acrylamide and glycidamide are comparable to that of antipyrine in perfused human placenta. *Toxicol. Lett.* 182, 50-56.
- Awad ME, Abdel-Rahman MS, Hassan SA. (1998). Acrylamide toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. In Vitro.* 12(6), 699-704.
- Barber DS, Hunt JR, Ehrich MF, Lehning EJ, LoPachin RM. (2001). Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing. *Neurotoxicology* 22, 341-353.
- Baum M, Loeppky RN, Thielen S, Eisenbrand G. (2008). Genotoxicity of glycidamide in comparison to 3-N-nitroso-oxazolidin-2-one. *J. Agric. Food. Chem.* 56(15), 5989-5993.
- Behroozikha M, Saidee M, Allameh A. (1992). Comparison of aflatoxin B1-DNA binding and glutathione conjugate formation by liver preparations from rats of different ages. *Cancer Lett.* 66(1), 69-76.
- Bergmark E, Calleman CJ, Costa LG. (1991). Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111, 352-363.

- Bergmark E, Calleman CJ, Fengsheng HE, Costa LC. (1993). Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120, 45-54.
- Bergmark E. (1997). Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 78-84.
- Besaratinia A, Pfeifer GP. (2003). Weak yet distinct mutagenicity of acrylamide in mammalian cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 889-896.
- Besaratinia A, Pfeifer GP. (2004). Genotoxicity of acrylamide and glycidamide. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1023-1029.
- Besaratinia A, Pfeifer GP. (2007). A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis.* 28(3), 519-528.
- Beyer DJ, Belsito DV. (2000). Allergic contact dermatitis from acrylamide in a chemical mixer. *Contact Dermatitis* 42(3), 181-182.
- Bjellaas T, Olesen PT, Frandsen H, Haugen M, Stolen LH, Paulsen JE, Alexander J, Lundanes E, Becher G. (2007). Comparison of estimated dietary intake of acrylamide with hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide. *Toxicol. Sci.* 98(1), 110-117.
- Black S, Kushner I, Samols D. (2004). C-reactive protein. *J. Biol. Chem.* 279(47), 48487-48490.
- Boettcher MI, Bolt HM, Drexler H, Angerer J. (2006). Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Arch. Toxicol.* 80(2), 55-61.
- Boettcher MI, Bolt THM, Drexler BH, Angerer J. (2006). Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labeled acrylamide. *Arch. Toxicol.* 80, 55-61.
- Boettcher MI, Schettgen HMT, Kutting B, Pischetsrieder M, Angerer J. (2005). Mercapturic acid of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population. *Mutat. Res.* 580, 167-176.
- Bolt HM. (2003). Genotoxicity-threshold or not? Introduction of cases of industrial chemicals. *Toxicol. Lett.* 140-141, 43-51.
- Bowyer JF, Latendresse JR, Delongchamp RR, Muskhelishvili L, Warbritton AR, Thomas M, Tareke E, McDaniel LP, Doerge DR. (2008a). The effects of subchronic acrylamide exposure on gene expression, neurochemistry, hormones and histopathology in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis of male Fisher 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230(2), 208-215.
- Bowyer JF, Latendresse JR, Delongchamp RR, Warbritton AR, Thomas M, Divine B., Doerge DR. (2008b). The mRNA expression and histological integrity in rat forebrain motor and

- sensory regions are minimally affected by acrylamide exposure through drinking water. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 401-411.
- Bradding P, Holgate ST. (1999). Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 31(2), 119-133.
- Braet F, Wisse E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp. Hepatol.* 1(1), 1.
- Bull RJ, Robinson M, Laurie RD, Stoner GD, Greisiger E, Meier JR, Stober J. (1984). Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice. *Cancer Res.* 44, 107-111.
- Burek JD, Albee RR, Beyer JE, Bell TJ, Carreon RM, Morden DC, Wade CE, Hermann EA, Gorzinski SJ. (1980). Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 4, 157-182.
- Burt AD, Day Cp. (2002). Pathophysiology of the liver. *Pathology of the liver*. In: MacSween RNM, Burt AD, Portman BC, Ishak KG, Scheurer PJ, Anthony PP (eds). Churchill Livingstone, New York. pp. 67-105.
- Bykov I, Ylipaasto P, Eerola L, Lindros KO. (2004). Functional differences between periportal and perivenous Kupffer cells isolated by digitonin-collagenase perfusion. *Comp. Hepatol.* 3 (Suppl 1), S34.
- Calleman CJ, Bergmark E, Stern LG, Costa LG. (1993). A nonlinear dosimetric model for hemoglobin adduct formation by neurotoxic agent acrylamide and its genotoxic metabolite glycidamide. *Environ. Health Perspect.* 99, 221-223.
- Calleman CJ, Stern LG, Bergmark E, Costa LG. (1992). Linear versus nonlinear models for hemoglobin adduct formation by acrylamide and its metabolite glycidamide: implications for risk estimation. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1(5), 361-368.
- Calleman CJ, Wu Y, He F, Tian G, Bergmark E, Zhang LG. (1994). Relationship between biomarkers of exposure and neurological effects in a group of workers exposed to acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126, 361-371.
- Calleman CJ. (1996). The metabolism and pharmacokinetics of acrylamide: implications for mechanism of toxicity and human risk estimation. *Drug Metabol. Rev.* 28, 527-590.
- Carere A. (2006). Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review. *Ann. Ist. Super Sanita.* 42(2), 144-155.
- CAREX Canada, School of Environmental Health, University of British Columbia (Published January 2009, Updated March 2010); www.carexcanada.ca
- Carlson GP, Fossa AA, Morse MA, Weaver PM. (1986). Binding and distribution studies in the SENCAR mouse of compounds demonstrating a route-dependent tumorigenic effect. *Environ. Health Perspect.* 68, 53-60.

- Carson F, Hladik C. (2009). Chapter 1: Fixation; Chapter 7: Carbohydrates and amyloid. In: Histotechnology. A Self-instructional text (3rd ed). American Society for Clinical Pathology Press, Chicago. pp. 10, 193-141.
- Cavanagh JB, Gysbers MF. (1983). Ultrastructural features of the Purkinje cell damage caused by acrylamide in the rat: a new phenomenon in cellular neuropathology. J. Neurocytol. 12, 413-437.
- Cavanagh JB. (1979). The dying-back process. Arch. Pathol. Lab. Med. 103, 659-664.
- Cavins JF, Friedman M. (1968). Specific modification of protein sulfhydryl groups with α,β -unsaturated compounds. J. Biol. Chem. 243, 3357-3360.
- Chan A, Cooley MA, Collins AM. (2001). Mast cells in the rat liver are phenotypically heterogeneous and exhibit features of immaturity. Immunol. Cell Biol. 79(1), 35-40.
- Chapin RE, Fail PA, George JD, Grizzle TB, Heindel JJ, Harry GJ, Collins BJ, Teague J. (1995). The reproductive and neural toxicities of acrylamide and three analogues in Swiss mice, evaluated using continuous breeding protocol. Fundam. Appl. Toxicol. 27, 9-24.
- Chatterjea MN, Shinde R. (2002). Textbook of Medical Biochemistry MN. (5th ed). Jaypee Brothers, Medical Publishers Ltd., New Delhi. p. 317.
- Chico Galdo V, Massart C, Jin L, Vanvooren V, Caillet-Fauquet P, Andry G, Lothaire P, Dequanter D, Friedman M, Van Sande J. (2006). Acrylamide: an *in vitro* thyroid carcinogenic agent, induces DNA damage in rat thyroid cell lines and primary cultures. Mol. Cell. Endocrinol. 257-258, 6-14.
- Chinoy NJ and Memon MR. (2001). Beneficial effects of some vitamins and calcium on fluoride and aluminium toxicity of gastrocnemius muscle and liver of male mice. Fluoride. 34, 21-33.
- Clark G, Coalson RE, Nordquist RE. (1973). Methods for animal tissues. 87. In: Clark G (ed). Staining Procedures Used by the Biological Stain Commission. (3rd ed). Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Clement FC, Dip R, Naegeli H. (2007). Expression profile of human cells in culture exposed to glycidamide, a reactive metabolite of the heat-induced food carcinogen acrylamide. Toxicology. 240, 111-124.
- Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, Richardson MM, Demetris AJ, Jonsson JR. (2005). Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. Hepatology. 41(4), 809-818.
- Costa LG, Deng H, Gregotti C, Manzo L, Faustman EM, Bergmark, Callemann CJ. (1992). Comparative studies on the neuro and reproductive toxicity of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the liver. Neurotoxicology. 13, 219-224.

- Costa LG. (1996). Biomarker research in neurotoxicology: the role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl 1), 55-67.
- Coughlin JR. (2003). Acrylamide: what we have learned so far. *Food Technol.* 57, 100-104.
- Crivellato E, Beltrami CA, Mallardi F, Ribatti D (2004). The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histol. Histopathol.* 19(1), 259-270.
- Crofton KM, Padilla S, Tilson HA, Anthony DC, Raymer JH, MacPhail RC. (1996). The impact of dose-rate on the neurotoxicity of acrylamide: the interaction of administered dose, target tissue concentrations, tissue damage, and functional effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139, 163-176.
- Crump KS. (1999a). Mechanism of acrylamide induction of benign mammary fibroadenomas in the aging female Fisher 344: relevance to human health risk assessment. Ruston, LA: The K.S. Crump Group. pp: 1-33.
- Crump KS. (1999b). Consideration of the potency classification of acrylamide based on the incidence of tunica vaginalis mesotheliomas (TVMs) in male Fisher 344 rats. Ruston, LA: The K.S. Crump Group. pp. 1-30.
- da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *J. Histochem. Cytochem.* 62(10), 698-738.
- de Beer FC, Baltz ML, Munn EA, Feinstein A, Taylor J, Bruton C, Clamp JR, Pepys MB. (1982). Isolation and characterization of C-reactive protein and serum amyloid P component in the rat. *Immunology.* 45(1), 55-70.
- Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, Brantner JH, Hayes PF. (1988). Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat. Res.* 195, 45-77.
- Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Sega GA, Brusick DJ. (1995). Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat. Res.* 330, 71-99.
- Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Sega GA, Brusick DJ. (1995). Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat. Res.* 330(1-2), 71-99.
- Dejongh J, Nordin-Andersson M, Ploeger BA, Forsby A. (1999). Estimation of systemic toxicity of acrylamide by ingestion of *in vitro* toxicity data with kinetic simulations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158, 261-268.
- Delhaye M, Louis H, Degraef C, Le Moine O, Deviere J, Gulbis B, Jacobovitz D, Adler M, Galand P. (1996). Relationship between hepatocyte proliferative activity and liver functional reserve in human cirrhosis. *Hepatology.* 23(5), 1003-1011.

- Denucci SM, Tong M, Longato L, Lawton M, Setshedi M, Carlson RI, Wands JR, de la Monte SM. (2010). Rat strain differences in susceptibility to alcohol-induced chronic liver injury and hepatic insulin resistance. *Gastroenterol Res Pract.* 1-16.
- Dixit R, Das M, Seth PK. (1984). Interaction of acrylamide with glutathione in rat erythrocytes. *Toxicol. Lett.* 23(3), 291-298.
- Dixit R, Huasin R, Mukhtar H, Seth PK. (1981). Effects of acrylamide on biogenic amine levels, monoamine oxidase, and cathepsin D activity of rat brain. *Environ. Res.* 26, 168-173.
- Doerge DR, Gamboa de Costa G, McDaniel LP, Chruchwell MI, Twaddle NC, Beland FA. (2005c). DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutat. Res.* 580, 131-141.
- Doerge DR, Twaddle NC, Boettcher MI, McDaniel LP, Angerer J. (2007). Urinary excretion of acrylamide and metabolites in Fisher 344 rats and B6C3F(1) mice administered a single dose of acrylamide. *Toxicol. Lett.* 169, 34-42.
- Doerge DR, Young JF, McDaniel LP, Twaddle NC, Chruchwell MI. (2005a). Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202, 258-267.
- Doerge DR, Young JF, McDaniel LP, Twaddle NC, Chruchwell MI. (2005b). Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fisher 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 199-209.
- Dooley JS, Lok ASF, Burroughs AK, Heathcote EJ. (2011). *Sherlock's Diseases of The Liver And Biliary System.* (12th ed). Wiley-Blackwell, Oxford, West Sussex, UK.
- Dourson M, Hertzberg R, Allen B, Haber L, Parker A, Kroner O, Maier A, Kohrman M. (2008). Evidence-based dose-response assessment for thyroid tumorigenesis from acrylamide. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 52, 264-289.
- Duchen LW. (1961). The effects of deprivation of portal blood on the liver and its influence on carbon tetrachloride liver injury in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.* 42, 247-252.
- Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TR, Lalljie SP, Muller DJ, Olin S, Petersen BJ, Schlatter J, Scholz G, Scimeca JA, Slimani N, Tornqvist M, Tuijetelaars S, Verger P. (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem. Toxicol.* 43, 365-410.
- Dybing E, Sanner T. (2003). Risk assessment of acrylamide in foods. *Toxicol. Sci.* 75, 7-15.
- EC (European Commission). (2000). Risk assessment of acrylamide. European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection, Joint Research Centre. http://ecb.jrc.it/Documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/DRAFT/R011_0010_env.hh.pdf.
- EC (European Commission). (2002). Opinion of the scientific committee on food on new findings regarding the presence of acrylamide in food. European Commission, Belgium.

- ECHA (European Chemicals Agency) Press Release. (2010). Acrylamide included in the REACH Candidate List of Substances of Very High Concern for Authorisation. http://echa.europa.eu/doc/press/pr_10_05_acrylamide_20100330.pdf
- Edwards PM. (1975). The distribution and metabolism of acrylamide and its neurotoxic analogues in rats. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1277-1282.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2012). Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA J.* 10, 2938-2976.
- El-Bohi KM, Moustafa GG, El sharkawi NI, Sabik LME. (2011). Acrylamide-induced genotoxic, biochemical and pathological perturbations in male rats liver. *J. Am. Sci.* 7(1), 1092-1096.
- Elder VA, Fulcher JG, Leung H, Topor MG. (2004). Method for reducing acrylamide in thermally processed foods. Patent US20040058045.
- Endo H, Kittur S, Sabri MI. (1994). Acrylamide alters neurofilament protein gene expression in rat brain. *Neurochem. Res.* 19, 815-820.
- Erdreich LS, Friedman MA. (2004). Epidemiologic evidence for assessing the carcinogenicity of acrylamide. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 39, 150-157.
- Erkekoğlu P, Baydar T. (2010). Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods. *Nutr. Res. Rev.* 23(2), 323-333.
- EU (European Union). (2002). European Union risk assessment report: Acrylamide. Institute for Health and Consumer Protection.
- Ezeji T, Groberg M, Qureshi N, Blaschek H. (2003). Continuous production of butanol from starch-based packing peanuts. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 106, 375-382.
- Faa G, Nurchi V, Demelia L, Ambu R, Parodo G, Congiu T, Sciort R, Van Eyken P, Silvagni R, Crisponi G. (1995). Uneven hepatic copper distribution in Wilson's disease. *J. Hepatol.* 22(3), 303-308.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization, World Health Organization) (2002). Consultation on the Health Implication of Acrylamide in Food. Geneva, Switzerland. Available from: www.who.int/fsf.
- Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly, PJ, Bennett, MK, Burt, AD. (1995). Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology.* 22(4 Pt 1), 1175-1781.
- Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. (2006). Liver regeneration. *Hepatology.* 43(2 Suppl. 1), S45-S53.
- Fennell TR, Sumner SC, Snyder RW, Burgers J, Friedman MA. (2006). Kinetics of estimation of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.* 93, 256-267.

- Fennell TR, Sumner SC, Snyder RW, Burgess J, Spicer R, Bridson WE, Friedman MA. (2005). Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.* 85, 447-459.
- Field EA, Price CJ, Sleet RB, Marr MC, Schwetz BA, Morrissey RE. (1990). Developmental toxicity evaluation of acrylamide in rats and mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 14, 502-512.
- Friedman M, Levin CE. (2008). Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 56(15), 6113-6140.
- Friedman M. (1967). Solvent effects in reactions of amino groups in amino acids, peptides, and proteins with α,β -unsaturated compounds. *Biochemistry.* 6, 4709-4713.
- Friedman M. (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agr. Food. Chem.* 51, 4504-4526.
- Friedman MA, Duak LH, Stedham MA. (1995). A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 27(1), 95-105.
- Friedman MA, Dulak LH, Keefe RT. (1999). Effects of acrylamide on rat hormone levels in a 28-day drinking water study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Unpublished results.
- Fuhr U, Boettcher MI, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A, Taubert D, Tomalik-Scharte D, Pournara P, Jakob V, Harlfinger S, Klaassen T, Berkessel A, Angerer J, Sörgel F, Schömig E. (2006). Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 15(2), 266-271.
- Galli S, Kalesnikoff J, Grimbaldston M, Piliponsky A, Williams C, Tsai M. (2005b). Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23,749-786.
- Galli S, Nakae S, Tsai M. (2005a). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6(2), 135-142.
- Gamboa da Costa G, Churchwell MI, Hamilton LP, Von Tungeln LS, Beland FA, Marques MM, Doerge DR. (2003). DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem. Res. Toxicol.* 16(10), 1328-1337.
- Ganey PE, Bailie MB, VanCise S, Colligan ME, Madhukar BV, Robinson JP, Roth RA. (1994). Activated neutrophils from rat injured isolated hepatocytes. *Lab. Invest.* 70, 53-60.
- Garland TO, Patterson M. (1967). Six cases of acrylamide poisoning. *Br. Med. J.* 4, 134-138.
- Gebhardt R. (1992). Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol. Ther.* 53(3), 275-354.

- Generoso WM, Sega GA, Lockhart AM, Hughes LA, Cain KT, Cain KT, Cacheiro NLA, Shelby MD. (1996). Dominant lethal mutation, heritable translocations, and unscheduled DNA synthesis induced in male mouse germ cells by glycidamide, a metabolite of acrylamide. *Mutat. Res.* 371, 175-183.
- Gerlach E, Denticke B, Dreisbach RH. (1963). Zum Verhalten von Nucleotiden und Ihren Dephosphorylierten Ablauprodukten in der Niere bei Ischemie und Kurzzeitiger post-Ischemiker Wiederdurchblutung. *Fleuger. Arch. Ges. Physiol.* 278, 296-315.
- Germain A, Garrido A, Canas P, Llanos A, Valenzuela A. (1987). Differences in the lipid peroxidative status, cytochrome P-450 content and microsomal oxygen consumption between right and left lobes of the liver in fetal sheep. Comparison with maternal liver. *Biochem. Int.* 15(3), 571-577.
- German Federal Environment Agency (Umweltbundesamt). (2008). Acrylamide and Human Biomonitoring: Opinion of the Human Biomonitoring Commission of the German Federal Environment Agency (Umweltbundesamt) *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz.* 51, 98-108.
- Ghanayem BI, Witt KL, Kissling GE, Tice RR, Recio L. (2005). Absence of acrylamide-induced genotoxicity in CAP2E1-null mice. Evidence consistent with a glycidamide-mediated effect. *Mutat. Res.* 578, 284-297.
- Ghez C, Thach WT. (2000). The cerebellum. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds). *Principles of neural science.* (4th ed). McGraw-Hill. New York. pp. 832-852.
- Gilfillan A, Peavy R, Metcalfe D. (2009). Amplification mechanisms for the enhancement of antigen-mediated mast cell activation. *Immunol. Research.* 43(1-3), 15-24.
- Godin A-C, Bengtsson B, Niskanen R, Tareke E, Tornqvist M, Forslund K. (2002). Acrylamide and *N*-methylacrylamide poisoning in a herd of Charolais crossbreed cattle. *Vet. Rec.* 151, 724-728.
- Gökmen V, Senyuva HZ. (2006). A simplified approach for the kinetic characterization of acrylamide formation in fructose-asparaginase model system. *Food Addit. Contam.* 23, 348-354.
- Gokmen V, Senyuva HZ. (2007). Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chem.* 103, 196-203.
- Gorzinski KM, Johnson KA; Campbell RA, Morden DC, Tollett JT. (1994). Acrylamide: interim data from a 2-year drinking water chronic toxicity-oncogenicity study in Fisher 344 rats. Draft Report. Mammalian and Environmental Toxicology Research Laboratory. The Dow Chemical Company, Midland, Michigan.
- Granath F, Ehrenberg L, Paulsson B, Tornqvist M. (2001). Cancer risk from exposure to occupational acrylamide. *Occup. Environ. Med.* 58, 608-609.

- Granath FN, Vaca CE, Ehrenberg LG, Tornqvist MA. (1999). Cancer risk estimation of genotoxic chemicals based on target dose and a multiplicative model. *Risk. Anal.* 19, 309-320.
- Gupta RP, Abou-Donia MB. (1996). Alterations in the neutral proteinase activities of central and peripheral nervous systems of acrylamide-, carbon disulfide-, or 2,5-hexanedione-treated rats. *Mol. Chem. Neuropathol.* 29, 53-66.
- Haber LH, Maier A, Kroner OL, Kohrman MJ. (2009). Evaluation of human relevance and mode of action for tunica vaginalis mesotheliomas resulting from oral exposure to acrylamide. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 53(2), 134-149.
- Habermann CE. (1991). Acrylamide. In JJ Kroschwitz and M Howe-Grant, E Kirk-Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th ed, Vol. 1. New York, US: J. Wiley & Sons. pp. 251-266.
- Hagmar L, Tornqvist M, Nordander C, Rosen I, Bruze M, Kautiainen A, Magnusson AL, Malmberg B, Aprea P, Granath F, Axmon A. (2001). Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarker of internal dose. *Scand. J. Work Environ. Health.* 27, 219-226.
- Hagmar L, Wirfalt E, Paulsson B, Tornqvist M. (2005). Differences in hemoglobin levels of acrylamide in the general population with respect dietary intake, smoking habits and gender. *Mutat. Res.* 580, 157-165.
- Hakkola J, Pelkonen O, Pasanen M, Raunio H. (1998). Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human fetoplacental unit: role in intrauterine toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 35-72.
- Hakkola J, Pelkonen O, Pasanen M, Raunio H. (1998). Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human fetoplacental unit: role in intrauterine toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 28(1), 35-72.
- Harada T, Enomoto A, Boorman GA, Maronpot RR. (1999). Liver and gallbladder. In: Maronpot RR (ed). *Pathology of the mouse*. Cache River Press, Vienna. pp. 119-126.
- Harbrecht BG, Billiar TR, Curran RD, Stadler J, Simmons RL. (1993). Hepatocyte injury by activated neutrophils *in vitro* is mediated by proteases. *Ann. Surg.* 218, 120-128.
- Hashimoto K, Aldo K. (1975). Alternation of amino acid incorporation into nervous system as an indicator of chemically induced neuropathy. *Adverse Eff. Environ. Chem. Psychotropic Drugs.* 1, 185-188.
- Hashimoto K, Ando K. (1973). Alternation of amino acid incorporation into proteins of the nervous system *in vitro* after administration of acrylamide to rats. *Biochem. Pharmacol.* 22, 1057-1066.

- Hashimoto K, Sakamoto J, Tani H. (1981). Neurotoxicity of acrylamide and related compounds and their effects on male gonads in mice. *Arch. Toxicol.* 47, 179-189.
- Hays AM, Aylward LL. (2008). Biomonitoring Equivalents dossier for acrylamide (AA) (CAS No. 79-06-1). *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 51, S57-S67.
- Haywood S. (1981). The non-random distribution of copper within the liver of rats. *Br. J. Nutr.* 45(2), 295-300.
- He FS, Zhang SL, Wang HL, Li G, Zhang ZM, Li FL, Dong XM, Hu F. (1989). Neurological and electroneuromyographic assessment of the adverse effects of acrylamide on occupationally exposed workers. *Scand. J. Work Environ. Health.* 15, 125-129.
- He Q, Kim J, Sharma RP. (2005). Fumonisin B1 hepatotoxicity in mice is attenuated by depletion of Kupffer cells by gadolinium chloride. *Toxicology* 207, 137-147.
- Hebda PA, Collins MA, Tharp MD. (1993). Mast cell and myofibroblast in wound healing. *Dermatol. Clin.* 11(4), 685-696.
- Heudorf U, Hartmann E, Angerer J. (2009). Acrylamide in children-exposure assessment via urinary acrylamide metabolites as biomarkers. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 212(2), 135-141.
- Higashikuni N, Nara M, Nakagawa S, Sutou S. (1994). 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2) is a weak *in vivo* clastogen as revealed by the micronucleus assay. *Mutat. Res.* 320, 149-156.
- Hinchman CA, Ballatori N. (1994). Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. *J. Toxicol. Environ. Health.* 41(4), 387-409.
- Hissink AM, Oudshoorn MJ, Van Ommen B, Van Bladeren PJ. (1997). Species and strain differences in the hepatic cytochrome P450-mediated biotransformation of 1,4-dichlorobenzene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145(1), 1-9.
- Ho JS, Buchweitz JP, Roth RA, Ganey PE. (1996). Identification of factors from rat neutrophils responsible for cytotoxicity to isolated hepatocytes. *J. Leukoc. Biol.* 59, 716-724.
- Ho W-H, Wang S-M, Yin H-S. (2002). Acrylamide disturbs the subcellular distribution of GABA receptor in brain neurons. *J. Cell. Biochem.* 85, 561-571.
- Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van der Brandt PA. (2008). Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder and prostate cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 87, 1428-1438.
- Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van der Brandt PA. (2007). A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2304-2313.

- Horiguchi N, Ishac EJ, Gao B. (2007). Liver regeneration is suppressed in alcoholic cirrhosis: correlation with decreased STAT3 activation. *Alcohol*. 41(4), 271-280.
- Huang C, Wong GW, Ghildyal N, Gurish MF, Sali A, Matsumoto R, Qiu WT, Stevens RL. (1997). The tryptase, mouse mast cell protease 7, exhibits anticoagulant activity *in vivo* and *in vitro* due to its ability to degrade fibrinogen in the presence of the diverse array of protease inhibitors in plasma. *J. Biol. Chem.* 272 (50), 31885-31893.
- Husain R, Dixit R, Das M, Seth PK. (1987). Neurotoxicity of acrylamide in developing rat brain: changes in the levels of brain biogenic amines and activities of monoamine oxidase and acetylcholine esterase. *Ind. Health*. 25, 19-28.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1986). Some Chemicals Used in Plastics and Elastomers. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon, France. Vol. 39, 403.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1994). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Acrylamide. Some industrial chemicals. Lyon, France. Vol 60, 389-433.
- Imai T, Cho YM, Hasumura M, Hirose M. (2005). Enhancement by acrylamide of *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced rat mammary tumor development-possible application for a model to detect co-modifiers of carcinogenesis. *Cancer Lett.* 230, 25-32.
- Imai T, Takami S, Cho YM, Hirose M, Nishikawa A. (2008). A 12-week toxicological study of orally administered acr in juvenile rats. *The Toxicologist*. Poster 480. Annual Meeting of the Society of Toxicology. Seattle, Washington.
- Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. (1986). Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(12):4464-4468.
- Irwin RD, Boorman GA, Cunningham ML, Heinloth AN, Malarkey DE, Paules RS. (2004). Application of toxicogenomics to toxicology: basic concepts in the analysis of microarray data. *Toxicol. Pathol.* 32(Suppl 1), 72-83.
- Irwin RD, Parker JP, Lobenhofer EK, Burka LT, Blackshear PE, Vallant MK, Lebetkin EH, Gerken DF, Boorman GA. (2005). Transcriptional profiling of the left and median liver lobes of male F344 rats following exposure to acetaminophen. *Toxicol. Pathol.* 33(1), 111-117.
- Ito Y, Bethea NW, Abril ER, McCuskey RS. (2003). Early hepatic microvascular injury in response to acetaminophen toxicity. *Microcirculation* 10, 391-400.
- JCR (Joint Research Centre, European Commission). (2002). Risk assessment report acrylamide. First priority list, vol. 24.

- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2005). Summary and conclusions. Sixtyfourth meeting, 8-17 February, Rome, Italy. <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/en/>
- Jeong WI, Jeong DH, Do SH, Kim YK, Park HY, Kwon OD, Kim TH, Jeong KS. (2005). Mild hepatic fibrosis in cholesterol and sodium cholate diet-fed rats. *J. Vet. Med. Sci.* 67(3), 235-242.
- JIFSAN/NCFST. (2002). Overview of acrylamide toxicity and metabolism. Acrylamide food workshop: scientific issues, uncertainties, and research strategies.
- Johnson K, Gorzinski S, Bodner K, Campbell R. (1984). Acrylamide: A two-year drinking water chronic toxicity-oncogenicity study in Fischer 344 rats. Dow Chemical. Midland, MI. Unpublished Report.
- Johnson KA, Gorzinski KM, Bobner KM, Campbell RA, Wolf MA, Friedman RW. (1986). Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fisher 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85(2), 154-168.
- Johnsrud EK, Koukouritaki SB, Divakaran K, Brunengraber LL, Hines RN, McCarver DG. (2003). Human hepatic CYP2E1 expression during development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307(1), 402-407.
- Johnsrud K, Koukouritaki SB, Divakaran K, Brunengraber LL, Hines RN, Mccarver DG. (2003). Human hepatic CYP2E1 expression during development. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 307, 402-407.
- Ju C, Reilly TP, Bourdi M, Radonovich MF, Brady JN, George JW, Pohl LR. (2002). Protective role of Kupffer cells in acetaminopheninduced hepatic injury in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1504-1513.
- Kahn D, Kajani M, Zeng Q, Lai HS, Eagon PK, Makowka L, Starzl TE, Van Thiel DH. (1988). Effect of partial portal vein ligation on hepatic regeneration. *J. Invest. Surg.* 1(4), 267-276.
- Kanna VK, Husain R, Seth PK. (1988). Low protein diet modifies acrylamide neurotoxicity. *Toxicology.* 49, 395-401.
- Kanwar S, Kubes P. (1994). Ischemia/reperfusion-induced granulocyte influx is a multistep process mediated by mast cells. *Microcirculation.* 1(3), 175-182.
- Karin M. (2006). Nuclear factor NF- κ B in cancer development and progression. *Nature.* 441, 431-436.
- Kemplay S, Cavanagh JB. (1984). Effects of acrylamide and other sulfhydryl compounds *in vivo* and *in vitro* on staining of motor nerve terminals by the zinc iodide-osmium technique. *Muscle Nerve.* 7, 94-100.

- Khan IA, Reddy BV, Mahboob M, Rahman MF, Jamil K. (2001). Effect of phosphorothionate on the reproductive system of male rats. *J. Environ. Sci. Health. B.* 36, 445-456.
- Khan MA, Devis CA, Foley GI, Friedman MA, Hansen LG. (1999). Changes in thyroid gland morphology after acute acrylamide exposure. *Toxicol. Sci.* 47, 151-157.
- Kharbanda KK, Rogers DD, Wyatt TA, Sorrell MF, Tuma DJ. (2004). Transforming growth factor-beta induces contraction of activated hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* 41, 60-66.
- Kiernan F. (1833). The anatomy and physiology of the liver. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 123, 711-770.
- Kirman CR, Gargas ML, Deskin R, Tonner-Navarro L, Andersen ME. (2003). A physiologically based pharmacokinetic model for acrylamide and its metabolite, glycidamide in the rat. *J. Toxicol. Environ. Health.* 66(3), 253-274.
- Kjuus H, Goffeng LO, Heirer MS, Sjöholm H, Övrebö S, Skaug V, Paulsson B, Törnqvist M, Brudal S. (2004). Effects on the peripheral nervous system of tunnel workers exposed to acrylamide and N-methyloacrylamide. *Scand. J. Work Environ. Health.* 30(1), 21-29.
- Klaunig JE, Kamendulis LM. (2005). Mechanisms of acrylamide induced rodent carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Boil.* 561, 49-62.
- Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr. (1998). The Role of Oxidative Stress in Chemical Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives.* 106(2), 289-295.
- Ko HM, Chen WP, Hsieh ST. (2002). Neuropathology of skin denervation in acrylamide-induced neuropathy. *Neurobiol. Dis.* 11, 155-165.
- Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. (1999). A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 6(2), 171-175.
- Kolek E, Simko P, Simon P (2006) Effect of NaCl on the decrease of acrylamide content in a heat-treated model food matrix. *J. Food Nutr. Res.* 45, 17-20.
- Konings EJ, Baars AJ, van Klaveren JD, Spanjer MC, Resen PM, Hiemstra M, van Kooij JA, Peters PW. (2003). Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1569-1579.
- Konstandi M, Cheng J, Gonzalez FJ. (2013). Sex steroid hormones regulate constitutive expression of Cyp2e1 in female mouse liver. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304(10), 1118-1128.
- Kopp EK, Dekant W. (2009). Toxicokinetics of acrylamide in rats and humans following single oral administration of low doses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235, 135-142.

- Koyama N, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Takashima Y, Hayashi M, Matsufuji H, Yamagata K, Masuda S, Kinae N, Honma M. (2006). Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.* 603, 151-158.
- Krause WJ. (2005). *Krause's Essential Human Histology for Medical Students*. (3rd ed). University of Missouri School of Medicine, Columbia, Missouri. pp. 192-197.
- Kresse M, Latta M, Kunstle G, Riehle HM, van Rooijen N, Hentze H, Tiegs G, Biburger M, Lucas R, Wendel A. (2005). Kupffer cell-expressed membrane-bound TNF mediates melphalan hepatotoxicity via activation of both TNF receptors. *J. Immunol.* 175, 4076-4083.
- Krishnakumar T, Visvanathan R. (2014). Acrylamide in food products: A Review. *J. Food. Process. Technol.* 5(7), 344. doi:10.4172/2157-7110.1000344
- Kurebayashi H, Ohno Y. (2006). Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. *Arch. Toxicol.* 80, 820-828.
- Kurose I, Higuchi H, Kato S, Miura S, Watanabe N, Kamegaya Y, Tomita K, Takaishi M, Horie Y, Fukuda M, Mizukami K. (1997). Oxidative stress on mitochondria and cell membrane of cultured rat hepatocytes and perfused liver exposed to ethanol. *Gastroenterology.* 112(4), 1331-1343.
- Kütting B, Schettgen T, Schwegler U, Fromme H, Uter W, Angerer J, Drexler H. (2009). Acrylamide as risk environmental noxious agent. A health risk assessment for the general population based on the internal acrylamide burden. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 212(5), 470-480.
- Kütting B, Uter W, Drexler H. (2008). The association between self-reported acrylamide intake and hemoglobin adducts as biomarker of exposure. *Cancer Causes Control.* 19, 273-281.
- LaBrecque D. (1994). Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am. J. Gastroenterol.* 89 (8 Suppl), S86-96.
- Lafferty JS, Kamendulis LM, Kaster J, Jiang J, Klaunig JE. (2004). Subchronic acrylamide treatment induces a tissue-specific increase in DNA synthesis in the rat. *Toxicol. Lett.* 154(1-2), 95-103.
- Laskin DL, Pilaro AM, Ji S. (1986). Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. II. Mechanism of macrophage accumulation and activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86, 216-226.
- Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, Van Hul N, Geerts A. (2007). Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *J. Hepatol.* 47(1), 142-156.
- Lehning EJ, Balaban CD, Ross JF, LoPachin RM. (2002b). Acrylamide neuropathy. II. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in brainstem and spinal cord. *Neurotoxicology.* 23, 415-429.

- Lehning EJ, Balaban CD, Ross JF, LoPachin RM. (2003). Acrylamide neuropathy. III. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in forebrain. *Neurotoxicology*. 24, 125-136.
- Lehning EJ, Balaban CD, Ross JF, Reid MA, LoPachin RM. (2002a). Acrylamide neuropathy. I. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in rat cerebellum. *NeuroToxicology*. 23, 397-414.
- Lehning EJ, Persuad A, Dyer KR, Jortner BS, LoPachin RM. (1998). Biochemical and morphologic characterization of acrylamide peripheral neuropathy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 211-221.
- LeQuesne PM. (1985). Clinical and morphological findings in acrylamide toxicity. *NeuroToxicology*, 17-24.
- Lin CY, Lin YC, Kuo HK, Hwang JJ, Lin JL, Chen PC, Lin LY. (2009). Association among acrylamide, blood insulin, and insulin resistance in adults. *Diabetes Care*. 32(12), 2206-2211.
- Lin SY, Cui H, Yusta B, Belsham DD. (2004). IGF-1 signaling prevents dehydroepiandrosteron (DHEA)-induced apoptosis in hypothalamic neurons. *Mol. Cell. Endocrinol.* 214, 127-135.
- Lindros KO, Oinonen T, Issakainen J, Nagy P, Thorgeirsson SS. (1997). Zonal distribution of transcripts of four hepatic transcription factors in the mature rat liver. *Cell Biol. Toxicol.* 13(4-5), 257-262.
- Lipscomb JC, Meek M, Krishnan K, Kedderis GL, Clewell H, Haber LT. (2004). Incorporation of pharmacokinetic and pharmacodynamic data into risk assessments. *Toxicol. Mech. Methods* 14, 145-158.
- Lofstedt RE. (2003). Science communication and the Swedish acrylamide “alarm”. *J. Health Commun.* 8(5), 407-432.
- LoPachin R, Barber D, He D, Das S. (2006). Acrylamide inhibits dopamine uptake in rat striatal synaptic vesicles. *Toxicol. Sci.* 89, 224-234.
- LoPachin RM, Balaban CD, Ross JF. (2003). Acrylamide axonopathy revisited. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 188, 135-153.
- LoPachin RM. (2002). The role of fast axonal transport in acrylamide pathophysiology: Mechanism or epiphenomenon? *neurotoxicology*. 23, 253-257.
- LoPachin RM. (2004). The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 25, 617-630.
- LoPachin RM. (2005). Acrylamide neurotoxicity: neurological, morphological and molecular endpoints in animal models. *Adv. Exp. Med. Boil.* 561, 21-37.

- Lunz JG. 3rd, Tsuji H, Nozaki I, Murase N, Demetris AJ. (2005). An inhibitor of cyclin-dependent kinase, stress-induced p21(Waf-1/Cip-1), mediates hepatocyte mito-inhibition during the evolution of cirrhosis. *Hepatology*. 41(6), 1262-1271.
- MacSween RNM, Desmet VJ, Roskams T, Scothorne RJ. (2002). Developmental anatomy and normal structure. In: MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP (eds). *Pathology of the Liver*. Churchill Livingstone, New York. pp. 1-66.
- Maier A, Kohrman MJ, Hertzberg R, Allen B, Haber L, Dourson M. (2012). Critical review of dose-response options for F344 rat mammary tumors for acrylamide - additional insights based on mode of action. *Food Chem. Toxicol.* 50(5), 1763-1775.
- Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol. Pathol.* 33(1), 27-34.
- Mall FB. (1906). A study of the structural unit of the liver. *Am. J. Anat.* 5, 227-308.
- Manière I, Godard T, Doerge DR, Churchwell MI, Guffroy M, Laurentie M, Poul JM. (2005). DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. *Mutat Res*, 580, 119-129.
- Manjanatha MG, Aidoo A, Shelton SD, Bishop ME, McDaniel LP, Lyn-Cook LE, Doerge DR. (2006). Genotoxicity of acrylamide and its metabolite glycidamide administered in drinking water to male and female Big Blue mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 6-17.
- Marsh GM, Lucas LJ, Youk AO; Shall LC. (1999). Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occup. Environ. Med.* 56, 181-190.
- Marsh GM, Youk AO, Buchanich JM, Kant IJ, Swaen G. (2007). Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: updated follow up. *J. Occup. Environ. Med.* 49, 82-85.
- Marshall JS. (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 4(10), 787-799.
- Martenson CH, Sheetz MP, Graham DG. (1995). *In vitro* acrylamide exposure alters growth cone morphology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131, 119-129.
- Matsuzaki S, Onda M, Tajiri T, Kim DY (1997). Hepatic lobar differences in progression of chronic liver disease: correlation of asialoglycoprotein scintigraphy and hepatic functional reserve. *Hepatology*. 25(4), 828-832.
- Mavier P, Preaux AM, Guigui B, Lescs MC, Zafrani ES, Dhumeaux D. (1988). *In vitro* toxicity of polymorphonuclear neutrophils to rat hepatocytes: Evidence for a proteinase-mediated mechanism. *Hepatology* 8, 254-258.
- McCollister D, Oyen F, Rowe V. (1964). Toxicology of acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6, 172-181.

- McCollister D, Oyen F, Rowe V. (1964). Toxicology of acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6, 172-181.
- Metcalf DD, Baram D, Mecori YA. (1997). Mast cells. *Physiol. Rev.* 77(4), 1033-1079.
- Metcalf DD, Peavy RD, Gilfillan AM. (2009). Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124(4), 639-646.
- Michael SL, Pumford NR, Mayeux PR, Niesman MR, Hinson JA. (1999). Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology.* 30, 186-195.
- Michalopoulos GK, DeFrances M. (2005). Liver regeneration. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 93, 101-134.
- Michalopoulos GK. (2007). Liver Regeneration. *J. Cell Physiol.* 213(2), 286-300.
- Miller MG, Mulholland DJ, Vogl AW. (1999). Rat testis motor proteins associated with spermatid translocation (dynein) and spermatid flagella (kinesin-II). *Biol. Reprod.* 60(4), 1047-1056.
- Miller MJ, Carter DE, Sipes IG. (1982). Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63, 36-44.
- Miller MS, Spencer PS. (1985). The mechanism of acrylamide axonopathy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 643-666.
- Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature.* 419(6906), 448-449.
- Moulin V, Castilloux G, Auger FA, Garrel D, O'Connor-McCourt MD, Germain L. (1998). Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 238(1), 283-293.
- Mucci LA, Adami HO, Wolk A. (2006). Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. *Int. J. Cancer.* 118, 169-173.
- Mucci LA, Dickman PW, Steinek G, Adami H-O, Augustsson K. (2003). Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder. Absence of an association in a population-based study in Sweden. *Br. J. Cancer.* 88, 84-89.
- Mucci LA, Lindblad P, Steinek G, Adami HO. (2004). Dietary acrylamide and cancer risk renal cell cancer. Short Report. *Int. J. Cancer.* 109, 774-776.
- Mucci LA, Sandin S, Bälter K, Adami HO, Magnusson C, Weiderpass E. (2005). Acrylamide intake and breast cancer risk in Sweden women. *JAMA* 293(11), 1326-1327.
- Mulders TM, Breiner DD, Mulder GJ. (1992). Glutathione conjugates in men. In *Human Drug Metabolism*. Jeffery EG, ed. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 133-142.

- Muttucumaru N, Elimore JS, Curtis T Mottram DS, Parry MAJ, Halford NG. (2008). Reducing acrylamide precursor in raw materials derived from wheat and potato. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6167-6172.
- Nicholson DW, Thornberry A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22(8), 299-306.
- Noli C, Miolo A. (2001). The mast cell in wound healing. *Vet. Dermatol.* 12(6), 303-313.
- Nong A, McCarver DG, Hines RN, Krishnan K. (2006). Modeling interchild differences in pharmacokinetics on the basis of subject-specific data on physiology and hepatic CYP2E1 levels: a case study with toluene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214, 78-87.
- Norris MV. (1967). Acrylamide. In F Dee Snell and CL Hilton, *Encyclopedia of industrial chemical analysis*, Vol. 4: Ablative materials to alkaloids. New York, US: Interscience Publishers. pp. 160-168.
- NTP-ATSDR (National Toxicology Program, US Department Of Health and Human Services Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology and Environmental Medicine/Applied Toxicology). (2009). Draft toxicological profile for acrylamide. 1600 Clifton Road NE Mailstop F-62 Atlanta, Georgia 30333.
- NTP-CERHR (National Toxicology Program, US Department Of Health and Human Services Public Health Service. Center For The Evaluation Of Risks To Human Reproduction). (2005). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Acrylamide. NIH Publication No. 05-4472.
- Nunomura W, Takakuwa Y, Higashi T. (1994). Changes in serum concentration and mRNA level of rat C-reactive protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1227(1-2), 74-78.
- Nunomura W. (1990). C-reactive protein in rat: in development, pregnancy and effect of sex hormones. *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.* 96(4), 489-493.
- Odland I, Romert L, Clemedson C; walum E. (1994). Glutathione content, glutathione transferase activity and lipid peroxidation in acrylamide-treated neuroblastoma NIE 115 cells. *Toxicol. In Vitro.* 8, 263-267.
- Oku T, Takahashi M. (2001). *Biochemistry*. Nankondo, Tokyo. p. 120.
- Olesen PT, Olsen A, Frandsen H, Frederiksen K, Overvard K, Tjønneland A. (2008). Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish diet, cancer and health study. *Int. J. Cancer.* 122, 2094-2100.
- Pantusa VP, Stock TH, Morandi MT, Harrist RB, Afshar M. (2002). Inhalation exposures to acrylamide in biochemical laboratories. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 63, 468-473.
- Pari L, Kumar NA. (2002). Hepatoprotective activity of *Moringa oleifera* on antitubercular drug-induced liver damage in rats. *J. Med. Food.* 5, 171-177.

- Park HR, Kim MS, Kim SJ, Park M, Kong KH, Kim HS, Kwack SJ, Kang TS, Kim SH, Kim HS, Lee J. (2010). Acrylamide induces cell death in neural progenitor cells and impairs hippocampal neurogenesis. *Toxicol. Lett.* 193(1), 86-93.
- Park J, Kamendulis LM, Friedman MA; Klaunig JE. (2002). Acrylamide-induced cellular transformation. *Toxicol. Sci.* 65, 177-183.
- Parzefall W. (2008). Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1360-1364.
- Paulet GV. (1975). De la toxicite de quelques esters acryliques et methacryliques de l'acrylamide et des polyacrylamides. *Arch. Mal. Prof.* 36, 58-60.
- Paulsson B, Granath F, Grawe J, Ehrenberg L, Törnqvist M. (2001). The multiplicative model for cancer risk assessment: applicability to acrylamide. *Carcinogenesis.* 22, 817-819.
- Paulsson B, Grawé J, Törnqvist M. (2002). Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment. *Mutat. Res.* 516, 101-111.
- Paulsson B, Kotova N, Grawe J, Henderson A, Granath F, Golding B; Törnqvist M. (2003). Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutat. Res.* 535, 15-24.
- Pedreschi F, Maria SM, Kit G. (2014). Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *J. Sci. Food Agric.* 15, 9-12.
- Peisajovich A, Marnell L, Mold C, Du Clos TW. (2008). C-reactive protein at the interface between innate immunity and inflammation. *Exper. Rev. Clin. Immunol.* 4(3), 379-390.
- Pelucchi C, Galeone C, Levi F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Bosetti C, Giacosa A, La Vecchia C. (2006). Dietary acrylamide and human cancer. *Int. J. Cancer.* 118, 467-471.
- Pepys MB, Baltz M, Gomer K et al. (1979). Serum amyloid P-component is an acute-phase reactant in the mouse. *Nature* 278(5701), 259-261.
- Perez HL, Cheong HK, Yang JS, Osterman-Golkar S. (1999). Simultaneous analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by gas chromatography-mass spectrophotometry. *Anal. Biochem.* 274, 59-68.
- Petersen B. (2002). Exposure and biomarkers. JIFSAN/NCFST. Acrylamide in Food Workshop. <http://www.jifsan.umd.edu/Acrylamide/acrylamideworkshop.html>
- Petersen BJ, Tran N. (2005). Exposure to Acrylamide. In: Friedman M i Mottram D (eds). *Chemistry and safety of acrylamide in food. Advances in experimental medicine and biology.* 561, 63-76.

- Porter AG, Jänicke RU. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6(2), 99-104.
- Prins HA, Meijer C, Boelens PG, Diks J, Holtz R, Masson S, Daveau M, Meijer S, Scotte M, van Leeuwen PA. (2004). Kupffer cell-depleted rats have a diminished acute-phase response following major liver resection. *Shock* 21, 561-565.
- Puppel N, Tjaden Z, Fueller F, Marko D. (2005). DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutat. Res.* 580(1-2), 71-80.
- Puppel N, Tjaden Z, Fueller F, Marko D. (2005). DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutat. Res.* 580, 71-80.
- Radi ZA, Koza-Taylor PH, Bell RR, Obert LA, Runnels HA, Beebe JS, Lawton MP, Sadis S. (2011). Increased serum enzyme levels associated with kupffer cell reduction with no signs of hepatic or skeletal muscle injury. *Am. J. Pathol.* 179, 240-247.
- Raju J, Sondagar C, Roberts J, Aziz SA, Caldwell D, Vavasour E, Mehta R. (2011). Dietary acrylamide does not increase colon aberrant crypt foci formation in male F344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 49(6), 1373-1380.
- Ramaiah SK. (2007). A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food. Chem. Toxicol.* 45, 1551-1557.
- Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. (1954). Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat. Rec.* 119(1), 11-33.
- Ratziu V, Friedman SL. (1997). Pathobiology of hepatic stellate cells. In: Vidal-Vanaclocha F (ed). *Functional Heterogeneity of Liver Tissue: From Cell Lineage Diversity to Sublobular Compartment-Specific Pathogenesis*. RG Landes Company, Austin. pp. 133-160.
- Rawi SM, Marie MAS, Fahmy SR and El-Abied SA. (2012). Hazardous effects of acrylamide on immature male and female rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* Vol. 6(18), 1367-1386.
- Reed DJ. (1994). Mechanisms of chemically induced injury and cellular protection mechanisms. In: Hodgson E, Levi PE (eds). *Introduction of Biochemical Toxicology*. (2nd ed). Appleton & Lange, Norwalk, pp: 265-295.
- Rhoades RA, Tanner GA. (2003). *Medical Physiology*. (2nd ed). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Rice JM. (2005). The carcinogenicity of acrylamide. *Mutat. Res.* 580, 3-20.
- Richardson FC, Boucheron JA, Dyroff MC, Popp JA, Swenberg JA. (1986). Biochemical and morphologic studies of heterogeneous lobe responses in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*. 7(2), 247-251.

- Roberts RA, Ganey PE, Ju C, Kamendulis LM, Rusyn I, Klaunig JE. (2007). Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* 96(1), 2-15.
- Russo A, Gabbani G, Simoncini B. (1994). Weak genotoxicity of acrylamide on premeiotic and somatic cells of the mouse. *Mutat. Res.* 309, 263-272.
- Sadler TW. (2010). *Langman's Medical Embryology*. (11th ed). Lippincott Williams & Wilkins, New York.
- Sagerback D, Callemann CJ, Schroeder JL, Costa LG, Faustman EM. (1995). Formation of *N*-7-(2-carbamoyl—hidroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [¹⁴C]acrylamide. *Carcinogenesis*. 16, 1161-1165.
- Sakamoto J, Hashimoto K. (1986). Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice—effects on fertility and sperm morphology. *Arch. Toxicol.* 59, 201-205.
- Sánchez J, Cabrer JM, Rosselló CA, Palou A, Picó C. (2008). Formation of hemoglobin adducts of acrylamide after its ingestion in rats is dependent on age and sex. *J. Agric. Food. Chem.* 56(13), 5096-5101.
- Sánchez J, Carber JM, Rosselló CA, Palou A, Picó C. (2008). Formation of hemoglobin adducts of acrylamide after its ingestion in rats is dependent on age and sex. *J. Agric. Food Chem.* 56(13), 5096-5101.
- Schabecker J, Schwend T, Wink M. (2004). Reduction of acrylamide uptake by dietary proteins in a caco-2 gut model. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4021-4025.
- Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. (2005). Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 280(11), 9887-9894.
- Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. (2005). Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 280(11), 9887-9894.
- Schettgen T, Kütting B, Horing M, Beckmann MW, Weiss T, Drexler H, Angerer J. (2004). Trans-placental exposure of neonates to acrylamide – a pilot study. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 77, 213-216.
- Schettgen T, Weiss T, Drexler J, Angerer A. (2003). A first approach to estimate the internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany. *Int. J. Environ. Health.* 206, 9-14.
- Schriever-Schwemmer G, Kliesch U, Adler ID. (1997). Extruded micronuclei induced by colchicine or acrylamide contain mostly lagging chromosomes identified in paintbrush smears by minor and major mouse DNA probes. *Mutagenesis*. 12, 201-207.

- Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, van Rooijen N, Tiegs G. (2000). Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *Am. J. Pathol.* 157, 1671-1683.
- Sega GA, Alcota RP, Tancongco CP, Brimer PA. (1989). Acrylamide binding to the DNA and protamine of spermiogenic stages in the mouse and its relationship to genetic damage. *Mutat. Res.* 216, 221-230.
- Sega GA. (1991). Adducts in sperm protamine and DNA versus mutation frequency. *Prog. Clin. Biol. Res.* 372, 521-530.
- Segerbäck D, Calleman CJ, Schroeder JL, Costa LG, Faustman EM. (1995). Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [¹⁴C]acrylamide. *Carcinogenesis*. 16, 1161-1165.
- Settels E, Bernauer U, Palavinskas R, Klaffke HS, Gundert-Remy U, Appel KE. (2008). Human CYP2E1 mediates the formation of glycidamide from acrylamide. *Arch. Toxicol.* 82(10), 717-727.
- Sharma A, Jain J. (2008). Effects of oral exposure of acrylamide on plasma levels of thyroid hormones and haematological parameters in the Swiss albino mice. *Asian J. Exp. Sci.* 22, 317-324.
- Sharma A, Sharma R, Jain J. (2008). Biochemical changes in the liver of Swiss albino mice orally exposed to acrylamide. *Mj. Int. J. Sci. Tech.* 2(03), 542-550.
- Shelby MD, Cain KT, Cornett CV, Generoso WM. (1987). Acrylamide: induction of heritable translocation in male mice. *Environ. Mutagen.* 9(4), 363-368.
- Shier D, Butler J, Lewis R. (2007). *Hole's human anatomy & physiology*. (11th ed). McGraw-Hill, New York.
- Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, Macdonald N, Clewell H, Allen B, Van Landingham C. (2006). Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 36(6-7), 481-608.
- Shiraishi Y. (1978). Chromosome aberrations induced by monomeric acrylamide in bone marrow and germ cell of mice. *Mutat. Res.* 57(3), 313-324.
- Shulman GI. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106(2), 171-176.
- Sickles DW, Sperry AO, Testino A, Friedman M. (1996). Acrylamide effects on kinesin-related proteins of the mitotic/meiotic spindle. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222(1), 111-121.
- Sickles DW. (1992). Toxic neurofilamentous axonopathies and fast anterograde axonal transport. IV. *In vitro* analysis of transport following acrylamide and 2,5-hexanedione. *Toxic. Lett.* 61(2-3), 199-204.

- Smith CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ. (2000). IARC group 2A carcinogens reported in cigarette main-stream smoke. *Food Chem. Toxicol.* 38, 371–83.
- Smith EA, Pruen SL, Oehme FW. (1996). Environmental degradation of polyacrylamides. 1. Effects of artificial environmental conditions: temperature, light and pH. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35(2), 121-135.
- Smith MT, Orrenius S. (1984). Drug metabolism and drug toxicity. In: Mitchel JR i Horning MG (eds). Raven Press, New York. pp: 71-78.
- SNFA (Swedish National Food Agency). (2002). Press release, 24 April 2002. Available at <http://www.skv.se>
- Sohn M, Ho CT. (1995). Ammonia generation during thermal degradation of amino acids. *J. Agric. Food Chem.* 43, 3001-3003.
- Solomon JJ, Fedyk J, Mukai F, Segal A. (1985). Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following *in vitro* reaction with acrylamide. *Cancer Res.* 45(8), 3465-3470.
- Solomon JJ. (1999). Cyclic adducts and intermediates induced by simple epoxides. *IARC Sci. Publ.* 123-135.
- Solter P, Liu Z, Guzman R. (2000). Decreased hepatic ALT synthesis is an outcome of subchronic microcystin-LR toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164(2), 216-220.
- Sörgel F, Weissenbacher R, Kinzig-Schippers M, Hofmann A, Illauer M, Skott A, Landersdorfer C. (2002). Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy.* 48(6), 267-274.
- Spencer PS, Schaumburg HH. (1974). A review of acrylamide neurotoxicology. Part I. Properties, uses and human exposure. *Can. J. Neurol. Sci.* 1(12), 151-169.
- Spencer PS, Schaumburg HH. (1978). Pathobiology of neurotoxic axonal degeneration. In: Physiology and pathobiology of axons. Waxman SG (ed). Raven Press, New York. p. 265-282.
- Srivistava SP, Sabri MI, Agrawal AK, Seth PK. (1986). Effect of single and repeated dose of acrylamide and bis-acrylamide on glutathione-S-transferase and dopamine receptors in rat brain. *Brain Res.* 371(2), 319-323.
- Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Reideker S. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature.* 419(6906), 449-450.
- Standring S. (2008). *Gray's Anatomy. (40th ed) - The Anatomical Basis of Clinical Practice. Expert Consult - Online and Print.* Churchill Livingstone (Elsevier), New York.

- Stickels DW; Stone JD, Friedman MA. (2002). Fast axonal transport: A site of acrylamide neurotoxicity? *Neurotoxicology*. 23(2), 223-251.
- Sublet VH, Zenick H, Smith MK. (1989). Factors associated with reduced fertility and implantation rates in females mated to acrylamide-treated rats. *Toxicology*. 55(1-2), 53-67.
- Sumner SC, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzalez F, Ghanayem BI (1999). Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 12(11), 1110-1116.
- Sumner SC, MacNeela JP, Fennell TR. (1992). Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* 5(1), 81-89.
- Sumner SC, Selvaraj L, Nauhaus SK, Fennell TR. (1997). Urinary metabolites from F344 rats and B6C3F1 mice coadministered acrylamide and acrylonitrile for 1 or 5 days. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1152-1160.
- Sumner SC, Williams CC, Snyder RW, Krol WL, Asgharian B, Fennell TR. (2003). Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicol. Sci.* 75, 260-270.
- Svensson K, Abramsson L, Becker W, Glynn A, Hellenas KE, Lind Y, Rosen J. (2003). Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food Chem. Toxicol.* 41(11), 1581-1586.
- Švob M. (1974). *Histološke i histokemijske metode*. "Svjetlost", Sarajevo.
- Swaen GMH, Haidar S, Burns CJ, Bodner K, Parson T, Collins JJ, Baase C. (2007). Mortality study update of acrylamide workers. *J. Occup. Environ. Med.* 64(6), 396-401.
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. (2000). Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chem. Res. Toxicol.* 3(6), 517-522.
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 50(17), 4998-5006.
- Tareke E, Twaddle NC, McDaniel LP, Churchwell MI, Young JF, Doerge DR. (2006). Relationships between biomarkers of exposure and toxicokinetics in Fisher 344 rats and B6C3F1 mice administered single dose of acrylamide and glycidamide and multiple doses of acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217(1), 63-75.
- Temiz Artmann A, Akhisaroglu M, Sercan Z, Resmi H, Kayatekin BM, Yorukoglu K, Kirkali G. (2006). Adhesion of erythrocytes to endothelial cells after acute exercise: Differences in red blood cells from juvenile and adult rats. *Physiol. Res.* 55(4), 381-388.
- Thomas VA, Wheelless CJ, Stack MS, Johnson DA. (1998). Human mast cell tryptase fibrinogenolysis: kinetics, anticoagulation mechanism, and cell adhesion disruption. *Biochemistry*. 37(8), 2291-2298.

- Tilson HA. (1981). The neurotoxicity of acrylamide: an overview. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 3(4), 445-461.
- Tkaczyk C, Horejsi V, Iwaki S, Draber P, Samelson LE, Satterthwaite AB, Nahm DH, Metcalfe DD, Gilfillan AM. (2004). NTAL phosphorylation is a pivotal link between the signaling cascades leading to human mast cell degranulation following Kit activation and Fc epsilon RI aggregation. *Blood.* 104(1), 207-214.
- Tomoda Y, Hanaoka A, Yasuda T, Takayama T, Hiwatashi A. (2004). Preparing food to be cooked by heat treatment and removing polyvalent cations by flushing with water. US Patent Application 20040126469.
- Tong GC, Cornwell WK, Means GE. (2004). Reactions of acrylamide with glutathione and serum albumin. *Toxicol. Lett.* 147(2), 127-131.
- Totani N, Ojiri Y. (2007). Mild ingestion of used frying oil damages hepatic and renal cells in Wistar rats. *J. Oleo. Sci.* 56(5), 261-267.
- Totani N, Satoh K, Tsuji S, Yamaguchi A. (2006). Effects of deteriorated frying oil in Wistar rats. *J. Oleo. Sci.* 55, 291-297.
- Totani N, Yawata M, Ojiri Y, Fujiokoa Y. (2007). Effects of trace acrylamide intake in Wistar rats. *J. Oleo. Sci.* 56(9), 501-509.
- Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, Critchlow ND, Nakao A, Chan MH, Lotze MT, Geller DA, Billiar TR. (2005). Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. *J. Immunol.* 175(11), 7661-7668.
- Tyl RW, Friedman MA, Losco PE, Fisher LC, Johnson KA, Strother DE, Wolf CH. (2000a). Rat two-generation reproduction and dominant lethal study of acrylamide in drinking water. *Reprod. Toxicol.* 14(5), 385-401.
- Tyl RW, Friedman MA. (2003). Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod. Toxicol.* 17(1), 1-13.
- Tyl RW, Marr MC, Myers CB, Ross WP, Friedman MA. (2000b). Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats. *Reprod. Toxicol.* 14(2), 147-157.
- Urban M, Kavvadias D, Riedel K, Scherer G, Tricker AR. (2006). Urinary mercapturic acids and a hemoglobin adduct for the dosimetry of acrylamide exposure in smokers and nonsmokers. *Inhal. Toxicol.* 18(10), 831-839.
- US EPA (Environmental Protection Agency). (1988). Preliminary assessment of health risks from exposure to acrylamide. Washington, DC: Office of Toxic Substances, US Environmental Protection Agency.

- US EPA (Environmental Protection Agency). (1994). Chemical summary for acrylamide. Office of Pollution Prevention and Toxics. US Environmental Protection Agency (September 1994), http://www.epa.gov/chemfact/s_acryla.txt
- Veenapani SN, Meena Bai M, Uma A, Venkatasubbaiah K, Rao KJ, Thyagaraju K. (2010). Glutathione S transferase protein, nucleic acid, chromatin, cell nuclei and structural variation analysis of erythrocyte, bone marrow cell and hepatocytes of rats under the influence of acrylamide. *The Bioscan*. 5, 477-481.
- Vieira I, Sonnier M, Cresteil T. (1996). Developmental expression of CYP2E1 in the human liver. Hypermethylation control of gene expression during the neonatal period. *Eur. J. Biochem*. 238(2), 476-483.
- Vieira I, Sonnier, M, Cresteil T. (1996). Developmental expression of CYP2E1 in the human liver hypermethylation control of gene expression during the neonatal period. *Eur. J. Biochem*. 238(2), 476-483.
- Vuković R. (1994). Dinamika promena sinusoidalnog volumena jetre u uslovima hladne ishemije. Doktorska disertacija. Novi Sad, 525-568.
- Walker K, Hattis D, Russ A, Sonawane B, Ginsberg G. (2007). Approaches to acrylamide physiologically based toxicokinetic modeling for child-adult dosimetry differences. *J. Toxicol. Environ. Health Part A*. 70(24), 2033-2055.
- Wang H, Huang P, Lie T, Li J, Hutz RJ, Li K, Shi F. (2010). Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reprod. Toxicol*. 29(2), 225-230.
- Wang H, Huang P, Lie T, Li J, Hutz RJ, Li K, Shi F. (2010). Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Rep. Toxicol*. 29(2), 225-230.
- Weibel ER. (1979). *Stereological methods: Vol 1. Practical methods for biological morphometry*. Academic Press, New York.
- West DA, James NH, Cosulich SC, Holden PR, Brindle R, Rolfe M, Roberts RA. (1999). Role for tumor necrosis factor a receptor 1 and interleukin-1 receptor in the suppression of mouse hepatocyte apoptosis by the peroxisome proliferator nafenopin. *Hepatology* 30(6), 1417-1424.
- WHO (World Health Organization). (1996). *Acrylamide. Guidelines for drinking-water quality*. Geneva, WHO 2, 541-547.
- Wise LD, Gordon LR, Sper KA, Duchai DM, Morrissey RE. (1995). Developmental neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprague-Dowley rats. *Neurotoxicol. Teratol*. 17(2), 189-198.
- Yang H-J, Lee S-H, Jin Y, Choi J-H, Han D-U, Chae C, Lee M-H, Han C-H. (2005). Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reprod. Toxicol*. 19(4), 527-534.

- Ye Q, Lian F, Chavez PR, Chung J, Ling W, Qin H, Seitz HK, Wang XD. (2012). Cytochrome P450 2E1 inhibition prevents hepatic carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in alcohol-fed rats. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 1(1), 5-18.
- Yoshimura S, Imai K, Saitoh Y, Yamaguchi H, Ohtaki S. (1992). The same chemicals induce different neurotoxicity when administered in high doses for short term or low doses for long term to rats and dogs. *Mol. Chem. Neuropathol.* 16(1-2), 59-84.
- Young JF, Luecke RH, Doerge DR. (2007). Physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for acrylamide and its metabolites in mice, rats, and humans. *Chem. Res. Toxicol.* 20(3), 388-399.
- Yousef MI, El-Demerdash FM. (2006). Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology.* 219(1-3), 133-141.
- Zaidi SI, Raisuddin S, Singh KP, Jafri A, Husain R, Husain MM, Mall SA, Seth PK, Ray PK. (1994). Acrylamide induced immunosuppression in rats and its modulation by 6-MFA, an interferon inducer. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 16(2), 247-260.
- Zenick H, Hope E, Smith MK. (1986). Reproductive toxicity associated with acrylamide treatment in male and female mice. *J. Toxicol. Environ. Health.* 17(4), 457-472.
- Zhang X, Cao J, Jiang L, Geng C, Zhong L. (2009). Protective effect of hydroxytyrosol against acrylamide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. *Mutat. Res.* 12, 664(1-2), 64-68.
- Zhang X, Jiang L, Geng C, Yoshimura H, Zhong L. (2008). Inhibition of acrylamide genotoxicity in human liver-derived HepG2 cells by antioxidant hydroxytyrosol. *Chem. Biol. Interact.* 176(2-3), 173-178.
- Zhang X. (2009). Simultaneous exposure to dietary acrylamide and corn oil developed carcinogenesis through cell proliferation and inhibition of apoptosis by regulating p53-mediated mitochondria-dependent signaling pathway. *Toxicol. Ind. Health.* 25(2), 101-109.
- Zhang Z, Liew CW, Handy DE, Zhang Y, Leopold JA, Hu J, Guo L, Kulkarni RN, Loscalzo J, Stanton RC. (2010). High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis. *FASEB J.* 24(5), 1497-1505.
- Zhou XF, Wang Q, Chu JX, Liu AL. (2006). Effects of retrorsine on mouse hepatocyte proliferation after liver injury. *World J. Gastroenterol.* 12(9), 1439-1442.
- Zhou Y, Eppenberger-Castori S, Marx C, Marx C, Yau C, Scott GK, Eppenberger U, Benz CC. (2006). Activation of nuclear factor-NF- κ B (NF- κ B) identifies a high-risk subset of hormone-dependent breast cancers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37(5), 1130-1144.
- Zodl B, Schmid D, Wassler G, Gundacker C, Leibetseder V, Thalhammer T, Ekmekcioglu C. (2007). Intestinal transport and metabolism of acrylamide. *Toxicology.* 232(1-2), 99-108.

INTERNET IZVORI

AbD Serotec, Kidlington, UK: <http://www.abdserotec.com/>, pristupljeno 05.11.2014.

Acrylamide Infonet: <http://www.acrylamide-food.org/>, pristupljeno 28.02.2013.

CFSN/FDA Exploratory Survey: http://www.cfsan.fda.gov/_dms/acrydata.html i http://www.cfsan.fda.gov/_dms/acrydat2.html, pristupljeno 26.07.2014.

Crown Human Genome Center, Department of Molecular Genetics, the Weizmann Institute of Science, <http://www.genecards.org/>, pristupljeno 04.02.2014.

http://www.abcam.com/products?keywords=CD68&selected_productType=Primary+antibodies&selected.targetName=CD68 pristupljeno 10.06.2015

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2E1&search=cyp2e1> pristupljeno 10.06.2015

<http://www.genecards.org/index.php?path=/Search/keyword/gst> pristupljeno 10.06.2015

JIFSAN/NCFST/FDA (Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition/National Center for Food Safety and Technology). Acrylamide in Food Workshop: http://www.jifsan.umd.edu/Acrylamide/acrylamide_workshop.html, pristupljeno 10.12.2013.

Thermo Scientific, Fremont, USA: <https://www.thermoscientific.com/en/home.html>, pristupljeno 05.11.2014.

US EPA: <http://www.epa.gov/agriculture/ag101/pestlethal.html> pristupljeno 25.05.2015.

US EPA: http://www.epa.gov/risk_assessment/glossary.htm, pristupljeno 26.05.2015.

WHO/FAO Acrylamide: http://www.who.int/fsf/Acrylamide/Acrylamide_index.html, pristupljeno 16.05.2015

SLIKE:

Slika 1.1.1: <http://www.embryology.ch/anglais/sdigestive/leber02.html>

Slika 1.1.2: <http://www.healthhype.com/wp-content/uploads/liver1.jpg>

Slika 1.1.3: <http://illuminationstudios.com/wp-content/uploads/2011/10/liverLobule.jpg>

Slika 1.1.4: http://faculty.harford.edu/faculty/WRappazzo/a_oldsite/liver%20histology.jpg

Slika 1.1.5: https://classconnection.s3.amazonaws.com/686/flashcards/4143686/png/picture_25-145BAB96B055654414A.png

Slika 1.1.6:

<https://classconnection.s3.amazonaws.com/975/flashcards/1102975/png/untitled31331273150605.png>

Slika 1.1.7:

<http://www.plosbiology.org/article/slideshow.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pbio.0030192&imageURI=info:doi/10.1371/journal.pbio.0030192.g011>

Slika 1.1.8: [http://3.bp.blogspot.com/-](http://3.bp.blogspot.com/-VGRYDexxknE/U6BNSTHOkRI/AAAAAAAAA98/wuw7j76bPa4/s1600/Liver4+hakeem-sy.gif)

[VGRYDexxknE/U6BNSTHOkRI/AAAAAAAAA98/wuw7j76bPa4/s1600/Liver4+hakeem-sy.gif](http://3.bp.blogspot.com/-VGRYDexxknE/U6BNSTHOkRI/AAAAAAAAA98/wuw7j76bPa4/s1600/Liver4+hakeem-sy.gif)

Slika 1.1.9: [http://web.uni-](http://web.uni-plovdiv.bg/stu1104541018/docs/res/skandalakis%27%20surgical%20anatomy%20-%202004/Chapter%2019_%20Liver_fichiers/loadBinaryCASOZ427.jpg)

[plovdiv.bg/stu1104541018/docs/res/skandalakis%27%20surgical%20anatomy%20-%202004/Chapter%2019_%20Liver_fichiers/loadBinaryCASOZ427.jpg](http://web.uni-plovdiv.bg/stu1104541018/docs/res/skandalakis%27%20surgical%20anatomy%20-%202004/Chapter%2019_%20Liver_fichiers/loadBinaryCASOZ427.jpg)

Slika 1.2.1: [http://1.bp.blogspot.com/-](http://1.bp.blogspot.com/-pndxdaxth_U/VKPzmXLgAKI/AAAAAAAAADY/Q8P_XMr1NGs/s1600/acrylamide%2Ba.png)

[pndxdaxth_U/VKPzmXLgAKI/AAAAAAAAADY/Q8P_XMr1NGs/s1600/acrylamide%2Ba.png](http://1.bp.blogspot.com/-pndxdaxth_U/VKPzmXLgAKI/AAAAAAAAADY/Q8P_XMr1NGs/s1600/acrylamide%2Ba.png)

Slika 1.2.2: <http://pubs.acs.org/cen/images/8040/8040notw1a.ce.gif>

Slika 1.4.1: <http://cebp.aacrjournals.org/content/15/2/266/F1.large.jpg>

Slika 1.5.1: <http://media.americanlaboratory.com/m/20/Article/35889-fig1.jpg>

Lista skraćénica

VIII LISTA SKRAĆENICA

AA ⇒ Akrilamid

AA-GS ⇒ konjugati AA i GSH

AAMA ⇒ AA-merkapturična kiselina

ACGIH ⇒ American Conference of Governmental Industrial Hygienists

ALP ⇒ Alkalna fosfataza

ALT ⇒ Alanin aminotransferaza

AST ⇒ Aspartat aminotransferaza

CaCo-2 ⇒ linija humanih ćelija kolona/debelog creva

cAMP ⇒ ciklični adenzin monofosfat

CAS No ⇒ jedinstveni identifikacioni broj hemikalije, jedinjenja, polimera, biološke komponente, smeše ili legure dodeljen od strane Američkog hemijskog društva (*engl.* Chemical Abstracts Service Registry Numbers)

CNS ⇒ centralni nervni sistem

CRP ⇒ C-reaktivni protein

CYP2E1 ⇒ Citohrom P450 2E1 enzim

EC No ⇒ može predstavljati: sedmocifreni registracioni broj hemikalije koja je komercijalno dostupna unutar Evropske Unije (*engl.* European Community number for chemicals within EU regulatory schemes) ili registracioni broj enzima dodeljen od strane europske komisije (*engl.* Enzyme Commission number for enzymes)

ECHA ⇒ European Chemicals Agency

FAO/WHO ⇒ Food and Agricultural Organization, World Health Organization

FGF ⇒ faktor rasta fibroblasta (*engl.* Fibroblast growth factor)

GA ⇒ Glicidamid

GA-GS ⇒ konjugati GA i GSH

GAMA ⇒ GA-merkapturična kiselina

GSH ⇒ aminokiselina glutation

GST ⇒ Glutatacion-S-transferaza

H&E ⇒ Hematoksilin-eozin metoda bojenja

i.p. ⇒ intraperitonealno

i.v. ⇒ intravenozno

IARC ⇒ International Agency for Research on Cancer

IGFBP2 ⇒ vezujući protein za za insulin-slični gaktor rasta 2 (*engl.* Insulin-like growth factor binding protein 2)

IGFBP4 ⇒ vezujući protein za za insulin-slični gaktor rasta 4 (*engl.* Insulin-like growth factor binding protein 4)

IGFBP5 ⇒ vezujući protein za za insulin-slični gaktor rasta 5 (*engl.* Insulin-like growth factor binding protein)

IGFR2 ⇒ receptor za insulin-slični gaktor rasta 2 (*engl.* Insulin-like growth factor 2 receptor)

IRS-1/2 ⇒ proteini koji se vezuju za insulinski receptor (*engl.* Insulin receptor substrate 1 i 2)

JECFA ⇒ Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive

LD₅₀ (*engl.* lethal dosage 50) ⇒ jeste standardna mera akutne toksičnosti za neku supstancu, izražava se u mg/kg tm i predstavlja individualnu dozu date supstance koje je dovoljna da izazove smrt kod 50% jedinki testirane populacije životinja (pacova, miševa, zamoraca, zečeva itd.). Na osnovu ove doze je moguće porediti relativnu toksičnost toksičnih supstanci. Niža vrednost LD₅₀ podrazumeva da je data supstanca toksičnija

LOAEL ⇒ (*engl.* Lowest observed adverse effect level) jeste najniži nivo izloženosti datoj supstanci pri kom se javlja biološki značajno povećanje frekventnosti ili stepena ozbiljnosti štetnih efekata između izložene populacije i adekvatne kontrole (www.epa.gov)

MCF7 ⇒ linija ćelija humanog kancera dojke

N3-GA-Ade ⇒ N3-(2-carbamil-2-hidroksietil)adenin; forma "GA-DNA adukta" sa adeninom DNK

N7-GA-Gua \Rightarrow N7-(2-carbamil-2-hidroksietil)guanin; forma "GA-DNA adukta" sa guaninom DNK

NF- κ B \Rightarrow nuklearni faktor kapa B

NGF \Rightarrow nervi faktor rasta (*engl.* Nerve growth factor)

NOAEL \Rightarrow (*engl.* No observed adverse effect level) jeste najviši nivo izloženosti datoj supstanci pri kome nema biloški značajnog povećanja frekventnosti ili stepena ozbiljnosti štetnih efekata između izložene populacije i adekvatne kontrole (www.epa.gov).

p.o. \Rightarrow per os, per oralno

PAM \Rightarrow poli-akrilamid

PAS \Rightarrow Periodic acid-Schiff

PDGF \Rightarrow faktor rasta poreklom iz trombocita (*engl.* Platelet-derived growth factor)

PNS \Rightarrow periferni nervni system

ppb \Rightarrow 1 deo na 1 000 000 000 [10^{-9}], označava milijarditi deo jedne celine, i koristi se za vrlo velika razblaženja (*engl.* parts-per-billion); ovakve bezdimenzione veličine imaju brojilac i imenilac u istoj dimenzijiji; npr. $\mu\text{g}/\text{kg}$; ppb = $\mu\text{g}/\text{kg}$ = 1 μg na 1 000 000 000 μg

ppm \Rightarrow 1 deo na 1 000 000 [10^{-6}], označava milioniti deo jedne celine, i koristi se za vrlo velika razblaženja (*engl.* parts-per-million); ovakve bezdimenzione veličine imaju brojilac i imenilac u istoj dimenzijiji, npr mg/kg ; ppm = mg/kg = 1 mg na 1 000 000 mg

ROS \Rightarrow reaktivne kiseonične vrste (*engl.* Reactive Oxygen Species) ili slobodni radikali

STAT3 \Rightarrow transkripcioni aktivator 3 (*engl.* Signal transducer and activator of transcription 3)

T3 \Rightarrow Trijodtironin, hormon tireoidne žlezde

T4 \Rightarrow Tetrajodtironin ili tiroksin, hormon tireoidne žlezde

TB \Rightarrow toluidie blue metoda bojenja

TBS \Rightarrow Tris puffer (*engl.* Tris-buffered saline)

tm \Rightarrow telesna masa

TNF- α \Rightarrow tumor nekrosis faktor alfa (*engl.* Tumor necrosis factor alpha)

TSH \Rightarrow Tireo-stimulirajući hormon

US EPA \Rightarrow United States Environmental Protection Agency

VEGF \Rightarrow vaskularni endotelijalni faktor rasta (*engl.* Vascular endothelial growth factor)

N_{vh} [mm^{-3}] \Rightarrow numerička gustina hepatocita

$N_{vh_{bn}}$ [mm^{-3}] \Rightarrow numerička gustina binuklearnih ukupnih Ki-67-pozitivnih hepatocita

N_{vh_t} [mm^{-3}] \Rightarrow numerička gustina ukupnih Ki-67-pozitivnih hepatocita

V_{vh} [mm^3/mm^3] \Rightarrow volumenska gustina hepatocita

$V_{vh_{bn}}$ [mm^3/mm^3] \Rightarrow volumenska gustina binuklearnih ukupnih Ki-67-pozitivnih hepatocita

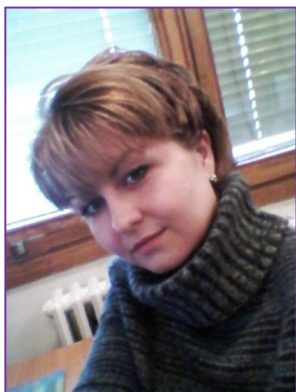
V_{vh_c} [mm^3/mm^3] \Rightarrow volumenska gustina citoplazme hepatocita

V_{vh_n} [mm^3/mm^3] \Rightarrow volumenska gustina nukleusa u hepatocitima

V_{vh_t} [mm^3/mm^3] \Rightarrow volumenska gustina ukupnih Ki-67-pozitivnih hepatocita

V_{v_s} [mm^3/mm^3] \Rightarrow volumenska gustina sinusoidnih prostora

BIOGRAFIJA



Renata Kovač rođena je 16. maja 1985. godine u Somboru.

Osnovne akademske studije biologije, smer: diplomirani biolog-molekularni biolog, upisala je školske 2004/2005. godine na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Diplomski rad na temu: „*Efekte niskofrekventnog elektromagnetnog zračenja na mastocite tireoidne žlezde pacova*“, odbranila je 09. septembra 2008. godine.

Master akademske studije biologije, smer: diplomirani biolog-master, molekularni biolog, na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, upisala je školske 2008/2009. godine. Završni (master) rad na temu: „*Efekte elektromagnetne i medikamentozne terapije eksperimentalne osteoporoze na strukturu tireoidne žlezde pacova*“, odbranila je 25. septembra 2009. godine. Doktorske akademske studije biologije upisuje na istom fakultetu, u oktobru 2009. godine.

Učestvovala je na projektu pod nazivom: „*Delovanje ekstremno nisko-frekventnog elektromagnetnog polja na strukturu endokrinih žlezda i kožu*“ (153001B), Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, u periodu od 2008. do 2010. godine. Na projektu pod nazivom: „*Razvoj i primena novih i tradicionalnih tehnologija u proizvodnji konkurentnih prehrambenih proizvoda sa dodatkom vrednošću za domaće i svetsko tržište*“ (III 46001), Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije učestvuje od 2011. godine.

U svom dosadašnjem naučno-istraživačkom radu bavila se istraživanjima iz oblasti histologije, objavila je 40 radova i saopštenja, od kojih su 3 iz kategorije M20.

Od 2008. godine je angažovana u izvođenju praktične nastave (vežbi) iz grupe histoloških predmeta: Histologija sa embriologijom, Preparacija ćelije i tkiva životinja, Zoologija hordata i Endokrinologija, na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Novi Sad, 29. februar 2016. godine

.....

Renata Kovač

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Renata Kovač
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Milica Matavulj Redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Uticaj subhroničnog tretmana akrilamidom na histološke i biohemijske karakteristike jetre juvenilnih mužjaka pacova
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srpski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno- matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja: 8 / stranica: 194 / slika: 22 / grafikona: 22 / tabela: 10 / referenci 393)
Naučna oblast: NO	Biologija

Naučna disciplina: ND	Histologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	akrilamid, subhronični tretman, jetra, juvenilni pacovi, histohemija, imunohistohemija, serološke analize
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad, Republika Srbija
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Akrilamid (CASR No. 79-06-1) predstavlja veoma reaktivni, hidrosolubilni monomer za koji se smatra da ima toksične i potencijalno kancerogene efekte po zdravlje ljudi. Štetne posledice akrilamida i njegovog još reaktivnijeg metabolita, glicidamida, su dokazane kod eksperimentalnih životinja i podrazumevale su neurotoksičnost, genotoksičnost i kancerogenost. Epidemiološke studije rađene na ljudima pokazale su da akrilamid izaziva neurotoksične efekte, dok se genotoksičnost i kancerogenost još smatraju potencijalnim efektima, a zasnivaju se na podacima koji su dobijeni u okviru istraživanja na laboratorijskim životinjama. Njegove štetne posledice na jetru, posebno kod mladog organizma, još uvek nisu dovoljno istražene.</p> <p>Akrilamid se spontano formira u hrani koja je bogata ugljenim hidratima, tokom termičke obrade namirnica na visokim temperaturama. Ovaj monomer se formira tokom tzv. neenzimatske Mallard-ove reakcije, kojom se dobijaju smeđe komponente u hrani. U namirnicama ovaj monomer se formira reakcijom između redukujućih šećera (uglavnom glukoze ili fruktoze) i aminokiseline (dominantno asparagina).</p> <p>Imajući na umu da je jetra centralni organ za metabolizam akrilamida, ovo istraživanje je imalo za cilj da ispita glavne histološke i biohemijske promene na jetri juvenilnog organizma pacova, nakon njegove subhronične ekspozicije akrilamidu. Istraživanje je rađeno na 3 eksperimentalne grupe peripubertalnih/juvenilnih mužjaka Wistar pacova, od kojih su dve bile tretirane vodenim rastvorom akrilamida u dozi od 25 ili 50 mg/kg telesne mase, dok je treća grupa služila kao kontrola i primala destilovanu vodu. Životinje su bile tretirane oralno, putem gavaže, 5 dana nedeljno, tokom 3 nedelje. Nakon 24 h od poslednjeg tretmana, životinje su uvedene u etarsku anesteziju i dekapitovane, a zatim su prikupljeni krv i uzorci tkiva jetre.</p> <p>Tkivo jetre je uzeto iz srednjeg lobusa, fiksirano u 10% neutralnom puferisanom formalinu tokom 24 h i obrađeno prema standardnom protokolu za parafinsko kalupljenje. Ukalupljeni uzorci jetre su zatim isečeni na serijske preseke tkiva debljine 5 μm, a zatim bojeni histohemijskim i imunohistohemijskim metodama. Uzorci krvi su pripremljeni za serološku analizu.</p> <p>Histološka analiza preseka bojenih hematoksilin-eozin (H&E) metodom nije zabeležila prisustvo značajnih razlika u opštoj arhitekturi jetre i njenoj lobularnoj organizaciji među eksperimentalnim grupama. Stereološka analiza je ukazala na mikrostrukturne promene kod hepatocita i jetrinih sinusoida. Rezultati sugerišu, na</p>

dozno-zavisno povećanje volumena hepatocita, njihove citoplazme i nukleusa, i dozno-zavisno smanjenje volumena sinusoida, u odnosu na kontrolne uzorke jetre.

Analiza glikogena je rađena na presecima jetre bojenim metodom Periodic acid-Schiff-a (PAS), gde se uočilo smanjenje količine glikogena u grupi tretiranoj nižom dozom akrilamida, dok je u grupi tretiranoj većom dozom uočena njegova akumulacija, u odnosu na kontrolne životinje.

Imunopozitivnost hepatocita na marker proliferacije, Ki-67, bila je smanjena u grupi pacova tretiranoj nižom dozom, a bila povećana u grupi tretiranoj većom dozom akrilamida pri komparaciji sa kontrolom. Stereološki nalazi su potvrdili inicijalnu histološku analizu.

Imunopozitivnost hepatocita na marker apoptoze, Caspase 3, je bila smanjena kod obe grupe životinja tretiranih akrilamidom u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, imunopozitivnost neparenhinskih ćelija jetre, pretežno Kupffer-ovih ćelija, je bila uvećana u obe tretirane grupe pri komparaciji sa kontrolom.

Imunopozitivnost Kupffer-ovih ćelija na marker CD68 je bila smanjena u uzorcima jetre kod oba tretmana akrilamidom u odnosu na kontrolu.

Populacija mastocita, prikazana toluidine-blue (TB) metodom bojenja, bila je uvećana kod obe grupe pacova tretiranih akrilamidom u poređenju sa kontrolom. Povećanje brojnosti ovih ćelija je bilo posebno prominentno kod njihove degranulisane subpopulacije. Stereološka analiza je potvrdila histološke nalaze.

Serumska analiza je pokazala uvećanu aktivnost aspartat aminotrasferaze (AST) i smanjenu aktivnost alanin aminotrasferaze (ALT) kod obe grupe životinja tretiranih akrilamidom u odnosu na kontrolu. Aktivnost alkalne fosfataze (ALP) je bila uvećana u grupi tretiranoj nižom dozom, a smanjena u grupi tretiranoj većom dozom akrilamida, u odnosu na kontrolu. Vrednosti koncentracije ukupnih serumskih proteina kao i koncentracije C reaktivnog proteina (CRP) nisu pokazale značajnije promene među eksperimentalnim grupama.

Oba akrilamidna tretmana su izazvala gubitak telesne mase kod tretiranih pacova, u odnosu na kontrolne životinje.

Postojeći podaci ukazuju na prominentni hepatotoksični potencijal akrilamida koji može poremetiti mikrostrukturne osobine i funkcionalni status hepatocita kod jetre mladog organizma. Akrilamid može značajno poremetiti funkcionalnost jetre, obzirom da se promene na celularnom nivou mogu relativno brzo odraziti na nivo tkiva, a kasnije ugroziti i homeostazu celog organizma.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	21. januar 2016. godine
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: dr Matilda Đolai, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Gordana Ušćebrka, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Milica Matavulj, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu</p>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Renata Kovac
Mentor: MN	Dr Milica Matavulj, full professor, Faculty of Sciences, Novi sad
Title: TI	Histological and biochemical features of the liver in juvenile male rats following subchronic acrylamide exposure
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad, Republic of Serbia

Physical description: PD	Chapters: 8 / pages: 194 / figures: 22 / graphs: 22 / tables: 10 / references: 393
Scientific field SF	Biology
Scientific discipline SD	Histology
Subject, Key words SKW	acrylamide, subchronic treatment, liver, juvenile rat, histochemistry, immunohistochemistry, biochemical analysis
UC	
Holding data: HD	The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad, Republic of Serbia
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Acrylamide (CASR No. 79-06-1) is highly reactive, water-soluble monomer which is considered as toxic and potentially cancer causing chemical to humans. Adverse health effects regarding acrylamide and its more reactive metabolite, glycidamide, were detected in experimental animals, and included neurotoxicity, genotoxicity, and carcinogenicity. Human epidemiological studies claim that acrylamide has neurotoxic effects, while genotoxicity and carcinogenicity are considered as potential human health risks only on the basis of animal studies. Its harmful effects on the liver, especially in a young organism, are still to be elucidated.</p> <p>Acrylamide is spontaneously formed in carbohydrate-rich food during high-temperature processing. It is formed during heat-induced non-enzymatic reaction, also known as the Maillard browning reaction, between reducing sugars (glucose and fructose), and free amino acids (mainly asparagine).</p> <p>Having in mind that acrylamide metabolism takes place in a liver, the study aimed to investigate the main histological and biochemical changes in the liver of juvenile rat following subchronic acrylamide intoxication. Study was performed on peripubertal/juvenile male Wistar rats, divided in 3 experimental groups, two of which were treated with acrylamide in doses of 25 or 50 mg/kg of body weight, while the third group served as the control and received distilled water. Animals were treated orally, <i>via gavage</i>, 5 days a week, during 3 weeks. Animals were anesthetized by ether inhalation and decapitated 24 hrs after the last treatment.</p> <p>Liver tissue was sampled from the middle lobe, fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 hrs, routinely processed for paraffin embedding and cut into 5-μm thick serial sections for subsequent histochemical and immunohistochemical staining. Blood samples were collected for subsequent biochemical analysis.</p> <p>Histological examination of haematoxylin and eosin (H&E) stained sections did not point to any major alteration in main in liver lobular architecture or organization among the experimental groups. Stereological analysis revealed a microstructural</p>

changes in hepatocytes and liver sinusoids. The analysis detected a dose-dependant increase in the volume of hepatocytes, their cytoplasm and nuclei, and dose-dependant decrease in the volume of liver sinusoids compared to the control, respectively.

Glycogen analysis was performed on Periodic acid–Schiff (PAS) stained sections which showed glycogen reduction in the low-dose group, and its accumulation in the high-dose group, compared to the control, respectively.

Immunopositivity in hepatocytes for Ki-67 protein, a known marker for proliferation, showed a decrease in low-dose group, while in high-dose group was detected its increase compared to the control, respectively. Stereological analysis confirmed initial histological observation.

Caspase 3 immunopositivity, a known marker for apoptosis, proved to be decreased in hepatocytes in both acrylamide-treated groups when compared to the control. On the other hand, immunopositivity was increased in non-parenchymal cell, predominantly in Kupffer cells, in comparison to the control.

Immunopositivity for CD68, a marker for Kupffer cells, proved to be decreased in both acrylamide-treated groups when compared to the control.

Population of the mast cells, visualized on toluidine blue (TB) stained sections, showed its increase in both acrylamide-treated groups, in comparison to the control. The increase was especially prominent regarding a degranulated subpopulation of these cells. Subsequent stereological analysis confirmed histological findings.

Serum analysis showed increased activity of aspartate aminotransferase (AST), and decreased activity of alanine aminotransferase (ALT) in both AA-treated groups, while the activity of alkaline phosphatase (ALP) was increased in low-dose, but decreased in high-dose group compared to the control, respectively. The concentration of total serum proteins as well as concentration of C reactive protein (CRP) did not show any major changes among the experimental groups.

Body weight measurements showed that all acrylamide-treated rats lost their body weight as opposed to the control rats whose body mass increased.

Present results suggest a prominent hepatotoxic potential of acrylamide which might alter the microstructural features and functional status in hepatocytes of immature liver. Acrylamide may cause significant perturbation in liver functionality which may be reflected from cellular to the tissue level, thereby endangering the whole body's homeostasis.

Accepted on Senate on: AS	21 st January 2016.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: dr Matilda Đolai, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad member: dr Gordana Ušćebrka, Full Professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad member: dr Milica Matavulj, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad