

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Emilija Z. Brdarić

**KARAKTERIZACIJA MOLEKULARNIH OSNOVA
ZAŠTITNOG EFEKTA EGZOPOLISAHARIDA
LAKTOBACILA U MODELU DA PACOVA
IZLOŽENIH PRODUŽENOM DELOVANJU
KADMIJUMA(II)**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Emilija Z. Brdarić

**CHARACTERIZATION OF THE MOLECULAR BASIS
OF THE PROTECTIVE EFFECT OF THE
EXOPOLYSACCHARIDES FROM LACTOBACILLI IN
THE DA RATS MODEL EXPOSED TO PROLONGED
CADMIUM(II) EXPOSURE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023

MENTORI:

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

dr Branko Jovčić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Jelena Lozo, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Ivana Mirkov, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Mutić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu i u saradnji sa Grupom za imunotoksikologiju Odeljenja za ekologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu. Jedan deo eksperimenata je urađen u Institutu za mlečne proizvode (Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC), Asturija, Španija.

Koristim ovu priliku da se zahvalim:

Dr Milici Živković, prvenstveno na strpljenju, smirenosti i ogromnoj podršci u toku izrade ove doktorske teze. Hvala na svim korisnim savetima, uloženom vremenu i trudu koji su rezultovali ovakvim finalnim ishodom teze. Takođe, hvala na kritičkoj oceni disertacije.

Prof. dr Branku Jovčiću, zahvaljući kome sam inicijalno dobila priliku da započnem sa eksperimentalnim radom u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju. Hvala na važnim savetima, korisnim diskusijama i komentarima koji su doprineli poboljšanju ove doktorske disertacije, kao i na njenoj kritičkoj oceni.

Prof. dr Jeleni Lozo, na svim korisnim sugestijama i savetima, uloženom vremenu, kao i na kritičkoj oceni doktorske teze.

Dr Ivani Mirkov, na ogromnom trudu, neprocenjivo korisnim savetima, detaljnom planiranju eksperimenata i krucijalnoj pomoći za realizaciju dela teze koji je podrazumevao in vivo ispitivanja. Hvala i na svim sugestijama koje su dovele do finalnog izgleda ove doktorske teze, kao i na njenoj kritičkoj oceni.

Prof. dr Jeleni Mutić, na značajnim sugestijama i kritičkoj oceni teze. Ova doktorska disertacija je rezultat naše saradnje, za koju se nadam da će još dugo trajati i biti podjednako uspešna.

Hvala dr Maji Tolinački i dr Jeleni Đokić, na ukazanom poverenju, izdvojenom vremenu, strpljenju i značajnoj pomoći u toku mojih „istraživačkih“ početaka, kao i na ogromnoj podršci kako u toku njih, tako i kasnije.

Hvala mojim dragima kolegama iz Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju (Grupe 06 i 09): Amarelici, Nati, Ivani, Kaći V, Jeleni B, Milanu, Goranu J, Jovanki, Goksiju, Nemanji S, Nemanji M, Nidži V, Danki, Mini, Lazaru, Stefanu, Aleksandru, Dušanu S, Hris, Jovani, koje su svaki dan učinili zanimljivim, lakšim i kvalitetno provedenim. Ogromno hvala mojim „Slatkim pacovčićima“!

Posebno bih se zahvalila mojoj Ceci na nesebičnoj pomoći u svakom momentu od kako se znamo. Hvala na dugim razgovorima, podršci, šetnjama, smeju i svim lepim trenucima koji su rezultovali našim prijateljstvom. Dragoj Kaji hvala na divno provedenim putovanjima i brojnim uspomnama sa njih, hvala što si bila uz mene u kriznim momentima! Hvala sapatniku iz generacije, Dušku, na višegodišnjem bodrenju, razmeni iskustava i druženjima vikendima na institutu. Komšiji Mišku hvala na prijateljstvu, kao i na svim video snimcima i sarkastičnim komentarima bez kojih ne bi bilo tako interesantno. Nidžo, hvala na svakodnevnom smeju! Hvala Duši i Milkici na druženju i ulivanju pozitivne energije!

Neizmerno sam zahvalna Jeleni, Aleksandri, Dini i Anastasiji iz Grupe za imunotoksikologiju Departmana za ekologiju sa IBISS-a, koje su me uvele u rad sa životinjama i naučile tumačenje dobijenih in vivo rezultata. Hvala na nesebičnoj pomoći, trudu i optimizmu.

Hvala Patrisiji Ruas-Madiedo na ukazanim poverenju i uloženom vremenu tokom mog tromesečnog usavršavanja u njenoj laboratoriji. Patri, muchas gracias!

Prof. dr Maji Čakić Milošević hvala na uvođenju u oblast histopatologije i na detaljnim i korisnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu tezu.

Cumbi, Ivana, Nato, hvala na dugogodišnjem prijateljstvu! Kaća i Jovana, hvala što ste od detinjstva uvek tu za mene. One for all, all for one!

Deda Bogi i uji hvala na svemu.

Ima nekih blizina kojima daljina ne može ništa. Lemsi, hvala na 11 godina ljubavi i podrške! Dobro znaj! <3

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima. Mama i tata, hvala na ogromnom strpljenju, toleranciji, bodrenju, kritikama i usmeravanju. Hvala na životnim savetima i podršci, a pogotovo na bezuslovnoj ljubavi!

“Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light!”

-Prof. Albus Percival Wulfric Brian Dumbledore-

*Posvećeno babi Branki i dedi Andriji, koji su mi detinjstvo učinili
radosnim i bezbrižnim*

KARAKTERIZACIJA MOLEKULARNIH OSNOVA ZAŠTITNOG EFEKTA EGZOPOLISAHARIDA LAKTOBACILA U MODELU DA PACOVA IZLOŽENIH PRODUŽENOM DELOVANJU KADMIJUMA(II)

SAŽETAK

Kadmijum, široko rasprostranjen toksičan metal, izaziva brojne negativne zdravstvene efekte zbog čega je neophodno naći adekvatne načine zaštite od dejstva ovog metala. Poznato svojstvo nekih laktobacila da interaguju sa metalima se sve češće pripisuje prisustvu egzopolisaharida (EPS) na površini ćelije za koji je pokazano da može da formira komplekse sa jonima kadmijuma u vodenom rastvoru. Međutim, mehanizmi zaštitnog dejstva EPS na organizme nisu poznati. Među obećavajućim kandidatima iz naše laboratorijske kolekcije (BGLMM), se istakao EPS-AN8, izolovan i prečišćen iz soja *Lactiplantibacillus plantarum* BGAN8. *In silico* analiza genetičkih determinanti odgovornih za biosintezu EPS-AN8 i detaljna karakterizacija fizičko-hemijskih osobina je ukazala da je reč o heteropolisaharidu sa potencijalno visokim afinitetom za vezivanje kadmijumovih jona. Ispitivanja *in vitro* su pokazala da EPS-AN8 štiti intestinalne epitelne ćelije od negativnog dejstva kadmijuma(II), tako što snižava parametre oksidativnog stresa i inflamacije u ćelijama, i čuva međućelijske veze. S obzirom da su, za opštu populaciju, glavni izvori kadmijuma hrana i piće, ispitivanje *in vivo* zaštitnih efekta EPS-AN8 je praćeno u pacovima koji su paralelno izloženi produženom, oralnom unosu niže (5 mg/L) i više (50 mg/L) doze jona kadmijuma. Pri unosu EPS-AN8 zabeleženo je smanjeno deponovanje metala u tkivima, ublažavanje histoloških oštećenja duodenuma, jetre i bubrega, kao i sniženi parametri oksidativnog stresa i inflamacije u duodenumu. Dodatno, primećene su i slabije izražene promene u sastavu mikrobiote duodenuma karakteristične za oralnu izloženost kadmijumu(II). Pretpostavljeni mehanizmi uspostavljenе zaštite mogu biti bazirani na ogromnom kapacitetu EPS-AN8 za vezivanje kadmijumovih jona i/ili njegovim direktnim efektom na ublažavanje oštećenja izazvanih kadmijumom.

Ključne reči: kadmijum, egzopolisaharidi laktobacila, oksidativni stres, inflamacija, intestinalna barijera, mikrobiota duodenuma

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija prokariota

CHARACTERIZATION OF THE MOLECULAR BASIS OF THE PROTECTIVE EFFECT OF THE EXOPOLYSACCHARIDES FROM LACTOBACILLI IN THE DA RATS MODEL EXPOSED TO PROLONGED CADMIUM(II) EXPOSURE

ABSTRACT

Cadmium, a widespread toxic metal, causes numerous negative health effects, leading to the urgent need to find adequate protection. The known ability of some lactobacilli to interact with metals is increasingly attributed to the presence of the surface exopolysaccharides (EPS). It has been shown that EPS could form complexes with cadmium ions in aqueous solution. However, the possible mechanisms of the EPS-mediated protection in organisms are not known. Among the others candidates from our laboratory collection (BGLMM), EPS-AN8, derived from the strain *Lactiplantibacillus plantarum* BGAN8, stood out. In silico analysis of the genetic background responsible for EPS-AN8 biosynthesis and characterization of the physicochemical properties indicated that EPS-AN8 is the heteropolysaccharide with a putative high affinity for binding cadmium. In vitro assays showed that EPS-AN8 protects intestinal epithelial cells from the deleterious effect of cadmium, by lowering the parameters of oxidative stress and inflammation in cells, and maintaining intercellular junctions. For the general population, the main source of cadmium is diet. Orally given EPS-AN8, and exposure of rats to prolonged, oral intake of lower (5 mg/L) and higher (50 mg/L) dose of cadmium(II) resulted in decreased body burden of this metal, lowered level of histological damages in the duodenum, the liver and the kidneys and reduced parameters of oxidative stress and inflammation. Additionally, EPS-AN8 led to less pronounced cadmium induced changes of the duodenal microbiota composition. The possible mechanisms of the EPS-AN8 established protection may be based on its enormous capacity to adsorb cadmium ions and/or its direct effect to mitigate cadmium-provoked damages.

Key words: cadmium, exopolysaccharides from lactobacilli, oxidative stress, inflammation, intestinal barrier, duodenal microbiota

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology of prokaryotes

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Kadmijum.....	2
1.1.1. Fizičko-hemijske osobine kadmijuma i njegova primena	2
1.1.2. Sredinska dostupnost kadmijuma	3
1.1.3. Putevi unosa kadmijuma kod ljudi i njegovi biološki efekti.....	4
1.2. Efekti ingestije kadmijuma na narušavanje homeostaze u organizmu	5
1.2.1. Tanko crevo-funkcija i građa	6
1.2.2. Crevna mikrobiota.....	8
1.2.3. Imunski sistem sluzokože tankog creva.....	9
1.2.4. Mehanizmi toksičnosti oralno unetog kadmijuma	9
1.3. Strategije zaštite od toksičnog delovanja kadmijuma	12
1.3.1. Laktobacili i njihova primena u zaštiti od kadmijuma.....	13
1.3.2. Mehanizmi interakcija laktobacila sa metalima i površinske karakteristike	14
1.3.3. Egzopolisaharidi laktobacila	15
1.3.4. Biosinteza EPS i njene genetičke osnove	16
1.3.5. EPS laktobacila i uloga u zaštiti od toksičnih metala	18
2. CILJEVI RADA.....	19
3. MATERIJAL I METODE	21
3.1. Bakterijski sojevi.....	22
3.2. Hranljive podloge za kultivaciju laktobacila	22
3.3. Priprema rastvora kadmijuma i upotrebljavane koncentracije.....	22
3.4. Ispitivanje sposobnosti sojeva EPS ⁺ laktobacila da adsorbuju jone kadmijuma	22
3.5. Određivanje koncentracije kadmijuma u vodenom rastvoru	23
3.6. Izolovanje i prečišćavanje EPS	23
3.7. Metoda određivanje adsorpcione moći EPS-AN8 za jone kadmijuma.....	24
3.8. Metode rada sa DNK molekulom soja BGAN8	24
3.8.1. Izolacija totalne DNK iz soja BGAN8.....	24
3.8.2. Horizontalna gel elektroforeza DNK.....	24
3.8.3. Sekvenciranje genoma soja <i>L. plantarum</i> BGAN8.....	24
3.8.4. <i>In silico</i> analiza gena čiji su proteinski produkti uključeni u biosintezu EPS-AN8	25
3.9. Metode fizičko-hemijske karakterizacije EPS-AN8.....	25
3.9.1. Određivanje molekularne mase EPS-AN8.....	25
3.9.2. Analiza biohemijskog sastava EPS-AN8.....	25
3.9.3. Metoda infracrvene spektroskopije sa Furijevom transformacijom EPS-AN8	25
3.10. <i>In vitro</i> grupa eksperimenata na diferenciranim Caco-2 ćelijama	26
3.10.1. Caco-2 ćelije	26

3.10.2. Dizajn eksperimenata na diferenciranim Caco-2 ćelijama	26
3.11. Test citotoksičnosti	27
3.12. Izolacija totalne RNK iz diferenciranih Caco-2 ćelija	27
3.13. Lančana reakcija polimeraze „PCR“	27
3.14. Reakcija sinteze komplementarne DNK	28
3.15. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu, „qPCR“	28
3.16. SDS-PAGE	28
3.17. Western blot metoda	29
3.18. Esej propustljivosti	29
3.19. Aktivnost enzima superoksid dismutaze	29
3.20. Eksperimenti na životinjama i tretmani	30
3.20.1. Eksperimentalne životinje	30
3.20.2. Dizajn eksperimenata na DA pacovima	30
3.21. Priprema tkiva za metodu merenja koncentracije jona kadmijuma	31
3.22. Histološka analiza tkiva duodenuma, bubrega i jetre	31
3.23. Priprema homogenata duodenuma	31
3.24. Određivanje oksidativnog stresa u homogenatima	31
3.24.1. Određivanje koncentracije proteina po Lowry-ju	31
3.24.2. Procena nivoa lipidne peroksidacije	32
3.24.3. Određivanje aktivnosti katalaze	32
3.24.4. Određivanje aktivnosti enzima glutation-S-reduktaze	32
3.24.5. Određivanje količine GSH	32
3.25. Određivanje koncentracije citokina u duodenumu imunoenzimskim testom na čvrstoj fazi	33
3.26. Analiza mikrobiote duodenuma	33
3.26.1. Izolacija metagenomske DNK iz duodenuma	33
3.26.2. 16S rDNK amplikon sekvenciranje i prikaz dobijenih rezultata	33
3.27. Statistička analiza rezultata	34
4. REZULTATI	35
4.1. Utvrđivanje <i>in vitro</i> zaštitnog efekta EPS-AN8 na štetno delovanje kadmijuma(II)	36
4.1.1. Analiza izmerene sposobnosti EPS ⁺ laktobacila i izolovanog EPS-AN8 da adsorbuju jone kadmijuma	36
4.1.2. <i>In silico</i> analiza genetičkih determinanti odgovornih za biosintezu EPS-AN8	37
4.1.3. Analize fizičko-hemijskih karakteristika EPS-AN8	40
4.1.4. Određivanje subtoksične koncentracije kadmijum-hlorida na diferenciranim Caco-2 ćelijama	41
4.1.5. Utvrđivanje efekata EPS-AN8 na Caco-2 ćelije	42
4.1.6. Uticaj EPS-AN8 na smanjeno izazivanje oksidativnog stresa u diferenciranim Caco-2 ćelijama izloženih kadmijumu(II)	43

4.1.7. Uticaj EPS-AN8 na zaštitu diferenciranih Caco-2 od kadmijumom(II) izazvane inflamacije.....	44
4.1.8. Efekat EPS-AN8 na sprečavanje kadmijumom(II) indukovano g narušavanja međucelijskih veza.....	45
4.1.9. Terapijsko delovanje EPS-AN8 po nastanku kadmijumovih(II) ošćenja u diferenciranim Caco-2 ćelijama.....	46
4.2. Utvrđivanje <i>in vivo</i> zaštitnog efekta EPS-AN8 na produženu oralnu izloženost kadmijumu(II).....	48
4.2.1. Praćenje efekata oralno unetog EPS-AN8 na zdrave DA pacove.....	48
4.2.2. Osnovni podaci nakon oralnog unosa EPS-AN8 i produžene oralne izloženosti kadmijumu(II).....	50
4.2.3. Uticaj EPS-AN8 na smanjenje deponovanja kadmijuma(II) u organizmu DA pacova.....	51
4.2.4. Uticaj unosa EPS-AN8 na ublažavanje histopatoloških promena prouzrokovanih kadmijumom(II).....	52
4.2.5. Uticaj EPS-AN8 na ublaženje pojave kadmijumom(II) izazvanog oksidativnog stresa u duodenumu.....	54
4.2.6. Uticaj EPS-AN8 na sprečavanje inflamacije izazvane kadmijumom(II) u duodenumu..	55
4.2.7. Uticaj EPS-AN8 na redukovanje promena u sastavu mikrobiote izazvane kadmijumom(II).....	56
5. DISKUSIJA	61
5.1. <i>In vitro</i> mehanizmi zaštite od toksičnog delovanja kadmijuma(II) posredstvom EPS-AN8..	62
5.2. Zaštita DA pacova, posredovana EPS-AN8, od štetnih efekata produžene oralne izloženosti kadmijumu(II).....	67
6. ZAKLJUČCI.....	72
7. LITERATURA.....	75

1. UVOD

1.1. Kadmijum

1.1.1. Fizičko-hemijske osobine kadmijuma i njegova primena

Kadmijum (lat. *cadmia*, grč. *kadmeia*, Cd) je toksični metal bez poznate fiziološke funkcije u organizmu. Nemački hemičari Fridrih Štromajer i Karl Herman su ga otkrili 1817. godine u vidu nečistoće u cink-karbonatu (Nordberg, 2009). Okarakterisan je kao mekani metal, sivo-bele ili plavičasto-bele boje (Slika 1), atomskog broja 48 i relativne atomske mase 112,41. U periodnom sistemu elemenata je svrstan u 12. grupu, koja uključuje i cink i živu. Detaljnije fizičko-hemijske osobine ovog toksičnog metala su prikazane u Tabeli 1.



Slika 1. Čist metal kadmijum. Preuzeto i modifikovano sa <https://images-of-elements.com/cadmium.php>.

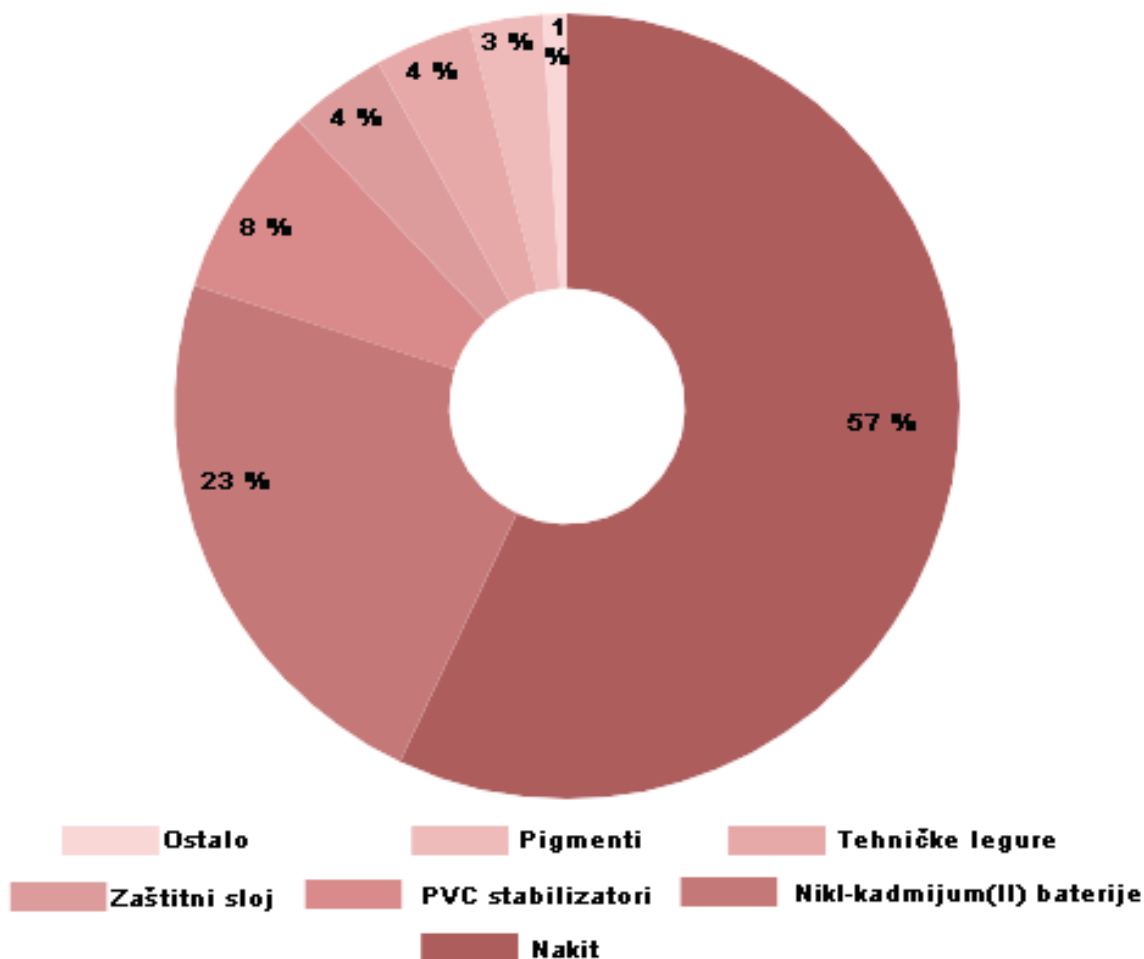
Tabela 1. Fizičko-hemijske karakteristike kadmijuma (Genchi et al., 2020b).

Tačka topljenja (°C)	321,07
Tačka ključanja (°C)	767,3
Gustina na 20°C (g/cm ³)	8,65
Toplota fuzije (kJ/mol)	6,21
Elektronska konfiguracija	[Kr]4d ¹⁰ 5s ²
Toplota isparavanja (kJ/mol)	99,6
Prva energija jonizacije (kJ/mol)	867,8
Druga energija jonizacije (kJ/mol)	1631,4

Kadmijum je postprelazni metal, sa popunjenom d orbitalom i sa 2 elektrona u s orbitali. Ima 8 stabilnih izotopa i 2 radioizotopa. U jedinjenjima se najčešće nalazi u obliku dvovalentnog jona (Cd²⁺) (IARC 1993). Lako formira jedinjenja sa halogenim elementima (fluor, hlor, brom i jod), fosforom i sumporom, ali reaguje i sa nitratima, karbonatima i acetatima (Morrow, 2010). U vazduhu sagoreva formirajući kadmijum-oksidi (Dumkova et al., 2016).

Zbog svoje osobine da ne podleže procesu korozije, kadmijum je često korišćen u procesu galvanizacije koja podrazumeva nanošenje zaštitnog sloja na legure metala, najčešće čelika i aluminijuma (Morrow, 2010). Takođe, dodat u malim količinama povećava čvrstoću, tvrdoću i otpornost legura, uz istovremeno održavanje toplotne i električne provodljivosti (Morrow, 2010). Kadmijum se globalno primenjuje kao negativna elektroda u niki-kadmijum baterijama (Genchi et al., 2020a), koje se ističu svojom snagom, dugim vekom trajanja i visokom tolerancijom na električna i fizička oštećenja (Wuana i Okieimen, 2011). Međutim, sa porastom podataka o kadmijumovoj toksičnosti aktivno je započeto sa radom na njihovoj supstituciji litijumskim baterijama. Dodatno, kadmijum-sulfid se zbog svoje nijanse koristi za proizvodnju žutih, narandžastih i crvenih pigmenta kojima su tretirani mnogobrojni proizvodi od stakla, plastike i keramike (Turner, 2019). Neretko su ih upotrebljavali i umetnici u svojim kreacijama (Genchi et al., 2020b). Zahvaljujući otpornosti na

ultraljubičastu svetlost i visoke temperature, kadmijum se koristi kao stabilizator polivinil-hlorida (PVC) (Chan et al., 1982) Osim toga, kadmijum je nezaobilazan sastojak u proizvodnji veštačkih fosfatnih đubriva (Kubier et al., 2019). U cilju dobijanja na težini i sjaju, kadmijum se često dodaje u dečiji nakit (Kern et al., 2021). Sve češća je novija primena kadmijuma u solarnoj fotovoltaznoj tehnologiji (Kwak et al., 2020) u kojoj sastav solarne ćelije može biti baziran na njegovim jedinjenjima (Mohammed et al., 2022; Thanihaichelvan et al., 2019). Pored toga, nezamenljiv je u tehnologiji infracrvene detekcije (Genchi et al., 2020b). Prema podacima za 2019. godinu Internacionalnog udruženja za kadmijum (engl. *International cadmium association*, ICDA), na globalnom nivou kadmijum se najčešće primenjuje u proizvodnji nakita i baterija (Slika 2).



Slika 2. Najčešće primene kadmijuma u svetu do 2019. godine. U Evropskoj Uniji je strogo zabranjeno korišćenje kadmijuma u svrhu pravljenja nakita i u vidu PVC stabilizatora. Preuzeto i modifikovano sa <https://www.cadmium.org/>.

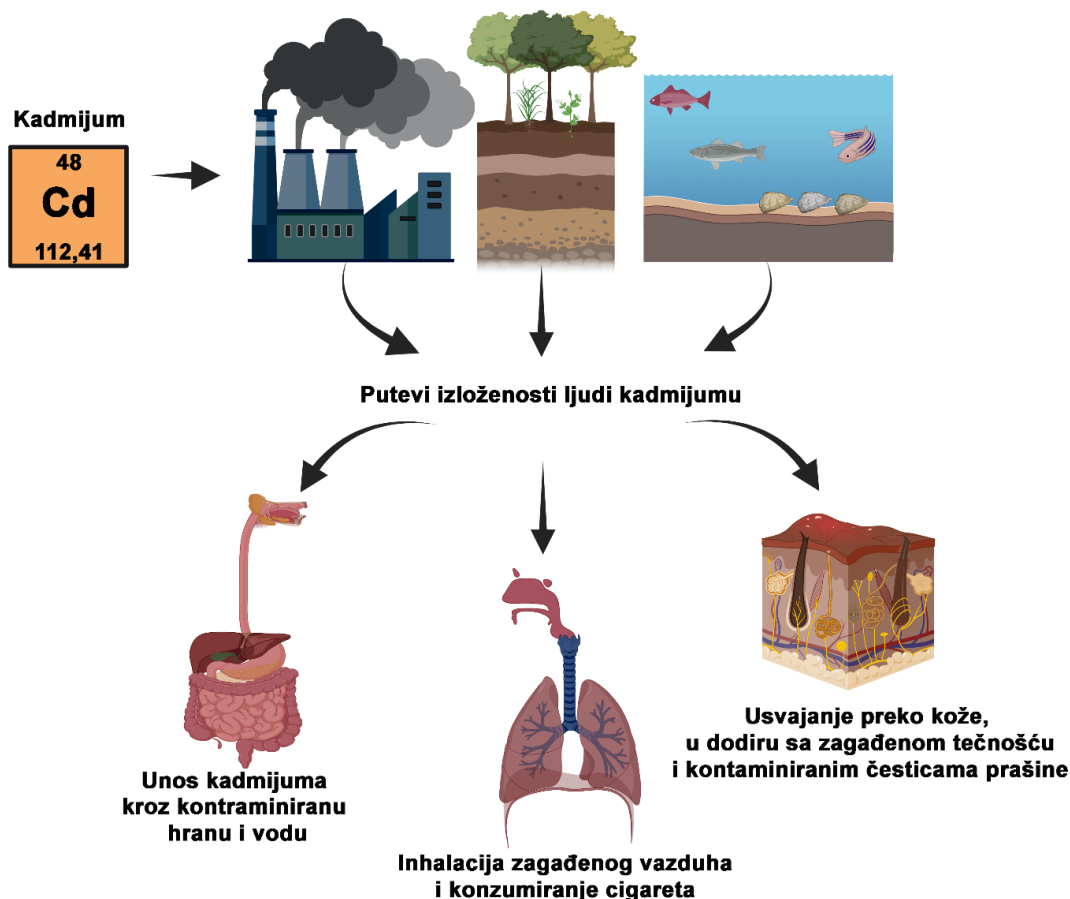
1.1.2. Sredinska dostupnost kadmijuma

Kadmijum je u manjim količinama prirodno prisutan u zemljinoj kori i okeanima. Premda je identifikovana i čista ruda kadmijum-sulfida označena kao grinokit, većinski se nalazi u rudama cinka, olova i bakra, čijim topljenjem se oslobađa. Procenat zastupljenosti kadmijuma u stenama varira u zavisnosti od njihovog sastava. Naime, u magmatskim i metamornim stenama pronađena je niža količina ovog metala, za razliku od sedimentnih stena, u kojima je kadmijum značajno zastupljen jer zamenjuje jone kalcijuma kojima obiluje ovakav tip stena. Zapažene su i veće koncentracije kadmijuma u priobalnim delovima okeana u odnosu na veće dubine (Kubier et al., 2019; Morrow, 2010; Nordberg, 2009; Satarug et al., 2003).

Kadmijum nije biorazgradiv i veoma je postojan u životnoj sredini. Dospeva u zemljište, vodu i vazduh prirodnim putem ili antropogenom aktivnošću. Zagađenje kadmijumom na prirodan način se dešava najčešće usled erozija zemljišta, vulkanskih erupcija, šumskih požara i ostalih prirodnih fenomena (Mezynska i Brzóška, 2018; Satarug et al., 2010; Wilbur et al., 2012). Međutim, porast koncentracije ovog metala u spoljašnjoj sredini je usledio nakon industrijske revolucije u toku XX veka. Procesi poput eksploatacije i prečišćavanja obojenih metala, odlaganja i spaljivanja otpada, proizvodnje i primene fosfatnih đubriva, kao i sagorevanja fosilnih goriva su označeni kao glavni uzročnici kontaminacije životne sredine kadmijumom (Wilbur et al., 2012).

1.1.3. Putevi unosa kadmijuma kod ljudi i njegovi biološki efekti

Kadmijum se od 1993. godine svrstava u humane karcinogene i teratogene (IARC, 1993). U literaturi se najčešće povezuje sa pojavom karcinoma pluća, dojke i prostate (Cui et al., 2021; Järup, 2003). Mnogobrojne epidemiološke studije su ukazale da čak i niska izloženost ovoj zagađujućoj supstanci dovodi do negativnih efekata na organske sisteme ljudi (Nordberg et al., 2018; Wallin et al., 2014). Štetno delovanje kadmijuma se posebno ispoljava na rad bubrega, jetre, skeletnog i kardiovaskularnog sistema (Mezynska i Brzóška, 2018). Opisana svojstva poput dugačkog poluživota (25-30 godina) (Satarug et al., 2010) i niske stope ekskrecije iz organizma (Akerstrom et al., 2013), u kombinaciji sa globalnom zastupljenošću, čine kadmijum opasnim kontaminantom sa dugoročnim posledicama. Unošenje kadmijuma u organizam ljudi se može odvijati ingestijom, inhalacijom i usvajanjem preko kože (Slika 3) (Järup et al., 1998).



Slika 3. Najznačajniji putevi unosa kadmijuma kod ljudi-ingestija, inhalacija i apsorpcija preko kože. Delovanjem najčešće ljudskog faktora kadmijum dospeva u vazduh, zemljište i vodu, što posledično rezultira unosom u organizam ljudi i životinja. Originalna slika, kreirana u programu BioRender.com.

Najzastupljeniji put unosa kadmijuma u opštoj, nepušačkoj populaciji je ishranom (Wilbur et al., 2012). Kontaminacija zemljišta kadmijumom rezultuje njegovim brzim i jednostavnim ulaskom

u lanac ishrane neposrednim akumuliranjem ovog metala u prisutnoj vegetaciji (Järup et al., 1998; Yuan et al., 2014). Time kadmijum dovodi do značajno izmenjenog kvaliteta hrane i smanjene bezbednosti njenog unosa. Žitarice, voće i povrće uzgajani na zagađenom zemljištu zadržavaju znatne količine metala i smatraju se glavnim izvorom kadmijuma u ishrani (Kim et al., 2018). Štaviše, u značajne izvore kadmijuma spadaju i vodeni organizmi, stanovnici zagađenih voda, koji se koriste u ishrani. Pri proceni povišenih koncentracija kadmijuma u različitim životnim namirnicama, istakle su se školjke, iznutrice, sušeno povrće, kakao, kafa i čaj (Ciobanu et al., 2012). Ustanovljeno je da se 3-10 % oralno unetog kadmijuma zadržava u zdravom organizmu, dok je taj procenat viši u prisustvu deficijencije gvožđa, cinka ili kalcijuma (Wilbur et al., 2012). Uočen je viši nivo njegove akumulacije kod žena u odnosu na muškarce, a posebno je viši u organizmu trudnica (Järup et al., 1998). Jedan od najrelevantnijih primera posledice povišene hronične ingestije kadmijuma je razvoj itai-itai (jao-jao) bolesti u Japanu, sredinom XX veka. Bolest je prouzrokovana navodnjavanjem plantaža pirinča kontaminiranim vodom iz reke Jinzu (Nogawa i Kido, 1993). Povišena akumulacija kadmijuma u pirinču je rezultovala trovanjem lokalnog stanovništva i ozbiljnim zdravstvenim tegobama poput oštećenja bubrega, izraženih bolova u kostima, razvoja osteomalacije i osteoporoze i finalne nemogućnosti kretanja (Inaba et al., 2005). U mnogim geografskim područjima, izloženost ljudi kadmijumu se smatra dovoljno visokom da bi ostvarila značajne efekte na zdravlje ljudi (EFSA, 2009). Prema zvaničnim podacima, procenjene prosečne dnevne doze unosa kadmijuma kroz hranu iznose 20 µg/danu u Evropi i Sjedinjenim Američkim državama, a 25 µg/danu u Aziji (Satarug et al., 2017a).

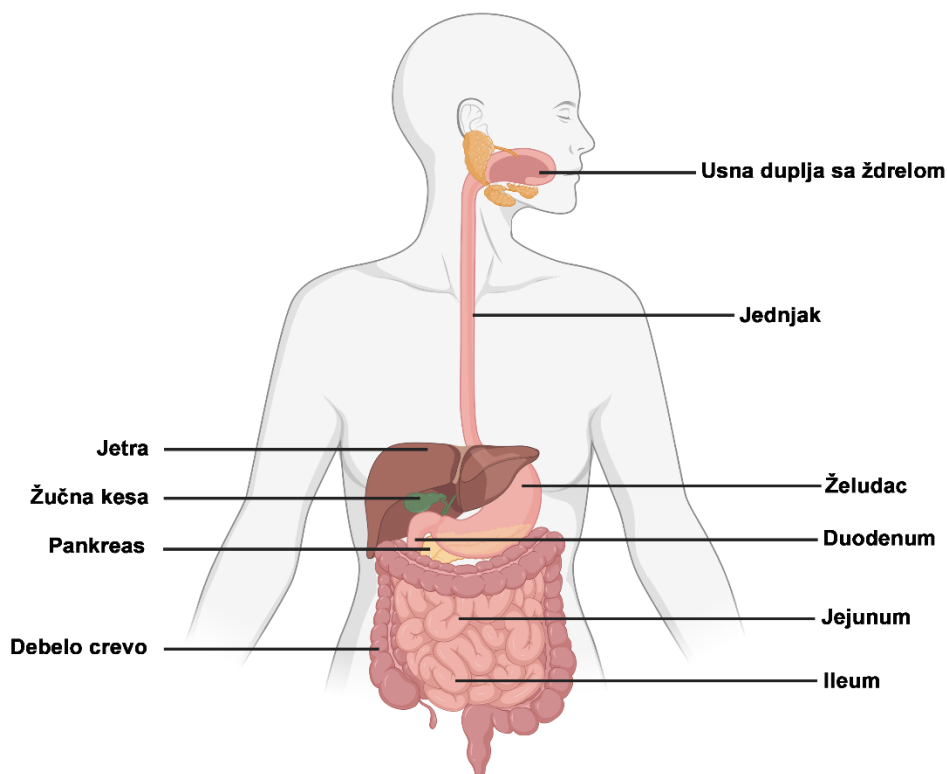
Inhalacija kadmijuma je karakteristična za pušače (Galazyn-Sidorczuk et al., 2008; Satarug i Moore, 2004) kod kojih je ustanovljeno da unose dvostruko više ovog metala u odnosu na opštu, nepušačku populaciju (Wilbur et al., 2012). Pored spomenutog unosa kadmijuma kroz dim, u uslovima povišene zagađenosti vazduha kadmijumom ili pri profesionalnoj izloženosti ljudi inhalacija kadmijuma je jedan od istaknutih načina unosa (Chen et al., 2015; Tavakkoli i Khanjani, 2016). Procenjeno je da će se između 5-50 % inhaliranog kadmijuma apsorbovati u organizmu posredstvom pluća (Wilbur et al., 2012). U zavisnosti od količine i perioda izloženosti kadmijumu, njegova inhalacija se povezuje sa razvojem plućnog karcinoma (Waalkes, 2003) i sve češće sa pojavom hronične opstruktivne bolesti pluća (engl. *Chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) (Elonheimo et al., 2022). Osim toga, pri inhalaciji kadmijuma se zapažaju značajni štetni efekti na ispravan rad bubrega posredstvom promena u proksimalnim tubulama (Madden i Fowler, 2000), kardiovaskularnom sistemu preko delovanja na vaskularne endotelne ćelije (Bernhard et al., 2006) i imunskom sistemu, prvenstveno preko uticaja na komponente urođenog imunskog sistema (Wang et al., 2021).

Usvajanje kadmijuma putem kože je u poređenju sa ingestijom i inhalacijom najmanje značajan vid unosa u organizam. Odvija se u visoko kontaminiranim životnim sredinama pri dodiru sa česticama prašine ili zagađenom vodom (Wester et al., 1992).

1.2. Efekti ingestije kadmijuma na narušavanje homeostaze u organizmu

Pri oralnom unosu kadmijuma, prva meta ispoljavanja njegove toksičnosti je gastrointestinalni trakt (GIT) (Bishak et al., 2015; Tinkov et al., 2018). U anatomskom smislu, GIT je sačinjen iz usne duplje, jednjaka, želuca, tankog i debelog creva (Slika 4). Njegova osnovna funkcija se sastoji u mehaničkoj obradi i hemijskoj razgradnji hrane na prostije komponente (usna duplja, jednjak, želudac), apsorpciji nutrijenata (tanko crevo) i ekskreciji nedovoljno obrađene hrane (debelo crevo). Navedeni procesi su potpomognuti aktivnošću pljuvačnih žlezdi, jetre, žučne kese i pankreasa. Regulacija tačne i efikasne koordinacije digestije hrane se obezbeđuje preciznom regulacijom kompleksnih puteva međuceljske signalizacije GIT-a, enteričkog nervnog sistema

(ENS), smeštenog u samim crevima, centralnog nervnog sistema (CNS) i imunskog sistema (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017).



Slika 4. Prikaz komponenti gastrointestinalnog trakta ljudi. Originalna slika, kreirana u BioRender.com.

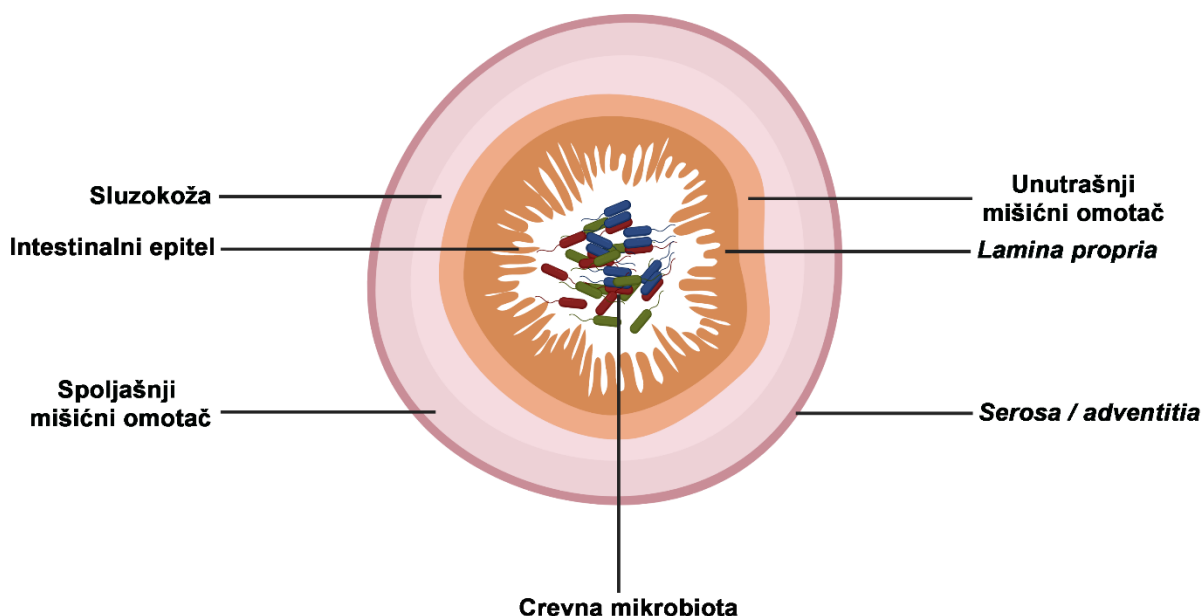
Imajući u vidu značajne štetne posledice apsorpcije kadmijuma po zdravlje ljudi, razumevanje procesa koji dovode do njegovog usvajanja u tankom crevu je od neposredne važnosti.

1.2.1. Tanko crevo-funkcija i građa

Tanko crevo čoveka je prosečne dužine 6-7 m i nastavlja se na želudac. Glavna funkcija mu se ogleda u završetku hemijske digestije lipida, ugljenih hidrata, proteina, vitamina solubilnih u mastima (vitamini A, D, E), kompleksa vitamina B i njihovoj kontrolisanoj apsorpciji. Dodatno, u ovom regionu GIT-a se odvija i apsorpcija vode. Tanko crevo se sastoji iz duodenuma ili dvanaestopalačnog creva, u koji se ulivaju kanali žuči i pankreasa, jejunuma i ileuma (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017; Volk i Lacy, 2017).

U histološkom smislu, u građi tankog creva se izdvajaju 4 sloja (Slika 5) (Reed i Wickham, 2009; Turner, 2009):

1. *tunica mucosa* (sluzokoža)
2. *tunica submucosa* (podsluzokoža),
3. *tunica muscularis externa* (mišićni omotač) i
4. *serosa* ili *adventitia*.



Slika 5. Šematski prikaz histološke organizacije tankog creva. Originalna slika, kreirana u BioRender.com

Za proces unosa kadmijuma je najznačajniji sloj sluzokože, koji je okrenut ka lumenu tankog creva i sačinjen je iz 3 podsloja: epitela, *lamina propria* i unutrašnjeg mišićnog omotača (lat. *muscularis mucosae*) (Reed i Wickham, 2009; Volk i Lacy, 2017).

Epitel tankog creva je organizovan u vidu nabora koji se označavaju kao crevne resice (Crosnier et al., 2006). Od baze crevnih resica ka bazi sluzokože pružaju se crevne žlezde u čijem su dnu (kripti) smeštene ćelije zadužene za kontinuirano obnavljanje epitela creva (Clevers, 2013). Predominantno prisutne ćelije epitela su enterociti, specijalizovane intestinalne epitelne ćelije (IEĆ) sa ulogom u apsorpciji (Johansson et al., 2011). Upečatljiva karakteristika enterocita je postojanje mikrovila na apikalnoj strani, čiji broj može iznositi i 3000 (Volk i Lacy, 2017). Prisustvo crevnih resica i mikrovila je jedan od najznačajnijih vidova specijalizacije tankog creva za obavljanje što efikasnijeg procesa apsorpcije preko povećanja površine za njeno odvijanje (Johansson et al., 2011).

Enterocite odlikuje i izraženo uspostavljanje međućelijskih veza čiji se značaj ogleda u kontrolisanju paracelularnog transporta. Između enterocita se formiraju čvrste veze (engl. *tight junction*, lat. *zonula occludens*), adherentne veze (lat. *zonula adherens*) i dezmozomi (lat. *macula adherens*), koje su regulisane intraćelijskim i ekstraćelijskim signalima (Green et al., 2010). Čvrste veze su aktivno uključene u regulisanje paracelularnog transporta delujući istovremeno poput barijere i pore za transport. Naime, u zavisnosti od potrebe u datom momentu, blokiraju slobodnu difuziju proteina i lipida između apikalnih i bazolateralnih domena ćelijske membrane, a propuštaju jone, rastvorene supstance i vodu (Farhadi et al., 2003; Turner, 2009). U formiranju čvrstih veza predominantno su zastupljena 4 integralna transmembranska proteina: kladin, okcludin, JAM (engl. *junctional adhesion molecule*) i tricelulin (Furuse et al., 1998, 1993; Ikenouchi et al., 2005; Martin-Padura et al., 1998), pri čemu familija proteina kladina broji preko 24 člana (Suzuki, 2013). Unutarćelijski domeni ovih proteina su posredstvom zonulina povezani sa aktinskim citoskeletom, što je bitno za njihovu funkcionalnost (Suzuki, 2013). Najzastupljeniji proteini u kreiranju snažnih adherentnih veza su kalcijum zavisni proteini, E-kadherini (van Roy i Berx, 2008). Čvrste veze, adherentne veze i dezmozomi zajedno doprinose funkcionalnosti intestinalne barijere i održavanju homeostaze (Suzuki, 2013). Literaturno su dostupna saznanja koja ukazuju na direktnu povezanost razvoja inflamatornih oboljenja creva i narušene funkcije intestinalne barijere koja rezultuje njenom povišenom propustljivošću (Clayburgh et al., 2004). Ulcerozni kolitis i Kronovo oboljenje pogađaju ogromnu populaciju ljudi, a hiperpropustljivost intestinalne barijere se uočava u ranim fazama

navedenih bolesti (Hollander et al., 1986; Michielan i D'Inca, 2015; Söderholm et al., 1999). U prilog značajnosti očuvanja barijere stoje i naznake da povećana propustljivost barijere ima važnu ulogu i u iniciranju celijakije (Oberhuber i Vogelsang, 1998). Pored navedenog, povećana propustljivost crevne barijere je bitna i u razviću sindroma nervoznih creva (engl. *Irritable bowel syndrome*) (Camilleri i Gorman, 2007). Pored enterocita, prisutne su i ćelije proizvođači mukusa (peharaste ćelije), enteroendokrine ćelije koje oslobađaju hormone, Panetove ćelije koje sintetišu antimikrobna jedinjenja i M ćelije, zadužene za prezentaciju antigena (Green et al., 2010).

Naredni podsloj je predstavljen vezivnim tkivom u kome se može uočiti prisustvo ćelija imunskog sistema i naziva se *lamina propria* (više u odeljku 1.2.3) (Reed i Wickham, 2009). Ispod *lamina propria* se nalazi podsloj muskulature sluzokože predstavljen glatkim mišićima. Funkcija navedenog podsloja se ogleda u izazivanju pokreta koji za posledicu imaju dalji transport nesvarene hrane do debelog creva. Pri prelasku u niže delove tankog creva uočava se postepena supstitucija ćelija sa ulogom u apsorpciji, ćelijama koje proizvode mukus (Volk i Lacy, 2017).

1.2.2. Crevna mikrobiota

Creva ljudi i životinja odlikuje prisustvo kompleksne zajednice mikroorganizama koja se jednim imenom zove crevna mikrobiota. Crevna mikrobiota je najbrojnija zajednica mikroorganizama u ljudskom telu i čine je bakterije, virusi, protisti, gljive i neki pripadnici arhea. Procenjuje se da crevna mikrobiota sadrži preko 1500 različitih vrsta, pri čemu je najviše literaturnih podataka dostupno za bakterijske populacije mikrobiote. Creva su predominantno naseljena anaerobnim bakterijama iz razdela Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria i Proteobacteria (Gomaa, 2020; Passos i Moraes-Filho, 2017; Quigley, 2013).

Bakterije koje kolonizuju creva imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze creva koju ostvaruje na različite načine. Aktivno učestvuje u digestiji nesvarenih ugljenih hidrata poput celuloze, hemiceluloze pektina, lignina i oligosaharida. Kao terminalni produkti njihove obrada nastaju masne kiseline kratkog lanca (engl. *short chain fatty acid*, SCFA), čiji neodostatak je primećen u patofiziološkim stanjima (Perry et al., 2016). Crevna mikrobiota sintezom i oslobađanjem metabolita i antimikrobnih jedinjenja doprinosi zaštiti od invazije patogena (Mills et al., 2019). Štaviše, mikrobiota creva oslobađanjem različitih metabolita (SCFA, indolnih jedinjenja, poliamina i sekundarnih žučnih soli), kao i lipoproteina i lipopolisaharida (LPS), komunicira sa imunskim sistemom, doprinosi njegovom sazrevanju i utiče na karakteristike imunskog odgovora domaćina (D'Amelio i Sassi, 2018). Crevna mikrobiota reguliše proliferaciju, diferencijaciju i permeabilnost IEC i ima važnu ulogu u očuvanju funkcionalnosti intestinalne barijere (Allam-Ndoul et al., 2020; J. Kelly et al., 2015). Dodatno, aktivno utiče na oslobađanje insulina (Tai et al., 2015). Dvosmerna komunikacija posredstvom ose mikrobiota-crevo-mozak (engl. *microbiota-gut-brain axis*) omogućuje crevnoj mikrobioti i da ostvari značajne efekte na neurološke i mentalne funkcije domaćina (C. J. Kelly et al., 2015; Margolis et al., 2021). Zahvaljujući postojanju ose creva-koža, crevna mikrobiota aktivno utiče na zdravlje kože i pojavu kožnih oboljenja (O'Neill et al., 2016; Sinha et al., 2021). Takođe, izmenjeni imunski odgovori u plućima izazvani promenama u crevnoj mikrobioti ukazuju i na postojanje važne uzročno-posledične veze između creva i pluća (Dang i Marsland, 2019).

Eubioza je pojam kojim se označava prisustvo balansa između mikrobioloških ekosistema creva, u fiziološkom statusu organizma (Iebba et al., 2016). Redukcija prisustva korisnih predstavnika crevne mikrobiote, prenamnožavanje štetnih taksona i/ili smanjenje diverziteta rezultuje nastankom disbioze creva (Hrncir, 2022). Imajući u vidu višestruke uticaje crevne mikrobiote na zdravstveno stanje jedinike, poremećaji u njenom sastavu mogu biti povezani sa razvojem širokog spektra oboljenja GIT-a (iritabilni sindrom creva, inflamatorno oboljenja creva), jetre, (masna jetra), metabolizma (gojaznost, dijabetes), kardiovaskularnog sistema (ateroskleroza), imunskog sistema

(astma, atopijski ekcem, alergijski rino konjuktivitis) (Andoh et al., 2016; Bennet et al., 2015; Betrapally et al., 2016; Durack et al., 2018; Estruch et al., 2018; Frati et al., 2018; Garcia-Rios et al., 2017; Gomaa, 2020). Posledice disbioze crevne mikrobiote mogu biti i određena onkološka oboljenja poput kolorektalnog karcinoma (Guarner i Malagelada, 2003; Hold, 2016). Pored toga, u neurodegenerativnim oboljenjima (multipla skleroza, Alchajmer, Parkinsonova bolest), kao i u neurodegenerativnim (autizam) i psihijatrijskim poremećajima (depresija) zapažane su značajne promene u crevnoj mikrobioti (Gomaa, 2020; Sampson et al., 2016; Sherwin et al., 2016; Socala et al., 2021). I promene na koži poput razvoja akni vulgaris mogu biti povezane sa promenama u sadržaju mikrobiote creva (Deng et al., 2018).

1.2.3. Imunski sistem sluzokože tankog creva

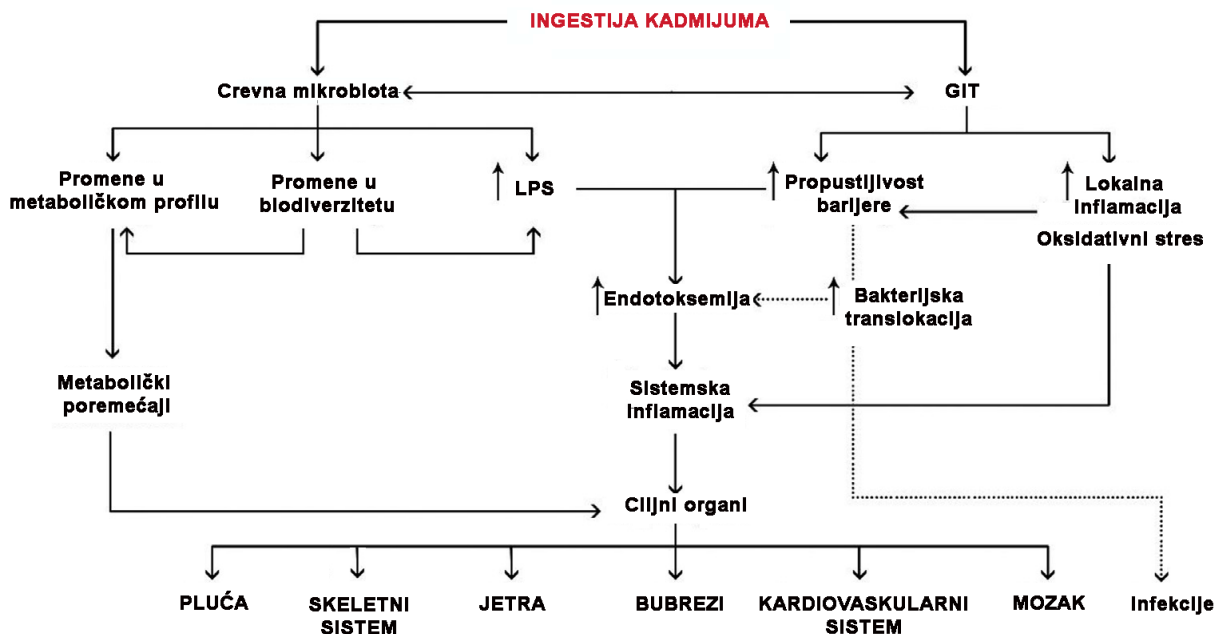
Imunski sistem obuhvata urođenu (prirodnu ili nativnu) imunost, filogenetski stariju, i stečenu (adaptivnu ili humoralnu) imunost. Komponente urođene i stečene imunosti su u konstantnoj komunikaciji posredstvom sinteze različitih molekula kao što su citokini i hemokini. U komponente urođene imunosti spadaju: epitelne barijere (koža i sluznica), različiti tipovi ćelija (neutrofili, makrofagi, dendritske ćelije, mastociti, urođene limfoidne ćelije i ćelije prirodne ubice (engl. *Natural killer cells*, NK) i solubilni faktori (sistem komplementa, hemokini) koji zajedno obezbeđuju primarnu zaštitu od infekcija. Stečeni imunski odgovor se sastoji iz humoralne (posredovane B limfocitima koji proizvode preko sinteze antitela (imunoglobuline)) i ćelijske imunosti (posredovane T limfocitima) (Abbas, 2020).

Imunski sistem creva je bitan za očuvanje homeostaze GIT-a. Komponente imunskog sistema creva su u kontaktu sa velikim brojem komensalnih mikroorganizama i periodično sa različitim patogenima (Perez-Lopez et al., 2016), kao i različitim antigenima poreklom iz hrane. Da bi se obezbedila tolerancija na komensalne mikroorganizme prisutne u lumenu tankog creva, a sa druge strane zaštita od patogena, neophodni su precizni mehanizmi regulacije aktivnosti imunskog sistema creva. U sastav ovog sistema ulazi mukoza tankog creva koja pored funkcije u održavanju fizičke i hemijske barijere, sintetizuje različite antimikrobne peptide (npr. defenzine) i u slučaju infekcije ili oštećenja tkiva oslobađa citokine. I same IEC reaguju na različite stimuluse produkcijom citokina kao što su interleukin-8 (IL-8) i interleukin-1 β (IL-1 β). Navedeni podsloj sadrži veliki broj ćelija imunskog sistema, koje su pretežno lokalizovane u *lamina propria*. U podsloju *lamina propria* je zabeleženo prisustvo dendritskih ćelija, makrofaga i T limfocita. Dendritske ćelije započinju reakciju imunskog sistema prezentovanjem antigena i produkcijom citokina poput IL-1, interleukina-10 (IL-10) i hemokina. Makrofagi nastaju diferencijacijom iz monocita i specijalizovani su za uklanjanje patogena i reparaciju oštećenog tkiva. Štaviše, ove ćelije oslobađaju citokine među kojima je i faktor nekroze tumora (engl. *Tumor necrosis factor*, TNF). T-limfociti, koji se nakon aktivacije diferencijuju u smeru Th1, Th17 i regulatornih T ćelija, takođe proizvode različite citokine (interferon- γ (IFN- γ), IL-10, IL-17) bitne za odbranu organizma od patogena (Abbas, 2020; Allaire et al., 2018).

Na osnovu svega navedenog se vidi da je efikasnost i preciznost imunskog sistema creva od velikog značaja za normalno funkcionisanje organizma i svi propusti u njemu rezultuju različitim patofiziološkim stanjima (Sterling et al., 2022).

1.2.4. Mehanizmi toksičnosti oralno unetog kadmijuma

Oralno unet kadmijum može da utiče na homeostazu u crevima na različite načine (Slika 6). S obzirom na etičke aspekte i teško dostupan biološki materijal humanog porekla, identifikacija kadmijumovih mehanizama toksičnosti je rezultat *in vitro* eksperimenata i/ili rada na eksperimentalnim životinjama.



Slika 6. Šematski prikaz toksičnih efekata i ciljnih organa oralno unetog kadmijuma. Preuzeto i modifikovano iz Tinkov i saradnici(2018).

Literaturna saznanja ukazuju da oralna izloženost kadmijumu ostvaruje direktan efekat na sastav i metaboličku aktivnost crevne mikrobiote (Richardson et al., 2018; Yang et al., 2021). Primećeno je da unos kadmijuma kroz ishranu dovodi do redukcija diverziteta bakterijskih taksona, a posebno je upečatljivo smanjenje u brojnosti predstavnika mlečnokiselinskih bakterija (Fazeli et al., 2011). Detaljnije studije su ukazale da po izlaganju kadmijumu zapažaju se promene u odnosu brojnosti pripadnika razdela Firmicutes i Bacteroidetes u smeru porasta zastupljenosti predstavnika Bacteroidetes (Tinkov et al., 2018). Analiza metaboloma crevne mikrobiote miševa hronično izloženih kadmijumu je otkrila znatne promene u metabolizmu sekundarnih žučnih soli, SCFA, ogleđane u njihovom smanjenom prisustvu, i povećana proizvodnja LPS (He et al., 2020; Jafarpour et al., 2015; Tinkov et al., 2018).

Prema podacima dobijenim na eksperimentalnim životinjama, najveći deo oralno unetog kadmijuma se zadržava u mukozni GIT-a (Andersen et al., 1988). Unet kadmijum se vezuje za jonske transportere za kalcijum, cink i gvožđe i unosi u ćeliju (Brzóška i Moniuszko-Jakoniuk, 2001; Thévenod i Lee, 2013). Literaturni podaci ukazuju da se najveći procenat jona kadmijuma vezuje za divalentni metalni transporter (DMT1) (Gunshin et al., 1997; Thévenod i Wolff, 2016). Njegova primarna funkcija je transport gvožđa u GIT-u, ali podjednako visok afinitet ima i za jone kadmijuma (Gunshin et al., 1997). U zavisnosti od doze i dužine izloženosti, kadmijum dovodi do smrti IEC, narušava uspostavljanje međućelijskih veza, povećava propustljivost intestinalne barijere, povećava relativnu ekspresiju gena za proteine toplotnog šoka (engl. *Heat shock protein*, HSP) i enzima koji učestvuju u zaštiti od oksidativnog stresa (Rusanov et al., 2015; Satarug et al., 2017b; Tinkov et al., 2018; Zhai et al., 2016).

Izazivanje oksidativnog stresa, se pored inflamacije, smatra glavnim mehanizmom toksičnog dejstva kadmijuma (Cuypers et al., 2010). Oksidativni stres nastaje kao rezultat povećane produkcije slobodnih radikala i/ili smanjene aktivnosti komponenti antioksidativne zaštite. Kadmijum dovodi do oksidativnog stresa preko povećane produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) i azota (engl. *Reactive nitrogen species*, RNS), slabi enzimske- superoksid dismutazu (SOD), katalazu i neenzimske komponente-glutation (GSH), vitamin E, koje zajedno učestvuju u antioksidativnoj zaštiti (Mezynska i Brzóška, 2018; Rani et al., 2014). Izazvan oksidativni stres rezultuje oštećenjem strukture dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i reparacionih mehanizama,

proteina i lipida u ćeliji, ćelijskih organela i membrana (Matović et al., 2015; Messner et al., 2016; Mezynska i Brzóška, 2018; Pari i Shagirtha, 2012). Od ćelijskih organela, u pogledu osjetljivosti na kadmijum se posebno ističu mitohondrije, u kojima izaziva inhibiciju procesa ćelijskog disanja i sinteze adenzin-trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) (Cannino et al., 2009). Više nezavisnih studija je pokazalo da kadmijum izaziva proces lipidne peroksidacije i indukuje nagomilavanje terminalnog proizvoda, malondialdehida (MDA) (Ninkov et al., 2015). Pored oksidativnog stresa, proces inflamacije je dodatni mehanizam ostvarivanja štetnog efekta kadmijuma (Ninkov et al., 2015; Popov Aleksandrov et al., 2021). Pokazano je da kadmijum stimulira produkciju citokina IL-8, TNF- α , IL-1 β i IL-6 na humanim intestinalnim ćelijama HT29 (Zhai et al., 2016). Rezultati na IEC su podudaraju sa rezultatima studije koja je podrazumevala produženu, oralnu izloženosti pacova kadmijumu, u čijoj crevnoj sluzokoži se uočava infiltracija leukocita (makrofaga i neutrofila) u tkivo, kao i povećanje sadržaja proinflamatornih citokina IL-1 β i TNF u tkivu (Ninkov et al., 2015; Popov Aleksandrov et al., 2021). Važno je napomenuti da procesi oksidativnog stresa i inflamacije nisu nezavisni jedan od drugog. Štaviše, između njih je aktivna pozitivna povratna sprema i zajedno doprinose oštećenju tkiva tankog creva i daljem prodoru jona kadmijuma u organizam (Satarug et al., 2017b).

Razaranje tkiva, povećana propustljivost i smanjena funkcionalnost intestinalne barijere rezultuju dospevanjem jona kadmijuma u krvotok gde se najveći procenat vezuje za membranske proteine eritrocita dok manji deo ostaje u plazmi „labavije“ vezan za albumin (Godt et al., 2006). Krvotokom se kadmijum transportuje primarno do jetre i bubrega, a potom se distribuira i do ostalih organa u kojima se, takođe, akumulira (Satarug et al., 2010). Utvrđeno je da je nivo deponovanog metala doznno zavisna (Kulas et al., 2021; Ninkov et al., 2015). U hepatocitima joni kadmijuma indukuju sintezu metalotioneina (MT), proteina od neposredne važnosti u biohemiji i toksikološkoj kinetici esencijalnih i neesencijalnih metala (Nordberg i Nordberg, 2022). Metalotioneini (MT) su identifikovani 1957. godine u hepatocitima, kada je primećeno da utiču na ispoljavanje kadmijumove toksičnosti u ćeliji. Odlikuje ih mala molekularna masa i visoko prisustvo brojnih sulfhidrilnih grupa (-SH). Iako je pokazana njihova neosporna uloga u zaštiti ćelija jetre od toksičnosti kadmijuma, njihovo prisustvo je ustanovljeno i u bubrezima, krvnoj plazmi, a čak je detektovan i u urinu (Nordberg i Nordberg, 2022). U kompleksu sa MT, uglavnom je onemogućen ulazak kadmijuma u ćelije, osim u slučaju bubrežnih ćelija proksimalnih tubula. koje imaju specijalizovane receptore (kubulin i megalin) za njegovo usvajanje (Satarug et al., 2017b). U jetri kadmijum indukuje oksidativan stres, apoptozu i nekrozu hepatocita (Mouro et al., 2021; Satarug, 2012). Izlaganje nižim dozama ovog toksičnog metala je povezano sa razvojem oboljenja nealkoholne masne jetre, nealkoholnog steatohepatitisa i fibroze jetre (Mezynska i Brzóška, 2018; Satarug et al., 2017). Pri višim dozama kadmijuma je čak zabeleženo i otkazivanje jetre (Hyder et al., 2013; Kang et al., 2013). Tokom vremena, opada koncentracija kadmijuma u jetri, a povećava se u bubrezima. Rezultati epidemioloških studija koje su za cilj imale procenu uticaja kadmijuma iz životne sredine su ukazali da čak i niska koncentracija metala doprinosi oštećenju bubrega (Swaddiwudhipong et al., 2015; Wang et al., 2016). Primarne promene nakon izlaganja kadmijumu se uočavaju u proksimalnim bubrežnim tubulama. U poređenju sa drugim organima, najviše deponovanog kadmijuma je izmereno upravo u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega, koje karakteriše odsustvo efikasnih ekskretornih mehanizama (Satarug et al., 2006; Yan i Allen, 2021). Nastale povrede mogu da rezultuju i otkazivanjem bubrežne funkcije (Mezynska i Brzóška, 2018). Reapsorpcija kadmijuma od strane endotelnih ćelija i njegova akumulacija u njima dovode do oksidativnih oštećenja makromolekula i aktiviranja puteva pasivne i/ili programirane ćelijske smrti (Tripathi i Srivastav, 2011; Wang et al., 2010; Yan i Allen, 2021). Dodatno, kadmijum uzrokuje smanjenje reapsorpcije nitrijenata (glukoze, amino kiselina, cink i kalcijuma) i proteina niske molekularne mase (α 1-mikroglobulina, β 1-mikroglobulina i retinol-vezujućeg proteina), čija prisustva u urinu mogu poslužiti kao indikatori narušene funkcionalnosti bubrega (Honda et al., 2010; Satarug et al., 2017b; Wallin et al., 2014). Osim navedenog, dovodi do povišenog zadržavanja vode i natrijuma (Satarug et al., 2017b). Navedene promene pri oralnom unošenju kadmijuma pozitivno korelišu i sa povećanim

rizikom za razvoj dijabetesa i hipertenzije (Satarug et al., 2017b). Oralno izlaganje kadmijumu rezultuje njegovim povećanim deponovanjem i u plućima, mozgu, i skeletnom sistemu (Kulas et al., 2021; Petrova et al., 2022; Tai et al., 2022; Wallin et al., 2016).

Široka rasprostranjenost, dugačak polu-život i niska stopa ekskrecije kadmijuma iz organizma rezultuje stalnim porastom njegovog akumuliranja u telu. Pored toga, iz priloženog se vidi da veliki broj toksičnih promena koje on izaziva povećava incidencu razvoja brojnih bolesti. Navedene karakteristike su doprinele da ovaj toksični metal zauzima visoko 7. mesto na listi prioriternih supstanci za koje je neophodno uspostaviti strategije koje dovode do snižavanja štetnih efekata (ATSDR, 2023).

1.3. Strategije zaštite od toksičnog delovanja kadmijuma

U pogledu smanjenja štetnih efekata kadmijuma nije uspostavljen konsenzus oko izbora najefekasnijeg rešenja (Zhai et al., 2015). Najčešći izbor terapije u slučaju trovanja toksičnim metalima se svodi na upotrebu helirajućih agenasa. Oni doniraju svoje elektrone jonima metala uspostavljajući koordinacione veze koje rezultiraju formiranjem ciklične strukture. Najpoznatiji helirajući agensi za suzbijanje toksičnosti kadmijuma su etilendiamintetrasirćetna kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) i dimerkaptosukcinska kiselina (engl. *dimercapto succinic acid*, DMSA) i njeni analozi. Iako je pokazano da povećavaju urinarnu ekskreciju kadmijuma, njihov unos prati i mnoštvo neželjenih efekata. Neke od njih karakteriše efikasnost samo u kratkom vremenskom periodu po izlaganju kadmijumu i bezuspešni su po dospevanju toksičnog metala u ostale organe. Osim navedenih slabosti, helirajući agensi ne mogu da ublaže propratne efekte kadmijuma poput oksidativnog stresa i inflamacije. Zbog svega navedenog, terapeutici za tretiranje toksičnosti kadmijuma i dalje ostaju interesna sfera koja zaokuplja pažnju naučnika (Bernhoft, 2013; Flora i Pachauri, 2010; Kim et al., 2019; Xu et al., 1995).

Imajući u vidu podatak da je ingestija kadmijuma najznačajniji način izloženosti opšte populacije, sve češće se pribegava izučavanju potencijalne upotrebe dijetetskih suplemenata u suzbijanju negativnog učinka kadmijuma na zdravlje ljudi. Ispitivana je efikasnost primene esencijalnih metala, vitamina, biljaka i njihovih ekstrakata u svrhu ublažavanja kadmijumove toksičnosti (Zhai et al., 2015). S obzirom da se unos kadmijuma odvija preko DMT1 transportera koji je neselektivni transporter za dvovalentne jone metala (Bridges i Zalups, 2005) i da je apsorpcija kadmijuma povišena pri deficijenciji esencijalnih metala (Reeves i Chaney, 2004), suplementacija cinkom, selenom, gvožđem i magnezijumom pomaže u aktivnoj zaštiti od kadmijuma (kompeticija vezivanja za isti transporter). Njihov zaštitni efekat se ogleda u kompeticiji za vezujuća mesta enzima, smanjenju oksidativnog stresa i povećanoj antioksidativnoj zaštiti organizma (Amara et al., 2008; Djukić-Cosić et al., 2007; Ryu et al., 2004; Whanger, 1992). Takođe, i deficijencije vitamina C i E rezultuju povišenom osetljivosti na kadmijum (Fox, 1979), dok njihov unos doprinosi sniženju parametara oksidativnog stresa i histopatoloških promena u plućima i mozgu, kao i jačanju antioksidativne zaštite (Sen Gupta et al., 2004). U zaštiti od kadmijuma su se pokazale korisne i neke biljke poput soje, zelenog čaja, karija, đumbira, belog i crnog luka (Zhai et al., 2015). Izoflavoni i proteini soje su ublažili toksičan efekat kadmijuma na kardiovaskularni sistem (Ferramola et al., 2012; Pérez Díaz et al., 2013), dok su beli i crni luk pokazali sličan zaštitni efekat u vidu povišene ekskrecije toksičnog metala iz organizma i antioksidativne zaštite, zahvaljujući prisutvu organskih sumpornih jedinjenja (Ola-Mudathir et al., 2008; Sharma et al., 2010). Katehini iz zelenog čaja inhibiraju apsorpciju kadmijuma u kostima i doprinose poboljšavanju opšteg stanje kostiju preko povećanja mineralnog sadržaja kalcijuma i gustine (Choi et al., 2003). Dodatno, flavonoidi i fenoli listova karija deluju antioksidativno i pokazuju visoki potencijal da se koriste u vidu helirajuće terapije za toksičnost koju kadmijum ostvaruje na kardiovaskularni sistem (Mitra et al., 2012).

Iako su pomenuti esencijalni metali, vitamini i ekstrakti biljnog porekla pokazali značajnu ulogu u zaštiti od kadmijuma, važno je napomenuti da su zabeleženi slučajevi kada njihov unos može izazvati i štetne zdravstvene efekte (Galati i O'Brien, 2004; Goldhaber, 2003; Greene et al., 1988) zbog čega su nužna detaljnija ispitivanja i adekvatne epidemiološke studije sa ciljem utvrđivanja optimalne doze i dužine unosa.

Pored navedenih pristupa, sve češće se razmatra upotreba probiotika u zaštiti od kadmijuma ili u terapiji njegovih toksičnih efekata (Abdel-Megeed, 2021; Massoud i Zoghi, 2022). Prema usvojenom statutu Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World health organisation*, WHO) i Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (engl. *Food and agriculture organisation of the United Nations*, FAO), probiotikom se označava svaki živi organizam koji ostvaruje blagotvoran efekat na zdravlje domaćina, pri unosu u adekvatnim količinama (WHO-FAO, 2002). Najčešći komercijalno dostupni probiotici sadrže pripadnike roda *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Bacillus* (Foligné et al., 2013). U pogledu ispoljavanja zaštite od toksičnosti metala, najviše podataka postoji za laktobacile (Zoghi et al., 2021).

1.3.1. Laktobacili i njihova primena u zaštiti od kadmijuma

Laktobacili su aerobne ili fakultativno anaerobne, nesporulišuce, Gram-pozitivne bakterije iz grupe mlečnokiselinskih bakterija (MKB). Odlikuje ih GRAS status (engl. *Generally recognised as safe*, GRAS) (WHO-FAO 2002). Rod *Lactobacillus* je najbrojniji rod MKB, a prema predloženoj klasifikaciji iz 2020. godine reklasifikovan je i podeljen u 25 rodova. Pomenuta klasifikacija, pored već postojećih rodova *Lactobacillus* i *Paralactobacillus*, obuhvata i 23 nova (Zheng et al., 2020). Međutim, imajući u vidu obim literaturnih saznanja o rodu *Lactobacillus* pre 2020. godine, dogovoreno je da termin „laktobacili“ ostaje i dalje u upotrebi (Zheng et al., 2020). Takođe, u cilju izbegavanja mogućih zabuna i nejasnoća pri pozivanju na relevantne literaturne izvore, u ovoj doktorskoj disertaciji će se koristiti klasifikacija koja je navedena u njima.

Laktobacili su inicijalno prisutni u mlečnim i fermentisanim proizvodima, a neke vrste su izolovane i iz biljaka. Veoma važan su deo mikrobiote ljudi i životinja i njihovo prisustvo se povezuje sa mnoštvom korisnih uticaja na zdravlje jedinke (O'Callaghan i O'Toole, 2013). Proizvode aromatična jedinjenja, bakteriocine i organske kiseline (Messaudi et al., 2013; Mokoena et al., 2021; Tian et al., 2022). Umanjenje ozbljinosti kliničke slike dijareje u dečijem uzrastu (Isolauri et al., 1991), modulacija imunskog odgovora (Spanhaak et al., 1998), slabljenja simptoma umerenog kolitisa (Mattila-Sandholm et al., 1999), smanjenje intolerancije na laktozu (Sanders i Klaenhammer, 2001), oporavak od gastritisa izazvanog bakterijom *Helicobacter pylori* (Felley et al., 2001), ublažavanje alergijskih reakcija na polen breze (Snel et al., 2011), su neki od primarno otkrivenih povoljnih efekata koje ostvaruju različite vrste laktobacila.

S obzirom da laktobacili proizvode mlečnu kiselinu kao krajnji proizvod fermentacije ugljenih hidrata, veoma su značajni u različitim granama prehrambene industrije (Minj et al., 2021). Dugi niz godina je njihova primena bila rezultat empirijskog znanja koje se prenosilo kroz generacije, do razvoja mikrobioloških metoda i uopšte mikrobiologije (Zoghi et al., 2021). Laktobacili se upotrebljavaju u vidu starter kultura u različitim procesima fermentacije i za proizvodnju fermentisane hrane i napitaka. Doprinosu poboljšanoj bezbednosti hrane i ostvarenju njenih korisnih efekata na zdravlje ljudi (Perczak et al., 2018; Widayastuti et al., 2021).

Detaljne studije, koje su se bavile korisnim efektima laktobacila i njihovom mogućom primenom u različitim okolnostima, su ukazale da laktobacili imaju važnu ulogu i u zaštiti od sredinskih zagađujućih supstanci i kontaminanata hrane, poput toksičnih metala i mikotoksina (Monachese et al., 2012; Zoghi et al., 2021). S obzirom, da kadmijum spada u 5 najštetnijih i najprisutnijih toksičnih metala (Y. Li et al., 2016), otkriće navedenog svojstva laktobacila je dovelo

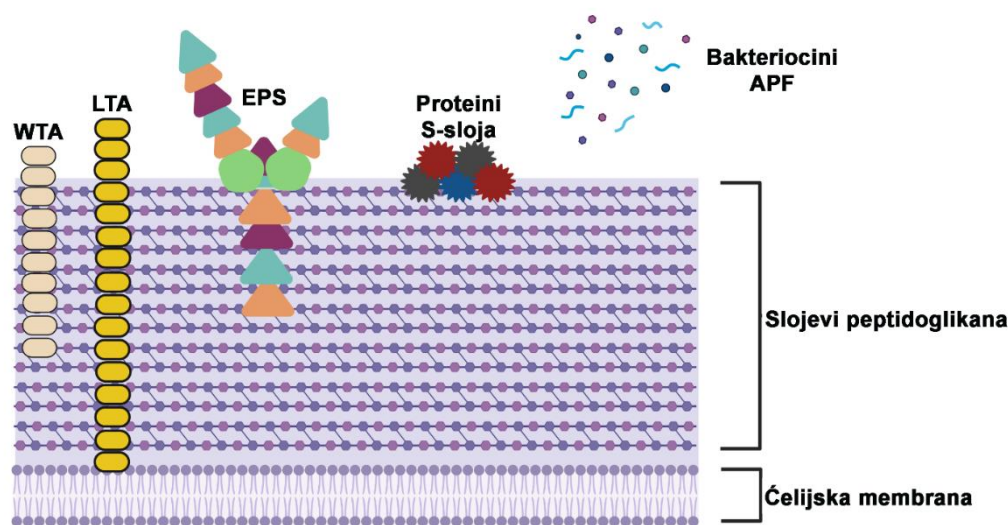
do porasta broja studija čiji su ciljevi izučavanje *in vitro* i *in vivo* zaštite laktobacila od kadmijuma. Gerbino i saradnici (2014) su ukazali na sposobnost soja *Lactobacillus keffir* CIDCA 8348 da poveća preživljavanje ćelija humanog porekla, HepG2, izloženih kadmijumu, a *L. rhamnosus* GR-1 (LGR-1) je redukovao ulazak kadmijumovih jona u humane IEC kolorektalnog karcinoma, Caco-2 (Daisley et al., 2019). Suplementacija probiotičkom formulom koja je sadržala vrste *L. delbrueckii* i *L. fermentum* je smanjila ispoljavanje nepovoljnih efekata kadmijuma na mozak i reproduktivni sistem miševa (Kadry i Megeed, 2018). Takođe, kombinacija bakterijskih sojeva *L. rhamnosus* Rosell-11, *L. acidophilus* Rosell-52 i *Bifidobacterium longum* Rosell-175 je ublažila *in vitro* i *in vivo* kadmijumovu toksičnost (Djurasevic et al., 2017; Jama et al., 2012), posredstvom povećanja ekskrecije i smanjene akumulacije u tkivima i krvi. Dodatno, soj *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 je smanjio akutno i hronično trovanje kadmijumom (Zhai et al., 2014, 2013).

1.3.2. Mehanizmi interakcija laktobacila sa metalima i površinske karakteristike

U cilju prevazilaženja efekata toksičnih metala, bakterije su razvile različite mehanizme zaštite. Interakcije bakterije sa jonima metala se mogu podeliti na metabolički zavisne i metabolički nezavisne procese (Monachese et al., 2012). U procesu koji zahteva metaboličku aktivnost, bakterije mogu da apsorbuju (Davis et al., 2003), transformišu metal u manje štetan oblik (Gadd, 2000) ili da ga aktivno transportuju iz citosola (Ramos-Zúñiga et al., 2019; White i Gadd, 1998). Štaviše, genome nekih bakterija karakteriše prisustvo genetičkih determinanti odgovornih za različite rezistencije na pojedine metale (Hamlett et al., 1992). Osim toga, metabolički nezavisni procesi podrazumevaju, vezivanje jone metala za površinu bakterijskog zida u procesu koji se označava adsorpcija (de Freitas et al., 2019).

U pogledu ostvarivanja zaštite organizma od toksičnosti metala, najkorisnija osobina bakterija je adsorpcija metala, koja karakteriše i žive i mrtve bakterijske ćelije (Zoghi et al., 2014). Razlike u količini vezanog metala i afinitetu prema njemu se uočavaju čak i na nivou soja iste bakterijske vrste (Yi et al., 2017; Zhai et al., 2013). Prema literaturnim podacima, ispoljavanje afiniteta ka vezivanju određenog metala je uslovljeno građom ćelijskog zida bakterija (Abdel-Megeed, 2021).

U sastav ćelijskog zida laktobacila (Slika 7) ulaze peptidoglikani, teihoična i lipoteihoična kiselina, i kod nekih sojeva površinski proteini koji čine S-sloja i egzopolisaharidi (Rohde, 2019; Zoghi et al., 2021).



Slika 7. Šematski prikaz građi ćelijskog zida laktobacila koje odlikuje prisustvo egzopolisaharida (EPS) i proteina S-sloja. Skraćenice: WTA-Teihoična kiselina prikazana za komponente ćelijskog zida; LTA- Teihoična kiselina vezana za ćelijsku membranu, APF-proteinski faktori koji promovišu agregaciju. Originalna slika, kreirana u BioRender.com.

Intenzivno izučavanje mogućih uloga EPS je dovelo do važnih otkrića (Badel et al., 2011). Utvrđeno je da EPS laktobacila mogu ostvariti antioksidativni (Li et al., 2013, 2014), imunomodulatorni (Lee et al., 2016) i antitumorski efekat (Wang et al., 2014). Odlikuje ih i značajno svojstvo inhibicije formiranja biofilma patogenih bakterija. Dodatno, EPS doprinose i boljem preživljavanju probiotika u uslovima GIT-a (Stack et al., 2010) i njihovo prisustvo je važno za proces kolonizacije različitih sredina bakterijama (Zannini et al., 2016). EPS laktobacila utiče na reološka svojstva i teksturu hrane, zbog čega se masovno primenjuje u prehrambenoj industriji u vidu prirodnog emulgatora i stabilizatora (Al-Dhaheri et al., 2017; Das et al., 2014). Sve češće se upotrebljava u kozmetičke svrhe i u farmaceutskoj industriji (Angelin i Kavitha, 2020)

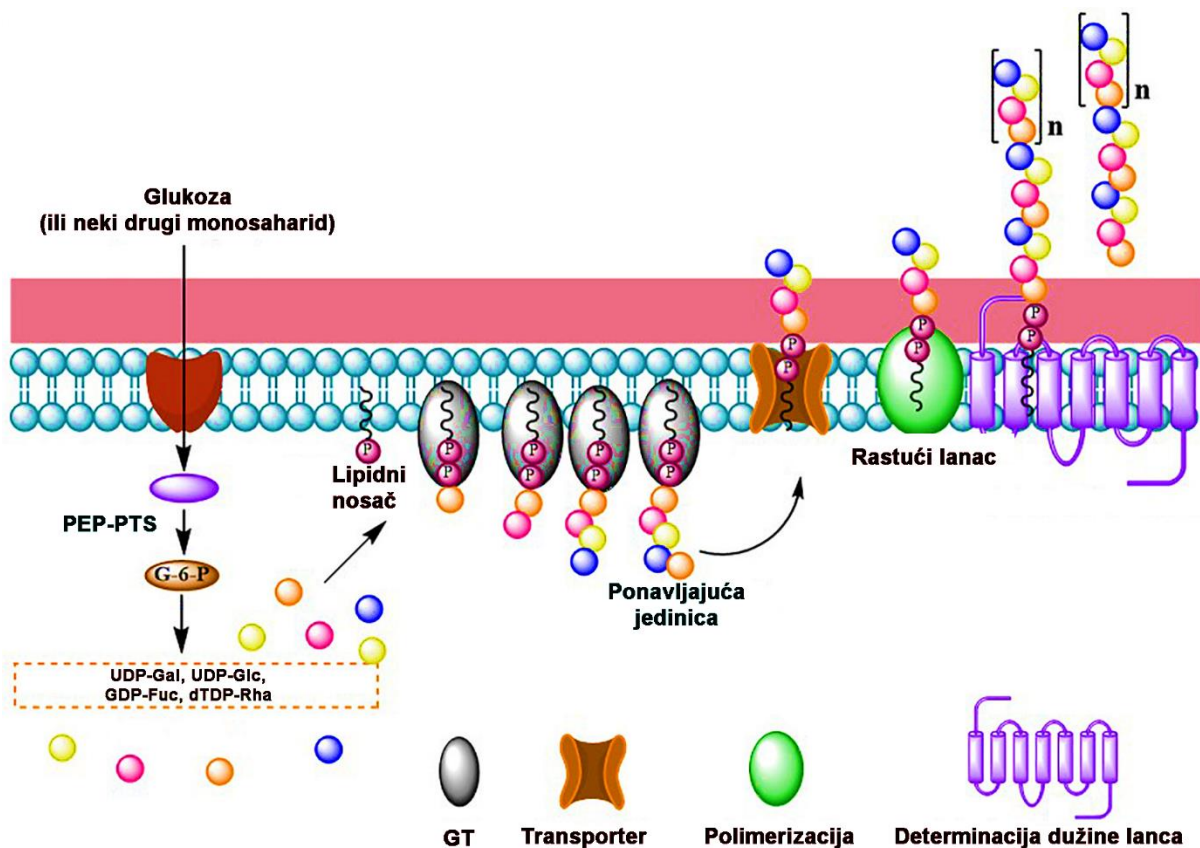
Na osnovu fenotipa, EPS se u literaturi opisuju kao rastegljivi (engl. *ropy*), sluzavi (engl. *slime*) i mukoidni (engl. *mucoïd*) (Ruas-Madiedo i de los Reyes-Gavilán, 2005). Rastegljivi fenotip u fermentisanim napicima doprinosi boljoj konzistenciji, većem viskozitetu i nižoj podložnosti procesu odvajanja surutke (engl. *syneresis*) (Ismail i Nampoothiri, 2014). Važno je napomenuti da variranje uslova kultivacije, poput promene pH medijuma za gajenje i izvora ugljenika, kao i temperature i dužine inkubacije, uzrokuje ispoljavanje različitih fenotipova EPS istog bakterijskog soja (Polak-Berecka et al., 2014b; Ruas-Madiedo i de los Reyes-Gavilán, 2005).

U zavisnosti od hemijskog sastava, EPS se klasifikuju u homopolisaharide (HoPS) i heteropolisaharide (HePS) (Laws 2001). HoPS karakteriše prisustvo jednog tipa monosaharida i ređe su prisutni u prirodi. Identifikovani HoPS su α i β -glukani, koji sadrže ponavljajuće jedinice glukoze, kao i fruktani (levan i inulinu sličan tip), kod kojih je fruktoza jedini monosaharid. Navedeni primeri HoPS se razlikuju u stepenu grananja i mestima povezivanja monosaharidnih jedinica (Monsan et al., 2001). Češće prisutni, ali manje količinski zastupljen, HePS (van Geel-Schutten et al., 1998) na površini bakterijskih ćelija odlikuje prisustvo različitih monosahararida, među kojima su glukoza, galaktoza, fruktoza, ramnoza, manoz, maltoza i arabinoza (Jiang i Yang, 2018). Monosaharidi mogu da budu supstituisani i nešećernim komponentama poput fosfata i glicerola. U sastavu nekih HePS se uočava i prisustvo N-acetilglukozamina, N-acetilgalaktozamina i glukuronske kiseline (Robijn et al., 1996; Ruas-Madiedo i de los Reyes-Gavilán, 2005). HePS laktobacila pokazuju visoku varijabilnost u građi (Oleksy i Klewicka, 2018). Između monomera se formiraju 1,4- β ili 1,3- β glikozidne veze i 1,2- α ili 1,6- α glikozidne veze (Górska et al., 2016; Hidalgo-Cantabrana et al., 2014).

1.3.4. Biosinteza EPS i njene genetičke osnove

Procesi biosinteze HoPS i HepS su kompleksni procesi koji se međusobno razlikuju (Oleksy i Klewicka, 2018). Uzevši u obzir da je prisustvo HePS kod laktobacila predominantno u odnosu na HoPS, proces biosinteze HoPS nije prikazan. Biosinteza HePS je izuzetno složen proces koji se kod laktobacila odvija u eksponencijalnoj fazi rasta, a može se nastaviti i u stacionarnoj (Polak-Berecka et al., 2013). Uočeno je i da količina EPS opada u uslovima produžene fermentacije (Pham et al., 2000). Uprkos velikom broju istraživanja koja su se bavila biosintezom EPS-a laktobacila, i dalje nema dovoljno podataka o kinetici njenog odvijanja, koja može rezultovati različitim varijacijama u prinosu i sastavu (Jurášková et al., 2022). U proces sinteze EPS uključeni su brojni enzimi i proteini. Biosinteza EPS podrazumeva 4 koraka (Slika 9) (Laws et al., 2001):

1. Transport ugljenih hidrata u citoplazmu,
2. Sintezu monosaharid-1 fosfata,
3. Polimerizaciju šećera, i
4. Transport rastućeg polisaharidnog lanca na površinu ćelije.



Slika 9. Predloženi mehanizam biositence EPS soja *L. fermentum* YL-11. Skraćenice: PEP-PTS-fosfoenolpiruvat-fosfotransferazni sistem; GT-glikoziltransferaza. Preuzeto i modifikovano iz Wei i saradnici (2019).

Monosaharidi i disaharidi su glavni izvori ugljenika za laktobacile. Njihovo preuzimanje iz spoljašnje sredine je najčešće regulisano fosfoenolpiruvat-fosfotransferaznim (engl. *phosphoenolpyruvate-phosphotransferase*, PEP-PTS) sistemom (De Vuyst i Degeest, 1999). Enzim piruvat kinaza katalizuje prenos fosfatne grupe sa PEP na uneti monosaharid, pri čemu nastaje monosaharid-1-fosfat. Modifikovani monosaharid ulazi u sastav EPS i prekursor je nukleotidnih derivata šećera (npr. uridin-difosfat glukoze- UDP-glukoza i timidin-difosfat glukoze- dTDP glukoza) koji nastaju tokom različitih metaboličkih procesa (Jolly et al., 2002; Jurášková et al., 2022). Polimerizacija EPS podrazumeva nastanak nekoliko stotina hiljada oligosaharidnih jedinica (Frengova et al., 2000). Undekaprenil fosfatni nosač je ukotvljen sa unutrašnje strane ćelijske membrane povezuje se β -glikozidnom pirofosfatnom vezom sa prvim nukleotidnim derivatom šećera (Caggianiello et al., 2016; Yother, 2011). Ovu reakciju katalizuje enzim primarna glikoziltransferaza, dok se aktivnošću ostalih glikoziltransferaza dodaju naredni šećeri u rastućem lancu. Izražena strukturna varijabilnost u građi EPS različitih bakterijskih sojeva je posledica prisustva velikog broja glikoziltransferaza koje uspostavljaju glikozidne veze (Stingele et al., 1999). Za translokaciju subjedinica kroz ćelijsku membranu zadužena je flipaza (Wzx), dok se nastavak polimerizacije više subjedinica vrši zahvaljujući aktivnosti enzima O-antigen polimeraze (Wzy) i polisaharidnih ko-polimeraze. Proteini kontrole dužine rastućeg lanca, autofosforilujuća tirozin kinaza i fosfotirozin protein kinaza zajedničkim delovanjem regulišu koordinaciju faza u procesu biosinteze EPS (Islam i Lam, 2013).

Intenzivni trend sekvenciranja celokupnih genoma sojeva laktobacila koji proizvode EPS je doprineo porastu saznanja o identifikaciji i organizaciji genetičkih determinanti odgovornih za biosintezu EPS. Na osnovu prvog sekvenciranog genoma soja *Lactobacillus plantarum* WCFS1, koji proizvodi EPS, utvrđeno je da su genetičke determinante od interesa u biosintezi EPS organizovane u *cps* klasterne gena (Kleerebezem et al., 2003; Remus et al., 2012). U okviru *cps* klastera su

identifikovani geni enzima odgovornih za regulaciju biosinteze, polimerizaciju, određivanje dužine rastućeg lanca, transport i povezivanje ponavljajućih jedinica (Remus et al., 2012). U većini analiziranih genoma, *cps* klasteri su lokalizovani na hromozomskoj DNK (Jiang i Yang, 2018). Prema broju prisutnih *cps* genskih klastera, predloženo je da se njihova organizacija svrsta u 4 tipa (A, B, C, D) (Jiang i Yang, 2018). Tip A sadrži 4 *cps* klastera i to je ujedno najveći do sada detektovan broj pronađen jedino kod WCFS1. Zapaženo je da klasteri *cps2* i *cps4* kodiraju sve elemente proteinske mašinerije uključene u biosintezu EPS, dok je *cps1* i *cps3* odlikovalo odsustvo gena za primarnu glikoziltransferazu (Remus et al., 2012). Tip B sadrži 3 *cps* klastera, najčešće *cps3* i *cps4* i kombinaciju gena iz *cps2*. Dok tip C sadrži kombinaciju *cps4* i ostalih, a tip D isključivo *cps4*. Pored toga, literaturno dostupni podaci ukazuju da manji broj laktobacila sadrži *cps2* sličan genski klaster lokalizovan na plazmidu u svojim genomima (Caggianiello et al., 2016; Lee et al., 2016). U zavisnosti od niše koju naseljavaju i sredinskih uslova u njoj, sadržaj detektovanih gena u klasterima značajno varira među sojevima (P. Li et al., 2016). Iako su saznanja o genetičkim determinantama uključenim u biosintezu EPS u porastu, i dalje su nedovoljno razjašnjeni regulatorni mehanizmi njihove ekspresije i povezanost sa fizičko-hemijskim svojstvima EPS i funkcionalnim karakteristikama (Jiang i Yang, 2018).

1.3.5. EPS laktobacila i uloga u zaštiti od toksičnih metala

Nakon primećenog svojstva da bakterije koje karakteriše prisustvo EPS ostvaruju visok nivo adsorpcije metala, pristupljeno je karakterizaciji njihove interakcije. Danas se zna da su one bazirane na privlačenju negativno naelektrisanih funkcionalnih grupa EPS i pozitivno naelektrisanih jona metala (Pal i Paul, 2008). Zastupljenost funkcionalnih grupa kao što su fosfatne, karboksilne, sulfatne, amidne i acetatne se razlikuje između bakterijskih sojeva i odgovorna je i za varijacije u afinitetu prema različitim metalima (Moppert et al., 2009). Vođeni ovim načelom, (Morillo et al., 2006) su ukazali da EPS izolovan iz *Paenibacillus jamilae* adsorbuje bakar, olovo, živu, kadmijum, kobalt, nikel i cink, ali da najveći afinitet ostvaruje prema olovu. Interakcija metala i EPS je fizičko-hemijski proces koji može rezultirati fizičkom sekvestracijom, razmenom jona i/ili precipitacijom pri čemu nastaju stabilni kompleksi (Bhakta et al., 2012).

Osim što je pokazano da EPS izolovan iz *L. rhamnosus* E/N u vodenom rastvoru vezuje jone kadmijuma (Polak-Berecka et al., 2014a), detaljnija istraživanja na temu moguće zaštite EPS od toksičnosti kadmijuma nisu urađena.

Zbog pojave neželjenih efekata tokom primene živih bakterija, koji su opisani u nekim studijama slučaja i kliničkim studijama (Doron i Snyderman, 2015), sve češća su istraživanja bazirana na supstituciji živih bakterija njihovim nevijabilnim ekstraktima ili metaboličkim produktima (Mayorgas et al., 2021). U master tezi pod nazivom „Uloga egzopolisaharida mlečnokiselinskih bakterija u zaštiti Caco-2 ćelija od štetnog delovanja kadmijuma“ je započeto izučavanje mehanizama zaštite ostvarene posredstvom laktobacila koji proizvode EPS (Brdarić, 2016), a nastavak predstavlja ova doktorska disertacija.

2. CILJEVI RADA

Zagađenje kadmijumom je zabrinjavajuć globalni problem za čijim rešenjem se intenzivno traga. U toku poslednjih godina, opisane su značajne uloge laktobacila u zaštiti od štetnog dejstva kadmijuma. Uzevši u obzir da se takva svojstva laktobacila najčešće pripisuje prisustvu egzopolisaharida na ćelijskoj površini i izraženiji trend zamene živih bakterija njihovim neživim, bioaktivnim produktima, postavljeni su sledeći ciljevi u doktorskoj disertaciji:

➤ **Ispitivanje *in vitro* ostvarene zaštite EPS, izolovanog iz laktobacila, od toksičnosti kadmijuma(II):**

1. Selekcija EPS produkujućeg soja laktobacila koji pokazuje visok nivo adsorpcije kadmijumovih jona u vodenom rastvoru i utvrđivanje sposobnosti izolovanog EPS da veže jone kadmijuma,
2. Detaljna *in silico* identifikacija genetičkih determinanti uključenih u biosintezu izabranog EPS,
3. Određivanje fizičko-hemijskih osobina izabranog EPS,
4. Analiza molekularnih mehanizama EPS posredovane zaštite Caco-2 ćelija od štetnih efekata jona kadmijuma.

➤ **Utvrđivanje *in vivo* zaštitnih efekata koje ostvaruje odabrani EPS u uslovima produžene oralne izloženosti kadmijumu(II):**

1. Analiza uticaja izabranog EPS na akumuliranje jona kadmijuma u organizmu,
2. Praćenje delovanja izabranog EPS na pojavu kadmijumom izazvanih histopatoloških promena,
3. Ispitivanje efekata izabranog EPS na kadmijumove mehanizme toksičnosti: oksidativni stres i inflamaciju,
4. Praćenje efekata izabranog EPS na kadmijumom izazvane promene u sastavu mikrobiote.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bakterijski sojevi

Upotrebljavani sojevi laktobacila, koje odlikuje sposobnost formiranja EPS (EPS⁺), prikazani su u Tabeli 2. Svi sojevi su iz kolekcije Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju (BG LMM) Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

Tabela 2. EPS⁺ sojevi laktobacila iskorišćeni u ovom radu.

Naziv bakterijske vrste	Naziv bakterijskog soja	Poreklo	Referenca
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	BGAN8	Beli kravliji sir	BG LMM kolekcija
	BGPKM22	Kravlje kiselo mleko	BG LMM kolekcija
	BGVL2a-18	Koziji sir	BG LMM kolekcija
	BGMI1	Beli kravliji sir	BG LMM kolekcija
	BGSJ2-3	Beli kravliji sir	BG LMM kolekcija
<i>Lacticaseibacillus rhammosus</i>	HI22	Humani intestinalni trakt	BG LMM kolekcija
	BGHV954	Humani vaginalni trakt	BG LMM kolekcija
	BGHV20	Humani vaginalni trakt	BG LMM kolekcija

3.2. Hranljive podloge za kultivaciju laktobacila

Laktobacili su gajeni u MRS (engl. *De Man-Rogosa-Sharpe*) tečnom medijumu (HiMedia GmbH, Ajnhauzen, Nemačka). Čvrste hranljive podloge su dobijane dodatkom 1,7 % agara (Torlak, Beograd, Srbija). Medijum je sterilisan 15 minuta na 121°C, u autoklavu. U zavisnosti da li su mezofilni ili termofilni, sojevi su gajeni na 30°C ili 37°C u aerobnim, odnosno, mikroaerofilnim uslovima. Za čuvanje bakterijskih sojeva na -80°C, u medijum je dodavan 15 % glicerol (SERVA Electrophoresis GmbH, Hajdelberg, Nemačka).

3.3. Priprema rastvora kadmijuma i upotrebljavane koncentracije

U svim eksperimentima je korišćen kadmijum-hlorid (CdCl₂, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, Sjedinjene Američke Države) rastvaran u visoko prečišćenoj vodi (engl. *ultra pure*). Za potrebe *in vitro* eksperimenata, pravljen je 1 mol/L CdCl₂, glavni stok, koji je čuvan na 4°C, a potom su pravljeni radni stokovi rastvaranjem u bidestilovanoj vodi ili medijumu za gajenje eukariotskih ćelija (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*, DMEM). Koncentracije kadmijuma korišćene u eksperimentu na životinjama su bile: 5 mg/L, što odgovara koncentraciji kojoj su ljudi oboleli od „itai-itai“ bolesti bili izloženi (Bhattacharyya et al., 1988), i 50 mg/L, što odgovara koncentraciji kadmijuma kojoj su ljudi profesionalno izloženi ili koncentraciji u sredinama sa viskim stepenom zagađenja kadmijumom (Wang et al., 2003).

3.4. Ispitivanje sposobnosti sojeva EPS⁺ laktobacila da adsorbuju jone kadmijuma

Modifikovan protokol Zhai i saradnika (2013) je korišćen za analizu adsorpcione moći odabranih sojeva laktobacila. Prekonoćne kulture (oko 16 sati) bakterijskih sojeva, navedenih u Tabeli 2, su dva puta oprane u slanom rastvoru sa fosfatnim puferom, pH 7,4 (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) (Sigma-Aldrich) (5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka, 4500 x g, 10 minuta). Uziman je po 1 mL oprane kulture, koji odgovara 1 x 10⁹ CFU, svakog soja i centrifugiran

na sobnoj temperaturi (5424, Eppendorf, 15 871 x g, 10 minuta). Nakon ovog koraka, ćelijski talog je resuspendovan u 1 mL 50 $\mu\text{mol/L}$ rastvora CdCl_2 i inkubiran 1 sat na 30°C . Po isteku vremena, ćelije su obarane (5424, Eppendorf, 15 871 x g, 20 minuta), a supernatant je čuvan na -20°C . Naredna ispitivanja su podrazumevala utvrđivanje koncentracije kadmijuma u supernatantu.

3.5. Određivanje koncentracije kadmijuma u vodenom rastvoru

Za određivanje koncentracije kadmijumovih jona korišćena je metoda masene spektrometrije sa indukovano kuplovanom plazmom (engl. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS). U tu svrhu je korišćen aparat iCAP Q (Thermo Scientific X series 2, Ujednjeno Kraljevstvo), dok je njegov rad kontrolisan pomoću softvera (engl. *Qtegra Instrument control software*). Podešeni instrumentalni parametri su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Eksperimentalna postavka uslova za ICP-MS.

Rf snaga (W)	1548
Vreme uzimanja uzorka (s)	3 x 50
Protoci gasova (L/min)	13,9 / 1,09 / 0,8
Broj tačaka po piku	3
Izmereni izotop	^{113}Cd
Broj replikata	3
Integraciono vreme (ns)	10
Napon sočiva (V)	7
Napon pulsnog stepena (V)	950

3.6. Izolovanje i prečišćavanje EPS

Izolacija egzopolisaharida soja *L. plantarum* BGAN8, u daljem tekstu EPS-AN8, vršena je u skladu sa postojećim protokolima (Dinić et al., 2018; Ruas-Madiedo et al., 2006) uz izvesne modifikacije. Da bi prinos bio što bolji, na 500 Petri šolja (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) koje su sadržale MRS agar, je utrljavano po 100 μL prekonoćne bakterijske kulture. Nakon 48 sati inkubacije na 30°C , bakterijske ćelije su sakupljane sterilnom, bidestilovanom vodom (2 mL vode po jednoj Petri šolji). U sakupljanu suspenziju je dodavan jedan volumen 2 mol/L natrijum-hidroksida (NaOH) (Lachner, Neratovice, Češka) i ostavljena je na mešanju 24 časa. Narednog dana je bakterijska suspenzija obarana (5804R, Eppendorf, 4500 x g, 30 minuta, 4°C), a u prikupljeni supernatant su dodavane dve zapremine 96 % etanola (Zorka pharm, Šabac, Srbija). Precipitacija je trajala 48 sati na 4°C . Nakon precipitacije, ponovljen je korak centrifugiranja. Supernatant je odlivan, a EPS-AN8 je u vidu precipitiranog taloga sušen sat vremena na 30°C i resuspendovan u bidestilovanoj vodi. Postupak prečišćavanja je započet procesom dijalize, u crevima za dijalizu 12-15 kDa MWCO (Sigma-Aldrich), koja je trajala 5 dana na temperaturi od 4°C . Svakog dana je 2 puta menjana bidestilovana voda u kojoj se dijaliza odvijala. Sledeći korak prečišćavanja je podrazumevao tretiranje EPS-AN8 DNazom tip-1 (Sigma-Aldrich, finalne koncentracije 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 6 sati, 37°C), u cilju smanjenja sadržaja nukleinskih kiselina, i pronazom E (Sigma-Aldrich, finalne koncentracije 50 $\mu\text{g/mL}$, narednih 18 sati, 37°C), u cilju smanjenja sadržaja proteina. Radi dodatnog smanjenja zaostalog sadržaja enzima i peptida korišćena je trihlorsirćetna kiselina (engl. *trichloroacetic acid*, TCA) (Sigma-Aldrich, finalne koncentracije 12 %, 30 minuta, uz mešanje na sobnoj temperaturi). Precipitirane nukleinske kiseline i proteini su uklanjane centrifugiranjem (5804R, Eppendorf, 4500 x

g, 30 minuta, 4°C), a sakupljenom supernatantu je podešena pH na neutralnu vrednost (7,0) dodavanjem 10 mol/L NaOH. Završni korak prečišćavanja je podrazumevao ponovnu petodnevnu dijalizu, nakon čega je EPS-AN8 liofilizovan, radi dalje upotrebe. Liofilizator korišćen u tu svrhu je Alpha 1-4 LSC plus (Martin Christ, Osterode am Harc, Nemačka).

3.7. Metoda određivanje adsorpcione moći EPS-AN8 za jone kadmijuma

Merenje vezivanja kadmijuma(II) za EPS-AN8 je urađeno prema modifikovanoj metodi koja je prethodno opisana (Polak-Berecka et al., 2014a). Liofilizovan EPS-AN8 je rastvoren u sterilnoj, bidestilovanoj vodi u koncentraciji 1 mg/mL i stavljen u creva za dijalizu, koja su prebačena u staklenu posudu sa rastvorom kadmijum-hlorida. Koncentracija rastvora je bila ista kao u eksperimentu gde se pratila adsorpcija sojeva (odjeljak 3.4.). Proces adsorpcije se odvijao na mešalici i trajao je 24 sata. Nakon prvog, drugog, trećeg i poslednjeg sata reakcije, uziman je po 1 mL uzorka i čuvan na -20°C. Koncentracija kadmijumovih jona u uzorku je određena na isti način kako je opisano u odeljku 3.5.

3.8. Metode rada sa DNK molekulom soja BGAN8

3.8.1. Izolacija totalne DNK iz soja BGAN8

Izolovanje ukupne DNK iz soja *L. plantarum* je rađeno prema ustanovljenoj metodi (Parish, 1986). Bakterijska kultura u logaritamskoj fazi rasta, optičke gustine između 0,4 i 0,6, je oborena (5804R Eppendorf, 4500 x g, 10 minuta) i oprana u 500 µL TEN pufera (50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA i 50 mmol/L TRIS-HCl, pH 8,0) (Sigma-Aldrich). Nakon ponovnog obaranja (5424 Eppendorf, 15 871 x g, 2 minuta), talog je resuspendovan u 500 µL PP pufera (0,5 mmol/L saharoza, 10 mmol/L Mg-acetat, 40 mmol/L NH₄-acetat) (Sigma-Aldrich) obogaćenom lizozimom (7 mg/mL) (SERVA Electrophoresis GmbH). Inkubacija je trajala 30 minuta, na 37°C, a nakon nje je dodavan 2 % SDS (engl. *Sodium dodecil sulfate*, SDS), 250 µL, i smeša je intenzivno vorteksovana. Odstranjivanje proteina je postignuto dodavanjem fenol-hloroforma, 250 µL, i ponovnim centrifugiranjem (5424 Eppendorf, 15 871 x g, 20 minuta). Za dalju precipitaciju, u prebačeni supernatant je dodavano 30 µL 3 mol/L Na-acetata i 300 µL izopropanola, a potom je centrifugiranje trajalo 15 minuta (5424 Eppendorf, 15 871 x g). Za oslobađanje od viška soli je korišćen hladni, 70 % etanol, 700 µL i centrifugiranje (5424 Eppendorf, 15 871 x g, 5 minuta). Uzorak je sušen 30 minuta na 37°C, zatim rastvoren u 50 µL bidestilovane vode koja je sadržala RNazu (10 mg/mL) (SERVA Electrophoresis GmbH) i inkubiran na 37°C-30 minuta. Izolovana DNK je do naredne upotrebe čuvana na -20°C.

3.8.2. Horizontalna gel elektroforeza DNK

U cilju provere uspešnosti izolacije ukupne DNK urađena je horizontalna elektroforeza na 1 % agaroznom gelu. Gelovi su formirani rastvaranjem 1 g agaroze (Sigma-Aldrich) u 1 x TAE puferu (1 mmol/L EDTA, 40 mmol/L Tris-acetat, pH 8,0) i dodavanjem 0,5 µg/mL etidijum bromida (Sigma-Aldrich). Elektroforeza se odvijala u 1 x TAE puferu, na sobnoj temperaturi i konstantnom naponu koji je iznosio od 1 do 10 V/cm gela. GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) je predstavljao DNK standard. Nakon vizuelizacije na gelu, koncentracija izolovane DNK je izmerena na spektrofotometru (BioSpec-nano, Shimadzu, Tokio, Japan).

3.8.3. Sekvenciranje genoma soja *L. plantarum* BGAN8

U centru za sekvenciranje MicrobesNG (IMI School of Biosciences, Univerzitet u Birminghamu, Birmingham, Velika Britanija) je uslužno sekvenciran celokupni genom soja *L. plantarum* BGAN8. U tu svrhu korišćena je Illumina HiSeq 2500 platforma.

3.8.4. *In silico* analiza gena čiji su proteinski produkti uključeni u biosintezu EPS-AN8

Za predikciju otvorenih okvira čitanja (engl. *open reading frame*, ORF) genomske sekvence soja *L. plantarum* BGAN8 korišćen je program GenMark (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>), dok je za anotaciju gena i procenu homologije proteina uključenih u biosintezu EPS-a sa proteinima referentnog genoma soja *L. plantarum* WCFS1, poznatog proizvođača EPS-a (Kleerebezem et al., 2003; Remus et al., 2012), upotrebljavan BLAST (engl. *Basic local alignment search tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Utvrđivanje hromozomske ili plazmidne lokacije gena odgovornih za biosintezu EPS-AN8 u genomu je izvršeno upotrebom Mlplasmids programa (<https://sarredondo.shinyapps.io/mlplasmids/>).

Genomska sekvenca soja *L. plantarum* BGAN8 je deponovana u NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) GenBank bazi podataka pod pristupnim brojem JARIYH000000000.

Sekvenca genoma soja *L. plantarum* WCFS1 je dostupna u NCBI GenBank bazi podataka pod pristupnim brojem NC_004567.2.

3.9. Metode fizičko-hemijske karakterizacije EPS-AN8

3.9.1. Određivanje molekularne mase EPS-AN8

Metoda molekuskog sejanja je upotrebljena za određivanje molekularne mase EPS-AN8, prateći opisan protokol (Nikolic et al., 2012). Ova metoda je odrađena u hromatografskom sistemu (Waters, Milford, Masačusets, Sjedinjene Američke Države), koji se sastojao iz modularnog injektora (Alliance 2690), svetlosnog detektora podešenog na 260 nm (Photodiode Array 996 Detector), detektora zaduženog za merenje refrakcionog indeksa (engl. *Refraction index detector 410*) i softvera (Empower-Waters). Sistem je kupovan sa detektorom višeugaonog rasipanja svetlosti (engl. *Multiangle light scattering*). Za analizu rasprostranjenosti molekularnih masa je iskorišćen Astra 3.5 softver. Kolone TSK-Gel G3000 PW_{XL} i TSK-Gel G5000 PW_{XL}, smeštene u zaštitne kolone (engl. *TSK-Gel guard column*) (Sigma-Aldrich), služile su za razdvajanje na temperaturi od 40°C i sa protokom koji je iznosio 0,45 mL/min. Mobilna faza je bio 0,1 mol/L natrijum-nitrat (NaNO₃) (Sigma-Aldrich). U reakciju je pušteno 10 mg/mL EPS-AN8. Eksperiment je ponovljen tri puta.

3.9.2. Analiza biohemijskog sastava EPS-AN8

U cilju identifikacije i kvantifikacije monosaharida koji ulaze u sastav EPS-AN8 urađena je gasno-tečna hromatografija na gasnom hromatografu (Agilent, Sent Klara, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države). Inicijalno, 1,6 mg liofilizovanog EPS-AN8 je podvrgnuto hidrolizi za koju je upotrebljena 3 mol/L trifluorsirćetna kiselina (engl. *trifluoroacetic acid*, TFA), pri temperaturi od 121°C u periodu trajanja od 90 minuta. Za redukciju monosaharida u njihov odgovarajući alditol acetatni oblik korišćen je natrijum-borohidrid i naknadna acetilacija, prema opisanom protokolu (Laine et al., 1972). DB-BHT (30 m x 0,25 mm veličine unutrašnjeg prečnika) (Agilent) kolona je povezana sa četvoropolnim masenim detektorom. Program „*rerne*“ je započet na 175°C, u trajanju od 1 minuta, i rastao je po 2,5°C do postizanja temperature od 204°C. Helijum je korišćen kao gasni nosač, protok je iznosio 1 mL/min. Identifikacija je vršena na osnovu poklapanja retencionog vremena monosaharida sa prethodno izmerenim retencionim vremenom standarda, u identičnim uslovima. Inozitol je korišćen kao interni standard. Eksperiment je rađen u triplikatu.

3.9.3. Metoda infracrvene spektroskopije sa Furijevom transformacijom EPS-AN8

Infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom (engl. *Fourier Transform Infrared spectroscopy*, FTIR) je urađena kao dodatna potvrda kvalitativne analize EPS-AN8. Ova metoda je bazirana na svojstvu svakog molekula da poseduje jedinstven vibracioni spektar u infracrvenoj

oblasti, pa se može koristiti za detaljniju strukturnu analizu biopolimera i identifikaciju jedinjenja (Verhoef et al., 2005). U tu svrhu, korišćen je Nicolet iS10 spektrometar (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, Sjedinjene Američke Države). Opseg spektra talasnih dužina u kojem je uzorak snimljen se kretao od 400 do 4000 cm^{-1} , rezolucija je iznosila 4 cm^{-1} , broj skeniranja je bio 32 po principu ometane totalne refleksije (engl. *Attenuated total reflectance*). Za finalni korak obrade podataka i grafički prikaz upotrebljen je OMNIC softver.

3.10. In vitro grupa eksperimenata na diferenciranim Caco-2 ćelijama

3.10.1. Caco-2 ćelije

Ćelije humanog epitelnog kolorektalnog adenokarcinoma, Caco-2 (Evropska kolekcija ćelijskih kultura, ECACC, broj 86010202), su predstavljale *in vitro* model sistem za izučavanje mehanizama zaštite koju ostvaruje EPS-AN8 na toksično delovanje kadmijuma(II). Ćelije su gajene u DMEM medijumu i u CO_2 inkubatoru sa 5 % CO_2 , u vlažnoj atmosferi, na temperaturi od 37°C. DMEM medijum je obogaćen fetalnim goveđim serumom (10 %), penicilinom (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) i streptomycinom (100 U/mL), kao i L-glutaminom (2 mmol/L). U cilju izbegevanja interferiranja signala pri kasnije rađenim testovima, tretmani su dodavani resuspendovani u DMEM medijumu koji nije sadržao fenolnu crvenu boju. Proizvođač navedenih komponenti je bio Thermo Fisher Scientific. Po odmrzavanju iz tečnog azota, ćelije su gajene u T75 flaskovima (Sarstedt) i pasažirane su pri konfluentnosti od 70 %. Za odlepljivanje ćelija, koje je neophodno za korak pasažiranja, korišćen je 0,25 % tripsin (Torlak, Beograd, Srbija) obogaćen 1 mmol/L EDTA. Za potrebe narednih eksperimenata, zasejano je 2×10^5 ćelija po bunaru, u pločama sa 24 bunara (Sarstedt). Za potrebe testova koji prate propustljivost formiranog konfluentnog sloja ćelija, u bunare su stavljani bazeni sa poroznim dnom (engl. *transwell inserts*) (Sarstedt), čiji su prečnici iznosili 0,4 μm . Ćelije su diferencirane po ustaljenoj proceduri (Popović et al., 2019; Sokovic Bajic et al., 2019), koja je podrazumevala zamenu medijuma na svaka dva dana u vremenskom periodu od 21 dana. Po isteku 21. dana vršeni su tretmani kadmijumom(II) i EPS-AN8. Svaki eksperiment je rađen u triplicatu i ponovljen je tri puta.

3.10.2. Dizajn eksperimenata na diferenciranim Caco-2 ćelijama

Da bi se pratile štetne promene koje kadmijum ostvaruje u ćeliji, neophodno je bilo pronaći njegovu koncentraciju koja ne izaziva smrtnost ćelija višu od 10 % i koja je označena kao subtoksična koncentracija. Zbog toga su inicijalni eksperimenti podrazumevali tretiranje diferenciranih Caco-2 ćelija sa različitim koncentracijama CdCl_2 koje su se kretale u opsegu od 50 μM do 200 μM , u periodu koji je trajao 24 časa.

Liofilizovan EPS-AN8 je rastvaran u DMEM medijumu za ćelije u koncentracijama koje su iznosile 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Obe koncentracije su se uklapale u opseg koncentracija koje su se mogle pronaći u literaturnim podacima (Liu et al., 2019). U cilju analize bezbedne primene navedenih koncentracija EPS-AN8, u toku 24 sata je praćen potencijalni citotoksičan efekat koji bi one mogle da ostvare.

Da bi se utvrdio zaštitni efekat koji ostvaruje EPS-AN8, ćelije su istovremeno tretirane prethodno određenom subtoksičnom koncentracijom CdCl_2 i nižom, odnosno, višom koncentracijom EPS-AN8. Radi upoređivanja promena, ćelije su tretirane i samo CdCl_2 , dok su kontrolu činile netretirane ćelije kojima je dodavan isključivo medijum za rast ćelija. U zavisnosti od ispitivanih parametara, tretmani su trajali 3 sata, kada je vršeno praćenje promena relativne ekspresije gena na nivou RNK, odnosno 24 sata kada su rađeni testovi citotoksičnosti i propustljivosti, kao i praćenje efekata CdCl_2 i EPS-AN8 na nivou ekspresije proteina i promene parametara oksidativnog stresa.

Osim pristupa u karakterizaciji mehanizama zaštite koji je podrazumevao simultane tretmane, ispitan je i potencijalni vid zaštite koji bi EPS-AN8 ostvario nakon što je kadmijum(II) prouzrokovao oštećenja u diferenciranim Caco-2 ćelijama. Ovakav terapijski pristup je vršen tako što su ćelije podvrgnute subtoksičnoj koncentraciji 24 sata, a potom je dodavan EPS-AN8, niže, odnosno, više koncentracije, i ostavljan da deluje narednih 24 časa. Promene su praćene na nivou zastupljenosti proteina od interesa.

Za potrebe testova citotoksičnosti i oksidativnog stresa čuvani su supernatanti na -20°C , dok su za praćenje promena na nivou RNK i proteina ćelije čuvane na -80°C .

3.11. Test citotoksičnosti

Esej, koji je korišćen za utvrđivanje citotoksičnog efekta rastvora kadmijuma, kao i tretmana koji su podrazumevali korišćenje EPS-AN8, se bazira na merenju aktivnosti enzima koji se oslobađa iz mrtvih ćelija-laktat dehidrogenaze (LDH) u supernatantima, i označava se kao LDH esej. Za LDH test je korišćen komercijalno dostupan kit (Thermo Fisher Scientific) i rađen je u skladu sa datim uputstvima. Apsorbanca je merena upotrebom čitača mikrotitarskih ploča (Tecan Austria GmbH, Grodig, Austrija), na talasnoj dužini od 490 nm, sa referentnom talasnom dužinom na 680 nm.

3.12. Izolacija totalne RNK iz diferenciranih Caco-2 ćelija

Izolacija RNK iz ćelija je rađena po prethodno opisanoj metodi (Lukic et al., 2013; Sokovic Bajic et al., 2019). Inicijalno, ćelije su resuspendovane u 500 μL denaturišućeg pufera, čije su komponente bile: 4 mol/L guanidin tiocijanat, 0,1 mol/L 2-merkaptoetanol, 25 mmol/L natrijum-citrat i 0,5 % natrijumova so N-lauroilsarkozin (Sigma-Aldrich). Ćelije su ostavljene u mikrotubama 10 minuta na ledu, da bi se postigla što bolja homogenizacija. Po isteku vremena, dodat je isti volumen kiselog fenola (pH 4,0), 1/5 volumena hloroforma i 1/10 zapremine 2 mol/L natrijum-acetata (SERVA Electrophoresis GmbH). Dodavanje je praćeno intezivnim mućkanjem do smanjenog viskoziteta svakog homogenata. Nakon ostavljanja ependorfica 15 minuta na ledu, homogenati su iscentrifugirani. Sva centrifugiranja u toku procesa izolacije RNK su vršena pri istovetnim uslovima: 17949 x g, 20 minuta, pri temperaturi od 4°C , u 5417R Eppendorf centrifugi. Gornja faza je prebacivana u tube koje su sadržale istu zapreminu izopropanola (Sigma-Aldrich). Da bi se pospešila precipitacija, smeša je ostavljena 1 sat na -20°C i ponovljano je obaranje. Sledeći korak u postupku izolacije je bio dodavanje 75 % etanola i centrifugiranje, nakon čega su supernatanti odbačeni. Talog je sušen 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je rastvoren u bidestilovanoj vodi, koja nije sadržala RNaze ni u tragovima. Koncentracije izolovanih RNK su merene na spektrofotometru (BioSpec-nano). Do naredne upotrebe, izolovana RNK je ostavljena na -80°C .

3.13. Lančana reakcija polimeraze „PCR“

PCR metoda je korišćena u cilju provere kontaminacije izolovane RNK, genomskom DNK. Korišćeni su prajmeri za konstitutivno eksprimiran gen koji kodira gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH). Reakcionu smešu su činili: 1 μL izolovane RNK, 1 U DreamTaq DNK polimeraza (Thermo Fisher Scientific), 1 x reakcioni pufer obogaćen magnezijumom, 0,2 mmol/L dNTP (Thermo Fisher Scientific) i 10 pmol prajmera. PCR reakcija je urađena u Gene AmpR System 2700 aparatu (Applied Biosystems, Voltam, Masačusets, Sjedinjene Američke Države). Program korišćen za PCR reakciju se sastojao iz inicijalne denaturacije (5 minuta, 95°C); 30 ponavljajućih ciklusa denaturacije (30 sekundi, 95°C), hibridizacije prajmera (30 sekundi, 55°C) i sinteze fragmenata (30 sekundi, 72°C); nakon kojih je usledila finalna sinteza nedovršenih fragmenata (5 minuta, 72°C). Po završetku uzorci su provereni na 1 % gelu na identičan način opisan u odeljku 3.8.2.

3.14. Reakcija sinteze komplementarne DNK

Prevođenje RNK u komplementarnu DNK (engl. *complementary DNA*, cDNK), odnosno, proces reverzne transkripcije RNK urađen je prateći uputstva proizvođača enzima reverzne transkriptaze (Thermo Fisher Scientific). Kao početna matrica za sintezu cDNK, korišćeno je 500 ng izolovane RNK iz diferenciranih Caco-2 ćelija. Napravljena je smeša, finalne zapremine od 13 μ L, koja je sadržala RNK, nasumične heksanukleotide (100 pmol) i bidestilovanu vodu. Vršeno je denaturisanje sekundarnih struktura RNK inkubiranjem smeše na 65°C. Potom je do zapremine od 20 μ L dodavan ribonukleazni inhibitor (20 U), dNTP smeša (1 mmol/L), reverzna transkriptaza (200 U RevertAid H minus) i reakcioni pufer (1 x). Neophodni uslovi za reakciju su bili: 10 minuta na 25°C, 60 minuta na 42°C i 10 minuta na 70°C. Po završetku uspešnost sinteze cDNK je proveravana po istom principu kao što je opisano u odeljku 3.13.

3.15. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu, „qPCR“

Kvantifikacija ekspresije gena je urađena upotrebom metode kvantitativni PCR (engl. *quantitative*, qPCR). Matrica je bila 5 x razblažena cDNK. Spisak iskorišćenih prajmera se nalazi u Tabeli 4. Zapremina reakcione smeše je iznosila 10 μ L i sastojala se iz: 2 μ L cDNK, po 1 μ L oba prajmera (4pmol), 5 μ L SYBR[™] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) i 1 μ L bidestilovane vode. Aparatom 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) je vršena reakcija umnožavanja prema programu koji se sa sastojao iz aktivacije enzima (10 minuta, 95°C) i 40 ciklusa umnožavanja (15 sekundi, 95°C i 60 sekundi, 60°C). Esejem apsolutne kvantifikacije procenjena je efikasnost prajmera i količina cDNK, koja je neophodna za uspešnu reakciju. Izračunavanje ekspresije gena je rađeno po ustanovljenoj formuli $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak i Schmittgen, 2001). Razlika između ΔCt uzorka (Ct , prazna vrednost ciklusa) ispitivanog uzorka i ΔCt definisanog kalibratora predstavlja vrednost $\Delta\Delta Ct$. Vrednost ΔCt uzorka jeste razlika između Ct vrednosti uzorka za gen od interesa i Ct vrednosti uzorka za konstitutivno eksprimiran gen *GAPDH*, koji predstavlja endogenu kontrolu. Kao kalibrator se koristi kontrolni uzorak, odnosno, netretirane Caco-2 ćelije.

Tabela 4. Prajmeri za eukariotske gene iskorišćeni u ovom radu.

Naziv gena	Sekvenca prajmera 5'→3'	Literatura
<i>IL-8</i>	ACACAGAGCTGCAGAAATCAGG	(Angrisano et al., 2010)
	GGCACAAACTTTTCAGAGACAG	
<i>CDH1</i>	AGCCTGTGCGAAGCAGGATTG	(Popović et al., 2020)
	AGAAACAGCAAGAGCAGCAGA	
<i>OCN</i>	TCAGGGAATATCCACCTATCACTTCAG	(Elamin et al., 2012)
	CATCAGCAGCAGCCATGTACTCTTCAC	
<i>ZO-1</i>	AGGGGCAGTGGTGGTTTCTGTTCTTTC	(Elamin et al., 2012)
	GCAGAGGTCAAAGTTCAAGGCTCAAGAGG	
<i>NQO1</i>	GGATTGGACCGAGCTGGAAA	ovaj rad
	CAAACCTGAAACACCCAGCCG	
<i>GAPDH</i>	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	(Freudenberger et al., 2014)
	TGAGGTCAATGAAGGGGTC	

3.16. SDS-PAGE

Izolovanje ukupnih proteina iz ćelija je izvršeno upotrebom RIPA pufera (150 mmol/L, NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 7,4, 1 % NP-40, 0,25 % natrijum-dezoksiholat) (Sigma-Aldrich) sa dodatkom proteinaznog inhibitora (Roche, Bazel, Švajcarska) i 1 mmol/L fenilmetansulfonil-fluorid (PMSF, Sigma-Aldrich), da bi se sprečila njihova degradacija. Za merenje koncentracije proteina primenjivan je kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), a protokol je izveden prateći preporuke proizvođača. SDS-poliakrilamidnom gel (SDS-PAGE) elektroforezom je vršeno razdvajanje proteina. Podešavanje iste koncentracije proteina, iz svakog uzorka, je postignuto resuspendovanjem u 2 x Laemmli puferu (20 % glicerol, 10 % β -merkaptotanol, 4 % SDS, 0,004 %

bromfenol plavo i 125 mmol/L Tris HCl, pH 6,8). Nakon toga je sledio korak inkubacije (5 minuta, 95°C). Za SDS-PAGE razdvajanje korišćen je diskontinuiran sistem gelova, koji su činili gel za koncentrisanje (7 % akrilamid/bisakrilamida, 125 mmol/L Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS) i gel za razdvajanje (12 % akrilamid/bisakrilamida, 375 mmol/L Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % SDS). U cilju postizanja polimerizacije, gelovima su dodati 0,07 % amonijum persulfat i 0,1 % TEMED (SERVA Electrophoresis GmbH). Elektroforeza se odvijala na konstantnoj struji (20 mA) u puferu (186 mmol/L glicin, 25 mmol/L Tris, pH 8,3 i 0,1 % SDS).

3.17. Western blot metoda

Western blot metodom je određivana zastupljenost ciljnih proteina u uzorku ukupnih proteina. Navedena metoda je rađena prema prethodno opisanoj proceduri (Dinić et al., 2017; Popović et al., 2019), uz izvesne modifikacije. Po završetku 12 % SDS-PAGE, na osnovu molekularne mase proteini su razdvajani i prebacivani na 0,2 mm nitroceluloznu membranu (GE Healthcare, Čikago, Illinois, Sjedinjene Američke Države). Navedeni vlažni transfer je rađen korišćenjem Bio-Rad Mini trans-blot sistema (Bio-Rad, Herkujliz, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države), na temperaturi od 4°C. Transfer je tekao 1 sat na magnetnoj mešalici pri struji 330 A. Po njegovom završetku, da bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, membrana je inkubirana u TBST puferu (engl. *Tris buffered saline-tween 20*) (150 mmol/L natrijum-hlorid, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,4 i 0,05 % Tween-20) obogaćenim 10 % obranim mlekom (Merck, Darmštadt, Nemačka), u periodu od 1 sata, uz konstantno blago mešanje. Nakon toga, membrane su isečene, vodeći računa o veličini proteina od interesa i inkubirane preko noći sa anti-GAPDH (1:1000, Thermo Fisher Scientific), anti-klaudin antitelom (1:1000, CLDN-4, Thermo Fisher Scientific) i anti-p65 antitelom (1:500, aktivna fosforilisana forma NFκB, Cell signaling technology, Danvers, Masačusets, Sjedinjene Američke Države). Inkubacija sa navedenim primarnim antitelima je bila na 4°C. Zatim su membrane 3 x po 15 minuta ispirane u TBST puferu. Sledeći korak je bila inkubacija sa sekundarnim kozijim anti-zečijim IgG antitelom, koje je obeležavano perkosidazom rena (engl. *horseradish peroxidase, HRP*) (1:10000, Thermo Fisher Scientific), 1 sat na sobnoj temperaturi. Ponovljeno je ispiranje od 3 x po 15 minuta, u puferu TBST. Završni korak je bio nanošenje ECL reagensa (Immobilon Western, Merck Milipore) i detekcija hemiluminiscencijom na ChemiDoc (Bio-Rad) aparatu. Softverom ImageJ je denzitometrijski analizirana ekspresija proteina.

3.18. Esej propustljivosti

Narušenost međucelijskih veza je praćena esejem propustljivosti, koji se bazira na pasivnom transportu žute Lucifer boje (engl. *Lucifer yellow, LY*) (Thermo Fisher Scientific), prema modifikovanoj metodi (Yamaura et al., 2016). LY boja (25 mg) je inicijalno rastvorena u 1 mL DMSO i čuvana na -20°C. Za rad na ćelijama se koristila LY boja koja je 1000 x razblažena u 1 x PBS rastvoru. Na apikalnu stranu membrane Caco-2 ćelija je dodavano 500 µL rastvora koji je sadržao LY boju, dok se bazalna membrana nalazila u 1 x PBS rastvoru. Pasivni prolazak boje je praćen nakon 1 sata, a zatim je sakupljan supernatant sa bazalne strane, 200 µL, i prebacivan u mikrotitarske ploče. Za detekciju fluorescencije je korišćen čitač mikrotitarskih ploča (Tekan). Eksitacija je merena na 428 nm, dok je emisija merena na 536 nm. Izmerena vrednost je bila direktno proporcionalna stepenu oštećenja međucelijskih veza.

3.19. Aktivnost enzima superoksid dismutaze

Superoksid dismutaza (SOD) je enzim odgovoran za reakciju dismutacije superoksidnog anjona u vodonik-peroskid (H_2O_2) i u molekularni kiseonik (O_2) (Canada i Calabrese, 1989). Za detekciju aktivnosti SOD enzima upotrebljavan je komercijalno dostupan kit SOD Assay kit (Sigma-Aldrich), prateći uputstvo proizvođača. Navedena kolorimetrijska metoda je bazirana na indirektnom merenju aktivnosti SOD enzima, preko formiranja kompleksa tetrazolijumskih soli i formazana. Apsorbanca je očitavana na 440 nm, upotrebom čitača mikrotitarskih ploča (Tekan).

3.20. Eksperimenti na životinjama i tretmani

3.20.1. Eksperimentalne životinje

U svim eksperimentima je korišćen Dark Agouti (DA) soj pacova. Eksperimenti su urađeni na DA mužjacima starim 10-12 nedelja. Odgajanje životinja se odvijalo u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, pod kontrolisanim uslovima (relativna vlažnost vazduha 60 %, temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciklusi svetla i mraka su se smenjivali na 12 sati). Hrana i voda su bili dostupni 24 časa. Rad sa eksperimentalnim životinjama je strogo poštovao etičke principe definisane u Direktivi Evropske Unije o zaštiti životinja korišćenih u naučnoistraživačke svrhe (2010/63/EU). Sve eksperimente je odobrilo Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede-Uprava za veterinu (broj rešenja je 323-07-11824/2020-05).

3.20.2. Dizajn eksperimenata na DA pacovima

Životinje su bile smeštene pojedinačno u kaveze. Količina pojedene hrane u toku 24 časa je merena svakodnevno tokom eksperimentalnog perioda. Životinjama, koje su unosile EPS-AN8, je uvek prvo dat deo hrane na koji je nakapan EPS-AN8 rastvoren u bidestilovanoj vodi. Nakon što bi pacov pojeo obogaćenu hranu, dobio bi ostatak netretirane hrane. Masa životinje je merena svake nedelje.

Rad na životinjama je obuhvatao dve odvojene grupe eksperimenata.

Da bi se ispitalo da li sam EPS-AN8 ima imunomodulatorni potencijal, jedinkama je u toku 15 dana davana hrana natopljena EPS-AN8. Eksperiment je obuhvatao sledeće grupe:

- Kontrolna grupa (5 DA pacova), životinje su pile čistu vodu i jele hranu bez EPS-AN8,
- EPS-AN8 grupa (5 DA pacova), životinje su pile čistu vodu i unosile hranu koja je sadržala $100 \mu\text{g/mL}$ EPS-AN8.

Po isteku 15. dana, pacovi su žrtvovani intramuskularnim ubrizgavanjem anestezije Zoletil ($0,15 \text{ mL/kg}$) (Virbac, Carros, Francuska). Nakon krvarenja u dubokoj anesteziji, izolovani su organi za dalji rad.

U drugoj grupi eksperimenata (nakon analize rezultata iz prve grupe) ispitivano je da li EPS-AN8 ostvaruje zaštitni efekat na životinje pri paralelnom unosu kadmijuma(II). Jedinke su dobijale kadmijum-hlorid rastvoren u destilovanoj vodi. Dva puta nedeljno je pravljen svež rastvor i menjana je voda životinjama. Dužina eksperimenata je bila 30 dana. Eksperimentalne grupe su bile sledeće:

- Kontrolna grupa (5 DA pacova), životinje su pile čistu destilovanu vodu i jele hranu bez EPS-AN8,
- 5 mg/L Cd^{2+} (4 DA pacova), životinje su putem vode unosile 5 mg/L kadmijuma(II) i jele hranu bez EPS-AN8,
- EPS-AN8/ 5 mg/L Cd^{2+} (5 DA pacova), životinje su kroz vodu unosile 5 mg/L kadmijuma(II) i kroz hranu $100 \mu\text{g/mL}$ EPS-AN8,
- 50 mg/L Cd^{2+} (4 DA pacova), životinje su pile 50 mg/L rastvora kadmijuma i jele hranu EPS-AN8,
- EPS-AN8/ 50 mg/L Cd^{2+} (5 DA pacova), životinje su kroz vodu bile izloženi dozi od 50 mg/L rastvora kadmijuma, a putem hrane su unele $100 \mu\text{g/mL}$ EPS-AN8.

Na 30. dan, sakupljen je fekalni uzorak svake životinje i pacovi su na isti način žrtvovani, kao u predašnjem eksperimentu. Delovi duodenuma, bubrega i jetre su zamrznuti u tečnom azotu i skladišteni na -80°C , za kasnije korišćenje u eksperimentima.

3.21. Priprema tkiva za metodu merenja koncentracije jona kadmijuma

Uzorci krvi, duodenuma, bubrega i jetre su pripremani za određivanje koncentracije jona kadmijuma. Za merenje koncentracije je korišćen ICP-MS, kao u odeljku 3.5. Sav stakleni pribor za rad je prethodno stajao u 10 % azotnoj kiselini (HNO_3), a potom više puta ispiran u visoko prečišćenoj vodi. Uzorci tkiva i fecesa (0,2 mg), kao i krvi (1 mL) su odmeravani i prebacivani u politeflonske kivete. U cilju razaranja organske materije i ubrzanja procesa razlaganja, u kivete je dodavano 7 mL 65 % HNO_3 i 1 mL 30 % H_2O_2 . Proces mikrotalasne digestije se odvijao u mikrotalasnoj pećnici (Speedwave, Berghof, Nemačka), i obuhvatao je naredne korake: uzorci su se zagrevali 10 minuta do postizanja temperature od 200°C, potom su na toj temperaturi držani 15 minuta. Po završetku, uzorci su premešteni u teflonske čaše da bi se postiglo isparavanje tečnosti do 3 mL i količina kiseline smanjila. Po hlađenju, uzorci su prebacivani u volurimetrijske sudove i razblaživani bidestilovanom vodom. Naredni koraci analize su urađeni na način kao što je opisano u odeljku 3.5. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu i svaka analiza se sastojala iz tri ponavljanja.

3.22. Histološka analiza tkiva duodenuma, bubrega i jetre

Nakon završenog žrtvovanja, uzorci duodenuma su fiksirani u 4 % rastvoru formaldehida (Sigma-Aldrich) (pH 4,9). Nakon 48 sati, tkivo je sprovedeno kroz serijska razblaženja etanola rastuće koncentracije (30 %, 50 %, 70 %, 96 %, 100 %). Tkiva su zatim prosvetljavana u ksilolu i ukalupljena u parafin. Preseci tkiva debljine 5 μm su pravljani na mikrotomu. Preseci su potom obojeni hematoksilinom (BioGnost, Zagreb, Hrvatska) i eozinom (Molar Chemicals Kft, Budimpešta, Mađarska). Praćenje histopatoloških promena i slikanje preseka je rađeno na Leica DMLB svetlosnom mikroskopu (Leica Microsystems, Veclar, Nemačka), opremljenim Leica DFC295 kamerom i softverom (LAS core).

3.23. Priprema homogenata duodenuma

Procesi homogenizacije i sonifikacije su sve vreme rađeni na ledu. Homogenizacija uzoraka vršena je upotrebom električnog homogenizera IKA T18 Basic Homogenizer (IKA Works Inc, Vilmington, Severna Karolina, Sjedinjene Američke države). Proces homogenizacije je rađen u 10 mL saharoznom puferu (250 mmol/L saharoza, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7,6, 1 mmol/L EDTA) obogaćenom 1 mmol/L PMSF. Naredni korak je bila sonifikacija uzoraka za koju je iskorišćen UW 2070 sonikator (Bandelin electronic, Berlin, Nemačka). Sonifikacija je trajala 3 x 15 sekundi na 30 % maksimalne amplitude. Homogenati su obarani (5804R Eppendorf, 1000 x g, 20 minuta, 4°C) i supernatant je sakupljan za dalje analize.

3.24. Određivanje oksidativnog stresa u homogenatima

3.24.1. Određivanje koncentracije proteina po Lowry-ju

Lowry metoda (Lowry et al., 1951) je iskorišćena za određivanje koncentracije proteina. Kod navedene kolorimetrijske metode, intenzitet boje rastvora uzorka je proporcionalno srazmeran koncentraciji ukupnih proteina. U 10 μL , standarda ili uzorka, je dodavano 300 μL reagensa C, čije su komponente bile 2 % kalijum-natrijum-tartarat (Alkaloid, Skoplje, Severna Makedonija), 2 % natrijum-karbonat (Carlo Erba, Milano, Italija), 0,1 mmol/L NaOH, 1 % bakar-sulfat pentahidrat (Zorka pharma, Šabac, Srbija). Smeša je inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je dodavano 60 μL reagensa Folin-Ciocalteu (Merck). Smeša je inkubirana u mraku dodatnih 30 minuta. Po isteku vremena, 100 μL uzorka je u triplikatu nalivano u mikrotitarsku ploču sa 96 mesta. Apsorbanca je očitavana na 670 nm uz pomoć automatskog ELISA čitača (GRD, Rim, Italija). Standardna prava je konstruisana upotrebom apsorbaneci poznatih koncentracija (0,1 do 1 mg/mL) albumina iz goveđeg seruma (AppliChem, Darmštat, Nemačka).

3.24.2. Procena nivoa lipidne peroksidacije

Količina lipidne peroksidacije je određivana praćenjem nivoa malondialdehida (MDA) koji predstavlja finalni produkt lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina u ćelijskim membranama, usled delovanja slobodnih radikala (Ayala et al., 2014). Prema već opisanom protokolu (Villacara et al., 1989), u homogenatima duodenuma merena je količina MDA. Metoda se zasniva na formiranju kompleksnih jedinjenja žute boje, koja nastaju kao posledica reakcije MDA i tiobarbituratne kiseline (TBA). Količina formiranih jedinjenja je direktno proporcionalna količini MDA u uzorku. U 50 μ l uzorka dodavano je 970 μ L TRIS-HCl (pH 7,4) i 2 mL TBA reagensa (0,375 % TBA, 15 % TCA, 0,25 mol/L HCl). Smeša je zatim inkubirana 1 sat u vodenom kupatilu, na temperaturi od 95°C. Uzorci su potom obarani (1620 x g, 10 minuta) i po 200 μ L svakog uzorka je u duplikatu stavljano u mikrotitar ploču sa 96 mesta. Apsorbanca je merena na 535 nm korišćenjem ELISA čitača (GRD). Standardna prava je konstruisana na osnovu poznatih koncentracija MDA i iskorišćena je za izračunavanje koncentracije MDA u uzorcima. Koncentracije su izražene u nmol/mg proteina.

3.24.3. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost enzima katalaze je procenjivana preko stope razlaganja H₂O₂ (Weissman, 1976). Katalaza prevodi H₂O₂ do kiseonika i molekula vode i na taj način obezbeđuje zaštitu ćelije od oksidativnog stresa (Kirkman i Gaetani, 2007). U kvarcne kivete je dodavano 10 μ L homogenata, 1 mL H₂O₂ i 50 μ L Tris-EDTA pufera (pH 8,0). Na spektrofotometru (UV-1800 Shimadzu, Kjoto, Japan) merena je promena apsorbance (240 nm) u vremenskim intervalima od 30 sekundi (u periodu od 180 sekundi). Aktivnost enzima prikazana je u jedinicama po miligramu proteina (U/mg).

3.24.4. Određivanje aktivnosti enzima glutation-S-reduktaze

Enzim glutation-S-reduktaza (GST) katalizuje vezivanje elektrofilnih supstrata, nastalih posredstvom ROS, za redukovani glutation (GSH) čime onemogućuje njihovu reaktivnost i sprečava dalje oštećenje tkiva (Habig et al., 1974). Merenje aktivnosti enzima se zasnivalo na merenju reakcije vezivanja dinitrochlorbenzena (DNCB) (Sigma Aldrich) za GSH molekul (Sigma-Aldrich), preko njegovih sulfihidrilnih grupa. Reakciona smeša se sastojala od 20 μ L homogenata uzorka, 100 μ L DNCB, rastvorenog u 95 % etanolu, 300 μ L GSH, 600 μ L fosfatnog pufera (pH 6,5) i 2 destilovane vode. Promena apsorbance je merena na spektrofotometru (UV-1800 Shimadzu) tokom perioda od 180 sekundi, na talasnoj dužini koja je iznosila 340 nm. Aktivnost GST je prikazana u jedinicama po miligramu proteina (U/mg).

3.24.5. Određivanje količine GSH

Nivo GSH je određivan prema prethodno opisanom protokolu (Rahman et al., 2005), uz pojedine modifikacije. Supernatanti uzoraka su inicijalno tretirani 10 % sulfosalicilnom kiselinom (Sigma-Aldrich), u cilju odstranjivanja velikih proteinskih kompleksa. U 100 μ L uzorka je dodavano 400 μ L Tris-HCl (pH 8,9), 10 μ L Elmanovog reagensa (5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoična kiselina)) (Sigma-Aldrich). Elmanov reagens oksiduje GSH, kao proizvodi reakcije nastaju glutation-disulfid (GSSG) i 5-tio-2 benzoična kiselina (TNB). Količina GSH je direktno proporcionalna TNB. Potom je smeša ostavljena 20 minuta, na sobnoj temperaturi. Svaki uzorak je nalivan u duplikatu u bunariće mikrotitarske ploče sa 96 mesta. Na automatskom ELISA čitaču (GRD) je očitavana apsorbanca na 412 nm, sa referentnom talasnom dužinom na 540 nm. Standardna kriva je pravljena na osnovu poznatih koncentracija GSH. Izmeren GSH uzoraka je prikazan kao μ mol/mg proteina.

3.25. Određivanje koncentracije citokina u duodenumu imunoenzimskim testom na čvrstoj fazi

U homogenizovanim uzorcima duodenuma, izmerena je koncentracija citokina upotrebom imunoenzimskih testova na čvrstoj fazi (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA). Korišćenjem komercijalno dostupnih parova antitela merene su koncentracije citokina IL-1 β , TNF- α , IL-10 (R&D Systems, Mineapolis, Minesota, Sjedinjene Američke Države) i IFN- γ i IL-17 (eBioscience Inc, Thermo Fisher Scientific), prema uputstvima proizvođača. Pomoću ELISA čitača (GRD) je merena apsorbancija na 450 nm, dok je vrednost referentne talasne dužine iznosila 540 nm. Za svaki citokin je pravljena njemu odgovarajuća standardna kriva pomoću apsorbanci poznatih koncentracija standarda. Koncentracije citokina uzoraka su izražavane u pg/mL.

3.26. Analiza mikrobiote duodenuma

3.26.1. Izolacija metagenomske DNK iz duodenuma

Upotrebom komercijalnog kita za izolaciju bakterijske DNK iz tkiva, ZR Tissue Mini-Preptm Kit (Zymo Research, Irvine, Kalifornije, Sjedinjene Američke države) izolovana je ukupna bakterijska DNK iz duodenuma, po preporuci proizvođača. Koncentracije DNK u uzorcima su proveravane na BioSpec-nano spektrofotometru (Shimadzu). Uzorci, čija je koncentracija bila veća od 12 ng/ μ L, su čuvani na -20°C do slanja u kompaniju Novogene (Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo), gde su vršene dalje analize.

3.26.2. 16S rDNK amplikon sekvenciranje i prikaz dobijenih rezultata

Sekvenciranje 16S rDNK amplikona je bazirano na umnožavanju hipervarijabilnih regiona V3-V4 gena koji kodira 16S ribozomsku RNK (16S rRNK), na osnovu kojih može da se izvrši identifikacija mikroorganizama prisutnih u uzorku. Za sekvenciranje uparenih krajeva (engl. *paired-end sequencing*) je korišćena Illumina NovaSeq platforma (strategija sekvenciranja PE250). Kontrola kvaliteta je proveravana nakon svakog izvršenog koraka. Softverom FLASH (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) su spajani upareni krajevi, po principu preklapanja generisanih sekvenci sa dva kraja istog DNK fragmenta, pri čemu su dobijane neobrađene sekvence (engl. *raw tags*). Da bi se dobile očišćene sekvence, visokog kvaliteta, korišćena je bioinformatička Qiime platforma (engl. *Quantitative insights into microbial ecology*) (Verzija 1.7.0 http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html). Po uklanjanju himernih sekvenci, dobijene su efektivne sekvence, koje su imale $\geq 97\%$ sličnosti, i grupisane su u operativne taksonomske jedinice (engl. *Operative taxonomic units*, OTU). Anotacija vrsta za svaku reprezentativnu sekvencu, na svakom pojedinačnom taksonomskom nivou, je urađena na istoj Qiime platformi (Verzija 1.7.0 http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html) metodom Mothur. Referentna taksonomska baza podataka, koja je iskorišćena za upoređivanje, je SILVA 138 (<http://www.arb-silva.de/>). Relativna zastupljenost vrsta i rodova u OTU je prikazana za vrste i rodove čija je zastupljenost prelazila praznu vrednost od 0,001. Normalizacija broja sekvenci za različite uzorke je rađena u odnosu na najmanji broj očitanih sekvenci u uzorku, u cilju dobijanja visoke preciznosti narednih analiza. Na osnovu normalizovanih podataka, urađen je Venov dijagram, kao i analize Alfa i Beta diverziteta.

Alfa diverzitet, parametar biodiverziteta unutar određene grupe, je izračunat pomoću Qiime platforme. Alfa diverzitet je predstavljen kroz vrednosti navedenih indeksa:

- 1) Šenonovog indeksa diverziteta (engl. *The Shannon diversity index*),
- 2) Simpsonovog indeksa diverziteta (engl. *Simpsons diversity index*),
- 3) Indeksa posmatranih vrsta (engl. *The observed species index*),
- 4) Čao 1 indeksa (engl. *Chao1 index*).

Beta diverzitet je upotrebljavan za procenu razlika u sastavu mikrobiote između grupa. Bioinformatička analiza je vršena pomoću Qiime platforma i Galaxy platforme (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>). Beta diverzitet je izražen kroz:

- 1) Analizu glavnih koordinata (engl. *Princial coordinates analysis*, PCoA),
- 2) Analizu sličnosti (engl. *Analysis of similarity*, Anosim),
- 3) Adonis ili metodu neparametrijskog multivarijantnog testa varijansi, bazirane na matricama udaljenosti (engl. *Nonparametric multivariate analysis of variance*, MANOVA),
- 4) Linearnu diskriminativnu analizu algoritma veličine efekta (engl. *Linear dicriminant analysis effect size*, LefSe).

16S rDNK sekvence korišćene u ovoj studiji su deponovane u Evropskom nukleotidnom arhivu (engl. *European nucleotide archive*, ENA), pod oznakom „PRJEB56180“ i pristupnim brojem ERP141097.

3.27. Statistička analiza rezultata

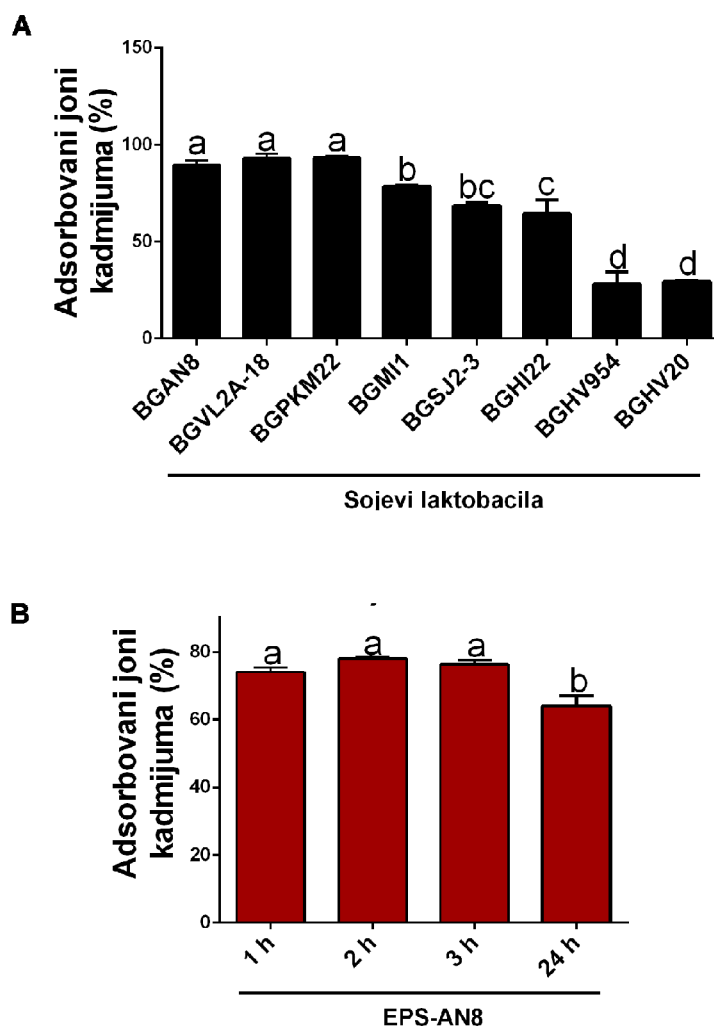
Za statističku analizu i grafički prikaz dobijenih podataka korišćeni su softveri GraphPad Prism (San Diego, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države) i R (verzija 1.4.1717). Svi rezultati, osim rezultata relativne zastupljenosti bakterijskih rodova i vrsta, su prikazani kao srednja vrednost (SV) \pm standardna devijacija (SD). Kada je reč o prikazu rezultata relativne zastupljenosti bakterijskih rodova i vrsta, korišćena je medijana (MD) \pm SD. Jednofaktorskom analizom varijansi (engl. *One-way analysis of variance*, ANOVA), sa Tuckey post hoc testom, je poređeno više grupa. Studentov t-test je korišćen za poređenje kontrolne i eksperimentalne grupe. P vrednosti $< 0,05$ su smatrane statistički značajnim. Eksperimentalne grupe koje su obeležene različitim slovom abecede su se međusobno statistički značajno razlikovale, osim u slučaju relativne zastupljenosti bakterijskih rodova i vrsta gde je statička značajnost obeležena: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4. REZULTATI

4.1. Utvrđivanje *in vitro* zaštitnog efekta EPS-AN8 na štetno delovanje kadmijuma(II)

4.1.1. Analiza izmerene sposobnosti EPS⁺ laktobacila i izolovanog EPS-AN8 da adsorbuju jone kadmijuma

U ovom radu je izmerena sposobnost 8 sojeva laktobacila iz kolekcije BGLMM, koji proizvode EPS na svojoj površini, da vežu jone kadmijuma u vodenom rastvoru (Slika 10A). Nivo adsorpcije kadmijumovih jona je izražen u procentima i statistički se značajno razlikovao između EPS⁺ sojeva ($p < 0,05$). Najveći procenat kadmijumovih jona su vezali sojevi *Lactiplantibacillus plantarum* BGAN8 (90 %), *L. plantarum* BGVL2A-18 (93 %) i *L. plantarum* BGPKM22 (93 %), koji se međusobno nisu statistički značajno razlikovali, dok su najmanje kadmijumovih jona adsorbovali bakterijski sojevi *Lacticaseibacillus rhamnosus* BGHV954 (28 %) i *L. rhamnosus* BGHV20 (29 %). S obzirom da se soj *L. plantarum* BGAN8 istakao svojim rastegljivim fenotipom koji je prethodno vizuelizovan, upotrebom transmisivne i krio-skenirajuće elektronske mikroskopije, kao i sposobnošću oslobađanja mikrovezikula na svojoj površini (Bajic et al., 2020), izabran je za dalja istraživanja.



Slika 10. Izmerena sposobnost vezivanja jona kadmijuma u vodenom rastvoru za: (A) selektovane EPS⁺ sojeve laktobacila; (B) izolovan EPS-AN8. Rezultati su izraženi u procentima (%) i predstavljeni u vidu SV ($n=3$) \pm SD. Jednofaktorska ANOVA i Tuckey posthoc test su korišćeni za međusobno poređenje. Vrednosti obeležene različitim slovima abecede su se statistički značajno razlikovale ($p < 0,05$).

Nivo adsorpcije kadmijumovih jona je određen i za izolovane egzopolisaharide soja *L. plantarum* BGAN8 (EPS-AN8) (Slika 10B). Procenat vezanih kadmijumovih jona u vodenom

rastvoru je izmeren nakon isteka svakog sata u periodu od prva 3 sata reakcije i po isteku 24. sata. Primećuje se da se procenat vezanih jona metala ne razlikuje statistički značajno u toku prva 3 sata i da se dobijene vrednosti nalaze u opsegu između 72 i 78 % adsorbovanih jona kadmijuma. Nakon 24 sata uočava se smanjenje nivoa vezanih jona na 64 %.

4.1.2. *In silico* analiza genetičkih determinanti odgovornih za biosintezu EPS-AN8

Da bismo preciznije identifikovali i okarakterisali organizaciju genetičkih determinanti koje kodiraju proteine uključene u proces biosinteze EPS-AN8, uslužno je sekvenciran celokupan genom soja *L. plantarum* BGAN8 na platformi Illumina HiSeq 2500. Sekvenciranjem je ustanovljeno da veličina genoma soja *L. plantarum* BGAN8 iznosi 3427414 bp, da je ukupan broj kontigova 243 i da u genomu ima 3237 kodirajućih sekvenci. Upotrebom BLASTX algoritma, na 3 regiona u genomu su pronađene genetičke determinante od interesa (nod 8, 17 i 20), grupisane u klastere. U Tabeli 5 je prikazana lista pronađenih gena koji kodiraju proteinske-učesnike u biosintezi EPS-AN8.

Tabela 5. Prikaz rezultata poređenja aminokiselinske sekvence gena uključenih u biosintezu EPS-AN8.

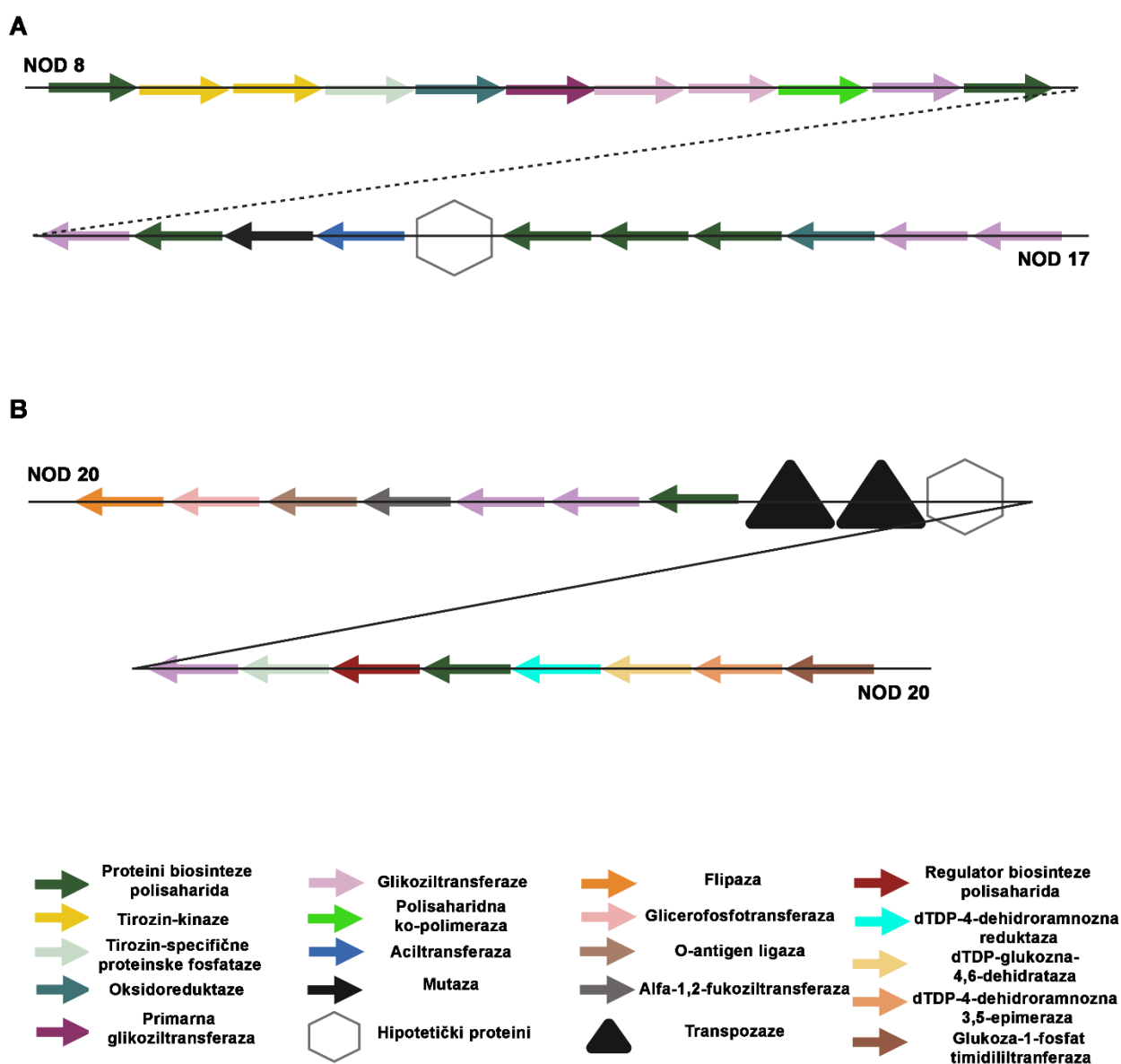
Broj regiona na kom je gen lokalizovan	Pozicija gena u odgovarajućem regionu	Naziv proteina sa najvećom homologijom	Identičnost (%)
NOD 8	113874-114632	Protein biosinteze kapsularnog polisaharida	100
	114632-114855	CpsD/CpsB familija tirozin-kinaza	98,39
	114855-115358	CpsD/CpsB familija tirozin-kinaza	99,40
	115339-116118	Tirozin-specifične proteinske fosfataze Ywqe	100
	116134-117075	SDR familija NAD(P)-za visnih oksidoreduktaza	100
	117062-117727	Primarna glikoziltransferaza	100
	117727-118818	Familija 4 glikoziltransferaza	100
	118834-119862	Glikoziltransferaza	100
	119859-121133	Polisaharidna ko-polimeraza	100
	121118-122086	Glikoziltransferaza	100
	122166-123617	Protein sinteze polisaharida	100
NOD 17	33151-33678	Glikoziltransferaza	99,43
	34116-35534	Protein sinteze egzopolisaharida	100
	35724-36500	Protein koji sadrži DUF4422 domen	100
	36636-37715	Aciltransferaza	100
	37699-38808	Protein sinteze polisaharida	100
	38805-40025	Protein sinteze polisaharida	100
	40012-40635	Protein sinteze polisaharida	99,72
	40641-41768	UDP-galaktopiranozna mutaza	100
	41790-42971	Familija 2 glikoziltransferaza	100
43436-44368	Familija 2 glikoziltransferaza	100	
NOD 20	232-1611	Flipaza	78,44
	1683-2876	CDP-glicerol glicerofosfotranferaza	68,51
	2873-4087	Familija O-antigen ligaza	71,83
	4099-5010	Alfa-1,2-fukoziltransferaza	73,60
	5036-5986	Potencijalna glikoziltransferaza	66,88
	5983-6471	Glikoziltransferaza	69,75
	6493-6975	Protein sinteze polisaharida	72,48
	8671-9339	Transferaza ugljenih hidrata	99,53
	9394-10167	Tirozin-protein fosfataza Ywqe	99,22
	10154-10882	Regulator biosinteze polisaharida	99,17
	10894-11664	Protein sinteze polisaharida	99,61
	11864-12700	dTDP-4-dehidroramnoza reduktaza	100
	12733-13761	dTDP-glukoza-4,6-dehidrataza	99,71
	13771-14352	dTDP-4-dehidroramnoza 3,5-epimeraza	100
	14356-15225	Glukoza-1-fosfat timidiltransferaza	99,65

Primenom softvera „Mlplasmids“ (Arredondo-Alonso et al., 2018) urađena je predikcija lokacije regiona od interesa (Nod 8, nod 17, nod 20) u genomu. Vrednosti verovatnoće su se kretale između 0 i 1, viša vrednost je ukazivala na veću tačnost predikcije. Dobijene vrednosti za regione od interesa su prikazane u Tabeli 6. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da su Nod 8 i Nod 17 lokalizovani u okviru hromozomske DNK, dok se Nod 20 nalazi na plazmidnoj DNK.

Tabela 6. Rezultati dobijeni nakon urađene predikcije.

Region	Lokacija na hromozomu	Lokacija na plazmidu
Nod 8	0,64	0,36
Nod 17	0,60	0,40
Nod 20	0,061	0,939

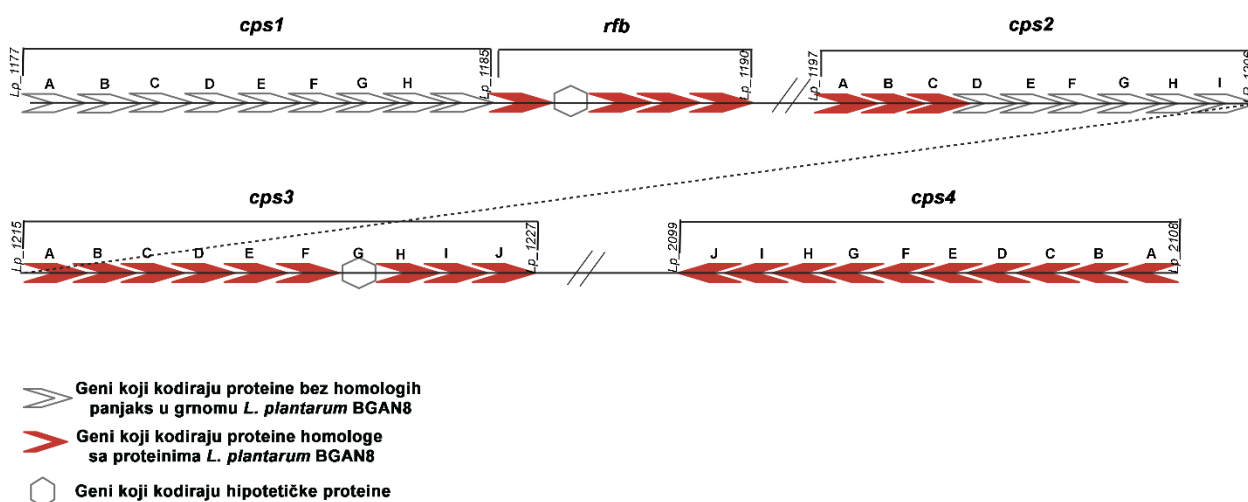
Na osnovu dobijenih *in silico* rezultata, napravljen je šematski prikaz organizacije genetičkih determinanti uključenih u biosintezu EPS-AN8 (Slika 11).



Slika 11. Šematski prikaz genetičkih determinanti, sa poznatim funkcijama, uključenih u biosintezu EPS-AN8, lokalizovanih na (A) hromozomskoj i (B) plazmidnoj DNK u genomu soja *L. plantarum* BGAN8. Upotrebom BLASTX algoritma utvrđene su genetičke determinante od interesa u okviru 3 regiona u genomu: NOD 8 i NOD 17, za

koje *in silico* analiza pretpostavlja hromozomsku lokaciju u genomu soja iNOD 20, sa mogućom plazmidnom lokacijom. Orijentacija gena je bazirana na rezultatima softvera „GeneMark“. Slika je kreirana u BioRender.com

Kao, što je napomenuto, za genom soja *L. plantarum* WCFS1 je po prvi put urađena detaljna organizacija genetičkih determinanti odgovornih za biosintezu EPS laktobacila (Kleerebezem et al., 2003; Remus et al., 2012). Detaljnom analizom je utvrđeno da su kod navedenog soja geni od interesa organizovani u 4 klastera (*cps1A-I*, *cps2A-J*, *cps3A-J*, *cps4A-J*), što je ujedno bio i najveći broj prijavljenih klastera u literaturi. Iz tih razloga, u ovom radu je genom soja *L. plantarum* WCFS1 upotrebljen kao referentni genom za upoređivanje organizacije genetičkih determinanti sa organizacijom genetičkih determinanti uključenih u biosintezu EPS-AN8 preko upoređivanja aminokiselinskih sekvenci kodiranih proteina. Na Slici 12 je šematski prikazana organizacija gena uključenih u biosintezu EPS i obeleženi su geni koji kodiraju proteine sa visokim procentom identičnosti sa proteinima soja *L. plantarum* BGAN8.



Slika 12. Šematski prikaz organizacije klastera, uključenih u EPS biosintezu soja *L. plantarum* WCFS1, i homologija proteinskih produkata sa proteinima uključenim u biosintezu EPS-AN8. Slika je kreirana u BioRender.com.

Rezultati poređenja aminokiselinskih sekvenci ukazali su da genetičke determinante sadržane u genomu soja BGAN8 pokazuju visok procenat identičnosti sa *rfbACBD* operonom, delom klastera *cps2* (*cps2A-C*), klasterom *cps3* i klasterom *cps4* (Tabela 7).

Operon *rfbACBD* je odgovoran za sintezu dTDP-L-ramnoze i obuhvata gene koji kodiraju enzime, poput glukoza-1-fosfat timidililtransferaze, dTDP-4-dehidroramnoza 3,5-epimeraze, dTDP-glukoza-4,6-dehidrataze i dTDP-4-dehidroramnoza reduktaze, koji se smatraju katalizatorima reakcije nastanka dTDP-L-ramnoze iz glukoza-1-fosfata i dezoksitimidin-trifosfata (dTTP). Predikcione analiza ukazuju da je navedeni operon kompletno prisutan u genomu soja BGAN8, u okviru Nod 20, na plazmidu.

Geni koji kodiraju proteine sinteze polisaharida, regulatora biosinteze polisaharida i tirozin protein fosfatazu i nalaze se na Nod 20 su pokazali homologiju na nivou proteina sa proteinima gena klastera *cps2* (*cps2ABC*). Pomenuti proteini su odgovorni za sintezu, determinisanje dužine i transport EPS-a na površinu ćelije.

Klaster *cps3* (*cpsA-J*) je potpuno prisutan u genomu BGAN8. Geni navedenog klastera kodiraju enzime uključene u acetilaciju kvatrosahardnih ponavljajućih jedinica, poput aciltransferaze i UDP-galaktopiranozna mutaze.

Klaster *cps4* (*cpsA-J*) je, takođe, pristutan u genomu BGAN8, na hromozomskoj DNK. Klaster *cps4* je sadržao gene za kompletnu enzimsku mašineriju neophodnu za EPS biosintezu.

Tabela 7. Rezultati upoređivanja aminokiselinskih sekvenci proteina uključenih u biosintezu EPS-WCFS1 i EPS-AN8.

<i>L. plantarum</i> WCFS1		<i>L. plantarum</i> BGAN8		Identičnost (%)
Naziv klastera	Naziv gena	Homologi protein	Pozicija	
<i>rfbACBD</i>	<i>rfbA</i>	Glukoza-1-fosfat timidililtransferaza	NOD 20	67,26
	<i>rfbC</i>	dTDP-4-dehidroramnozna 3,5-epimeraza		98,94
	<i>rfbB</i>	dTDP-glukoza-4,6-dehidrataza		99,42
	<i>rfbD</i>	dTDP-4-dehidroramnozna reduktaza		90,94
<i>cps2</i>	<i>cps2A</i>	Protein sinteze polisaharida	NOD 17	96,08
	<i>cps2B</i>	Regulator biosinteze polisaharida		95,04
	<i>cps2C</i>	Tirozin-protein fosfataza Ywqe		91,44
<i>cps3</i>	<i>cps3A</i>	Familija 2 glikoziltransferaza	NOD 8	70,20
	<i>cps3B</i>	Familija 2 glikoziltransferaza		99,03
	<i>cps3C</i>	UDP-galaktopiranozna mutaza		98,94
	<i>cps3D</i>	Protein sinteze polisaharida		97,79
	<i>cps3E</i>	Protein sinteze polisaharida		100
	<i>cps3F</i>	Aciltransferaza		99,01
	<i>cps3H</i>	Protein koji sadrži DUF4422 domen		97,65
	<i>cps3I</i>	Protein sinteze egzopolisaharida		98,89
	<i>cps3J</i>	Glikoziltransferaza		98,45
<i>cps4</i>	<i>cps4A</i>	Protein biosinteze kapsularnog polisaharida	NOD 8	98,41
	<i>cps4B</i>	CpsD/CpsB familija tirozin-kinaza		98,80
	<i>cps4C</i>	Tirozin-specifične proteinske fosfataze Ywqe		99,61
	<i>cps4D</i>	SDR familija NAD(P)-zavisnih oksidoreduktaza		100
	<i>cps4E</i>	Primarna glikoziltransferaza		99,55
	<i>cps4F</i>	Familija 4 glikoziltransferaza		99,72
	<i>cps4G</i>	Glikoziltransferaza		99,71
	<i>cps4H</i>	Polisaharidna ko-polimeraza		99,76
	<i>cps4I</i>	Glikoziltransferaza		98,76
	<i>cps4J</i>	Protein sinteze polisaharida		99,17

4.1.3. Analize fizičko-hemijskih karakteristika EPS-AN8

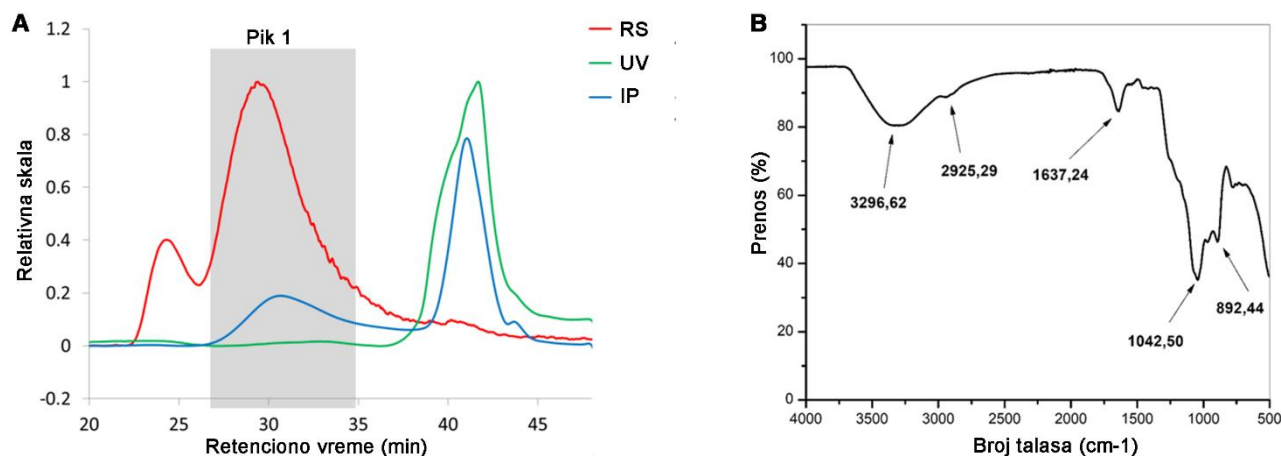
Sa ciljem definisanja strukture EPS-AN8, urađena je detaljna analiza njegovih fizičko-hemijskih osobina.

Metodom molekuskog sejanja je ustanovljeno da molekularna masa EPS-AN8 iznosi 2×10^5 Da, dok je vrednost poluprečnika rotacije 86,65 nm (Tabela 8). Analiza dobijenog profila EPS-AN8 nakon postupka molekuskog sejanja je ukazala na prisustvo jednog velikog pika, čije je prosečno vreme zadržavanja bilo približno 32 minuta (Slika 13A).

Analizom sadržaja neutralnih šećera prisutnih u EPS-AN8, primenom gasno-tečne hromatografije, identifikovani su glukoza, galaktoza, ramnoza i manoza kao gradivni elementi (Tabela 8). Odnos navedenih monosaharida je redom bio: 21,5 : 7,1 : 4,1 : 1.

Tabela 8 Prikaz fizičko-hemijskih karakteristika EPS-AN8.

Parametri fizičko-hemijskih osobina		
Molekularna masa (g/mol=Da)	$2,27 \pm 0,07 \times 10^5$	
Poluprečnik rotacije (nm)	$86,65 \pm 3,46$	
Naziv monosaharida	Zastupljenost (%)	Odnos monosaharida
Glukoza (Glu)	12,91	21,5
Galaktoza (Gal)	4,23	7,1
Ramnoza (Ram)	2,45	4,1
Manoza (Man)	0,60	1,0

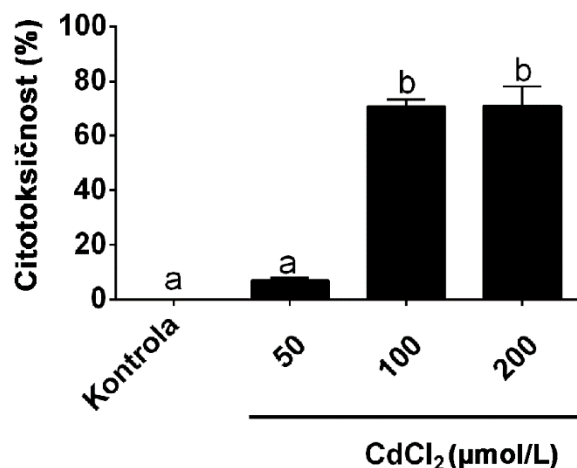


Slika 13. Prikaz rezultata metode molekularnog sejanja i rezultata analize FTIR spektra. (A) Hromatogram dobijen metodom molekularnog sejanja (A), detektori: ultravioletni (UV, 280 nm), višeugaono rasipanje (RS, 90°) i indeks prelamanja (IP). (B) FTIR spektar EPS-AN8.

Dodatna potvrda polisaharidne prirode izolovanog EPS-AN8 su predstavljali rezultati njemu svojstvenog FTIR spektra (Slika 13B). Analiza FTIR spektra je ukazala na postojanje 5 apsorpcionih traka. Široka apsorpciona traka na $3296,62 \text{ cm}^{-1}$ je odgovarala vibracijama hidroksilne (-OH) ili amidne grupe (-NH) (Coates, 2006). Mala apsorpciona traka na $2925,29 \text{ cm}^{-1}$ je svojstvena za istežuće vibracije C-H metilskih (-CH₃) ili metilenskih (-CH₂) grupa, koje su standardno prisutne u heksozama ili dezoksiheksozama (Ismail i Nampoothiri, 2010). Prisutna traka na $1637,24 \text{ cm}^{-1}$ je pripadala istežućim vibracijama C=O amidne ili karbosilne grupe (Shen et al., 2013). Najistaknutija traka na $1042,50 \text{ cm}^{-1}$ je posledica prisustva P-O-C ili C-O grupe i ukazala je da je zaista reč o egzopolisaharidu (Corbrjidge, 2007). Apsorpciona traka na $892,44 \text{ cm}^{-1}$ je karakteristična za glikozidne veze C-O-C (Nikonenko et al., 2000). Osim navedenih traka, nije primećeno više apsorpcionih promena u spektru uzorka.

4.1.4. Određivanje subtoksične koncentracije kadmijum-hlorida na diferenciranim Caco-2 ćelijama

Da bismo ispratili štetne promene do kojih dovodi rastvor kadmijuma u intestinalnim-epitelnim ćelijama, Caco-2, neophodan korak je bio pronalazak koncentracije CdCl₂ koja nije ostvarivala citotoksičan efekat. U tu svrhu, diferencirane Caco-2 ćelije su tretirane sa tri različite koncentracije CdCl₂ (50 μmol/L, 100 μmol/L, 200 μmol/L) (Slika 14). Nakon 24 sata tretmana, jedina koncentracija CdCl₂ koja nije ostvarila značajnu ($p < 0,05$) citotoksičnost, u poređenju sa kontrolom, je 50 μmol/L CdCl₂. Stoga je navedena koncentracija korišćena u svim narednim eksperimentima koji su podrazumevali *in vitro* praćenje promena izazvanih kadmijumom(II) u diferenciranim Caco-2 ćelijama i EPS-AN8.

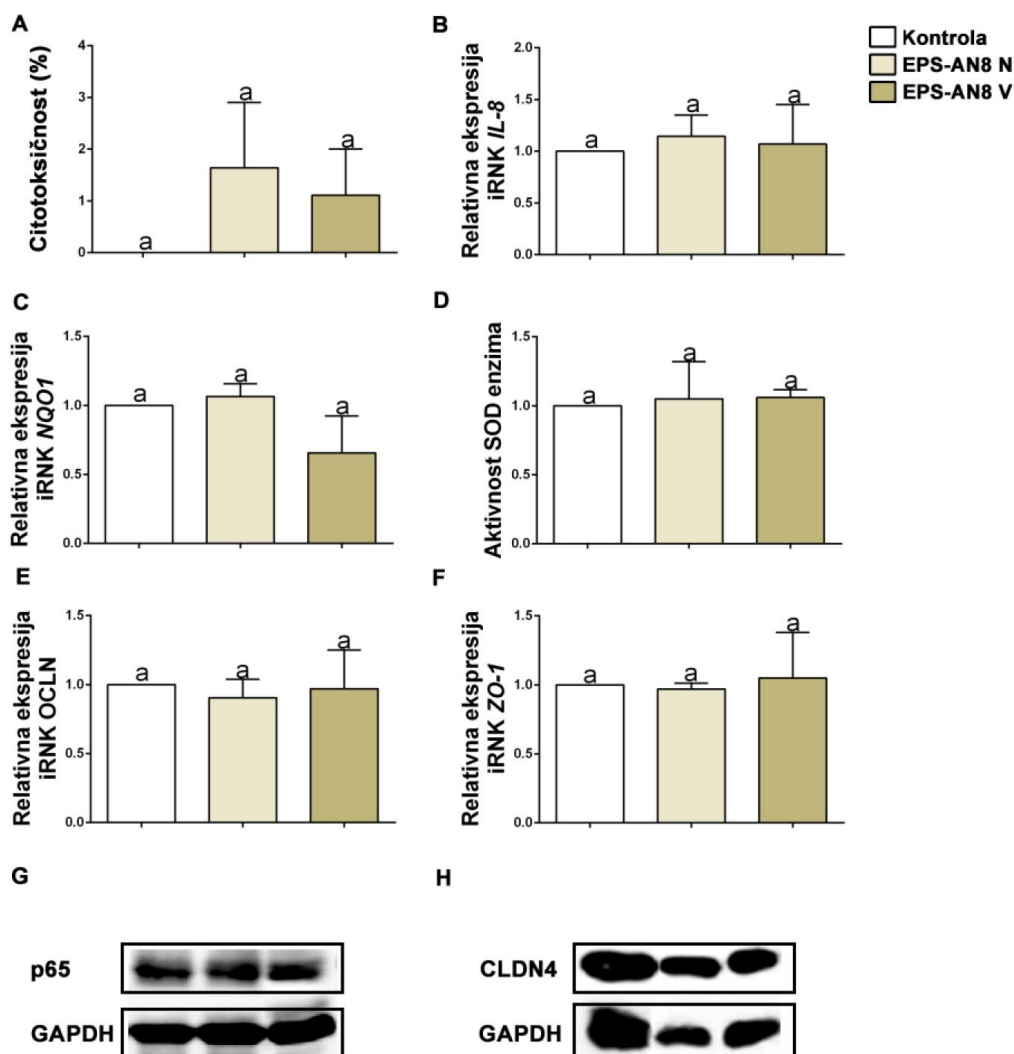


Slika 14. Citotoksičnost različitih koncentracija kadmijum-hlorida. Kontrolu su činile netretirane diferencirane Caco-2 ćelije. Rezultati su prikazani kao SV (n=3) ± SD. Jednofaktorska ANOVA i Tuckey post hoc test su korišćeni za poređenje. Vrednosti obeležene različitim slovima abecede su se statistički značajno (p < 0,05) razlikovale.

4.1.5. Utvrđivanje efekata EPS-AN8 na Caco-2 ćelije

Pre eksperimentalnog pristupa ispitivanju zaštitnog efekta EPS-AN8 na štetne promene izazvane kadmijumom(II), izabrane su dve koncentracije EPS-AN8 koje će se koristiti u narednim eksperimentima. Imajući u vidu podatak da se najčešće probiotički sojevi, kao sastavni delovi probiotičkih formula ili pojedinačno kao terapija za različita patofiziološka stanja, nalaze u broju koji odgovara 10^9 CFU/mL (Choi et al., 2022; Nguyen et al., 2019), niža koncentracija EPS-AN8 je iznosila 50 µg/mL i odgovarala je masi EPS-AN8 koja potiče sa 1×10^9 CFU/mL soja BGAN8, dok je viša koncentracija iznosila 100 µg/mL i odgovarala poreklu EPS-AN8 sa 2×10^9 CFU/mL.

Nakon što je potvrđeno da niža i viša koncentracija EPS-AN8 nisu citotoksične niti dovode do značajnih promena na parametre oksidativnog stresa i inflamacije, kao ni na najvažnije proteine čvrstih međucelijskih veza (Slika 15), urađeni su paralelni tretmani sa rastvorom kadmijuma.



Slika 15. Efekat niže (50 µg/mL) i više (100 µg/mL) koncentracije EPS-AN8 na diferencirane Caco-2 ćelije. Praćen je uticaj na: (A) Citotoksičnost; (B) Relativnu ekspresiju iRNK citokina *IL-8*; (C) Relativnu ekspresiju iRNK učesnika antioksidativne zaštite *NQO1*; (D) Aktivnost SOD enzima; (E) Relativnu ekspresiju iRNK okcludina; (F) Relativnu ekspresiju iRNK zonulina; (G) Ekspresiju proteina p65 (reprezentativan Western blot) i (H) Ekspresiju proteina kladina (reprezentativan Western blot). Rezultati su prikazani kao SV (n=3) ± SD. Jednofaktorska ANOVA i Tuckey post hoc test su korišćeni za međusobnopoređenje. Vrednosti obeležene različitim slovima abecede su se statistički značajno (p < 0,05) razlikovale.

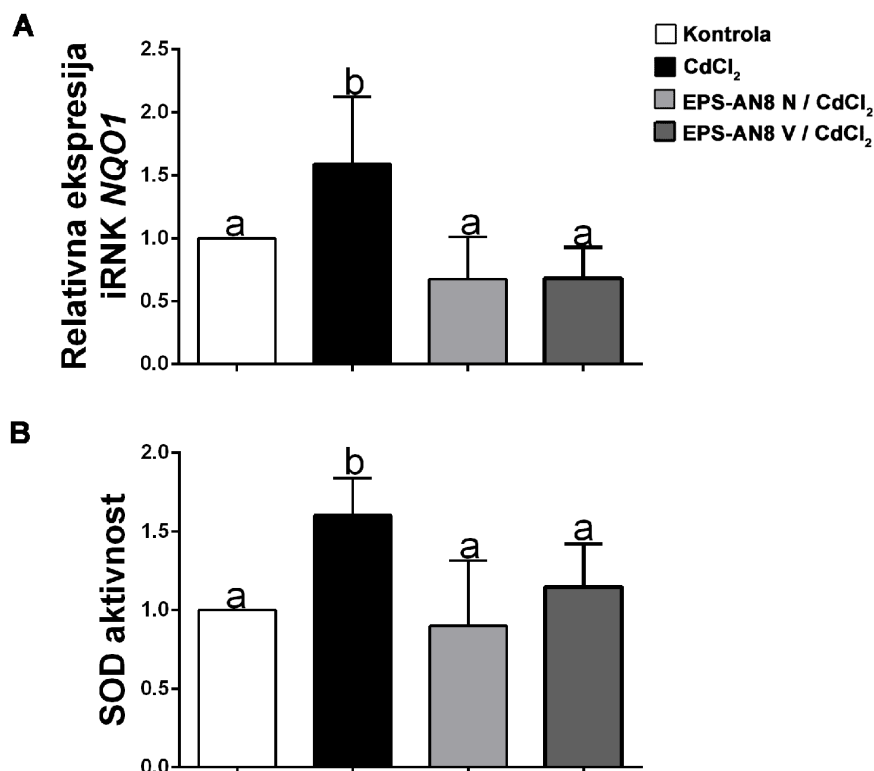
4.1.6. Uticaj EPS-AN8 na smanjeno izazivanje oksidativnog stresa u diferenciranim Caco-2 ćelijama izloženih kadmijumu(II)

Produžen oksidativni stres izazvan kadmijumom dovodi do ozbiljnih oštećenja u ćelijama i tkivu. S tim u vezi neophodno je bilo ispitati potencijalni zaštitni efekat EPS-AN8 pri izloženosti ćelija kadmijumu(II) na ključne enzime oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (Slika 16).

Kako bi se ustanovio uticaj EPS-AN8 na oksidativni stres uzrokovan kadmijumom(II), izmerili smo relativnu ekspresiju iRNK *NQO1* gena koji kodira enzim NAD(P)H kinon reduktazu. Nakon 3 sata izloženosti, kadmijum(II) je značajno stimulisao (p < 0,05) ekspresiju gena za ovaj enzim (Slika 16A). Međutim, detektovane promene nisu zabeležene pri istovremenim tretmanima kadmijumom(II) i odgovarajućim koncentracijama EPS-AN8, gde se izmerena ekspresija nije statistički značajno razlikovala od izmerene ekspresije kontrole.

Istovetna pojava se primećuje i praćenjem aktivnosti SOD enzima (Slika 16B). Nakon 24 sata izloženosti kadmijumu(II), SOD enzim je značajno (p < 0,05) aktivniji bio, u odnosu na kontrolu.

Međutim, pri ispitivanju efekata paralelnih tretmana kadmijuma(II) sa EPS-AN8 na aktivnost SOD enzima ne zapaža se povećanje aktivnosti u poređenju sa aktivnošću enzima SOD netretiranih ćelija.



Slika 16. Efekat EPS-AN8 na kadmijumom indukovani oksidativni stres u diferenciranim Caco-2 ćelijama. EPS-AN8 je dodat u vidu niže (50 µg/mL, N) i više (100 µg/mL, V) koncentracije. Nivo oksidativnog stresa izražen kroz: (A) Nivo ekspresije iRNK *NQO1*, rezultati su normalizovani u odnosu na kontrolu i prikazani kao relativna promena ekspresije datog gena, u vidu SV (n=3) ± SD. (B) Aktivnost SOD enzima. Rezultati su prikazani u vidu SV (n=3) ± SD. Jednofaktorska ANOVA i Tuckey post hoc test su korišćeni za međusobno poređenje. Vrednosti obeležene različitim slovima abecede su se statistički značajno (p<0,005) razlikovale.

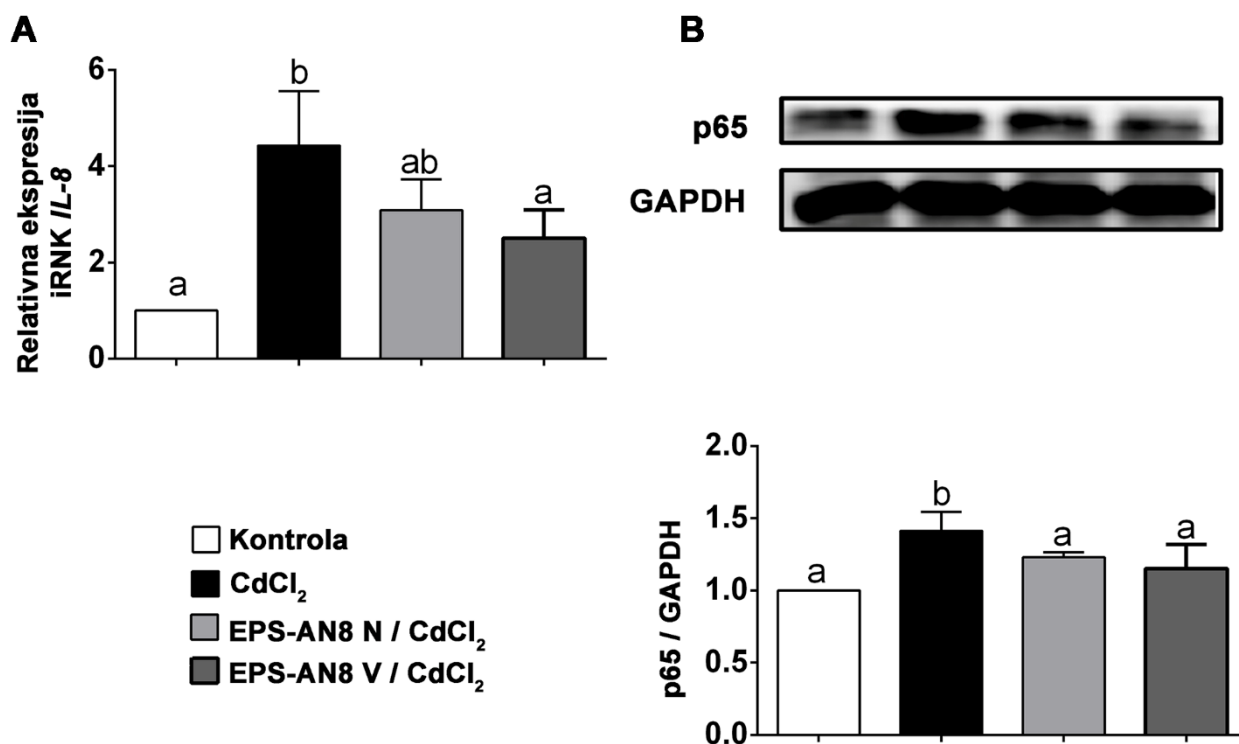
4.1.7. Uticaj EPS-AN8 na zaštitu diferenciranih Caco-2 od kadmijumom(II) izazvane inflamacije

Pored oksidativnog stresa, jedan od glavnih mehanizama kojim kadmijum ostvaruje svoj štetni efekat je povišen nivo inflamacije u ćelijama. S tim u vezi, ispitan je efekat istovremenih tretmana niže i više koncentracije EPS-AN8 i kadmijuma(II) na parametre inflamacije u diferenciranim Caco-2 ćelijama (Slika 17).

Nakon 3 sata tretmana praćena je relativna ekspresija *IL-8*, proinflamatornog citokina za koji je utvrđeno da je povišen nakon izlaganja toksičnim metalima (Slika 17A). Tretman kadmijumom(II) je doveo do statistički značajne stimulacije relativne ekspresije, u odnosu na ćelije koje su gajene samo u DMEM medijumu (p<0,05). Paralelni tretman nižom koncentracijom EPS-AN8 je izazvao sniženje ekspresije u odnosu na tretman samim kadmijumom(II), ali bez statističke značajnosti. Nasuprot tome, pri tretmanu višom koncentracijom EPS-AN8 i kadmijumom(II) nivo relativne ekspresije se vraća na nivo zapažen kod kontrole.

Regulatorni protein transkripcije NFκB se smatra jednim od najznačajnijih regulatora zapaljenja u različitim tipovima ćelija. On, između ostalog, poseduje svoje vezivno mesto na promotoru gena *IL-8*, za koje je neophodno da se veže da bi se navedeni gen ekspimirao. Pokazano je da u uslovima povišene izloženosti rastvoru kadmijumu dolazi do NFκB indukovane prekomerne

ekspresije *IL-8* (Hyun et al., 2007). Iz tih razloga, u ovom radu je praćena ekspresija aktivne, jedarne forme NF κ B koja se oznaćava kao p65. Nakon 24 ćasa, kadmijum(II) je izazvao povišenu ekspresiju proteina p65 ($p < 0,05$), ali kod tretmana koji su podrazumevali i istovremeni dodatak niže, odnosno, više koncentracije EPS-AN8, navedena promena u zastupljenosti proteina nije zabeleženana (Slika 17B).



Slika 17. Uticaj EPS-AN8 na inflamaciju izazvanu kadmijumom u diferenciranim Caco-2 ćelijama. EPS-AN8 je dodat u vidu niže (50 μ g/mL, N) i više (100 μ g/mL, V) koncentracije. (A) Efekat istovremenih tretmana EPS-AN8, i CdCl₂ je praćen na nivou ekspresije iRNK *IL-8*. Rezultati su normalizovani u odnosu na kontrolu i prikazani kao relativna promena ekspresije datog citokina, u vidu SV ($n=3$) \pm SD. Jednofaktorska ANOVA i Tuckey post hoc test su korišćeni za međusobno poređenje. (B) Prikazan je efekat istovremenog delovanja EPS-AN8 i CdCl₂ na ekspresiju proteina p65 (Western blot i denzitometrijska analiza). Rezultati ekspresije su izraženi u odnosu na konstitutivno ekspimiran protein GAPDH. Jednofaktorska ANOVA i Tuckey post hoc test su korišćeni za međusobno poređenje. Vrednosti obeležene različitim slovima abecede su se statistiĳki znaćajno ($p < 0,005$) razlikovale.

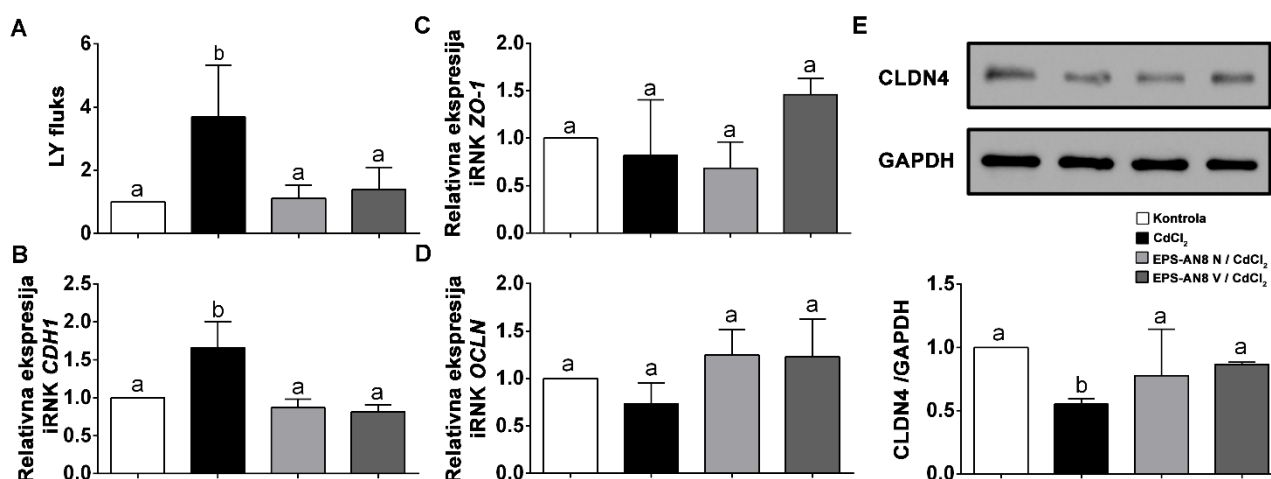
4.1.8. Efekat EPS-AN8 na sprećavanje kadmijumom(II) indukovanog narušavanja mećućelijskih veza

Oćuvanje integriteta intestinalne barijere je od neposredne vaćznosti kada je reć o daljem širenju oralno unetog kadmijuma u organizmu. U skladu sa tim, diferencirane Caco-2 ćelije su predstavljale *in vitro* model za praćenje narušavanja mećućelijskih veza, a posledićno i povećanja propustljivosti crevne barijere, izazvanih kadmijumom, kao i za utvrćivanje zašćite koju bi EPS-AN8 mogao potencijalno da ispolji.

Nivo propustljivosti formiranog sloja ćelija je izraćen kroz kolićinu LY boje koja je pasivno, paracelularno transportovana na mestima gde je kontinuitet u sloju narušen (Slika 18A). Tretman rastvorom kadmijuma je izazvao znaćajno ($p < 0,05$) povećanje propustljivosti barijere. Međutim, ta pojava se nije primećivala uz istovremeno prisustvo kadmijuma(II) i EPS-AN8. Obe koncentracije EPS-AN8 su bile podjednako uspešne u odrćavanju nivoa propustljivosti na nivou koji se nije statistiĳki znaćajno razlikovao od nivoa propustljivosti kontrole.

Osim nivoa propustljivosti, izmerena je i relativna ekspresija iRNK gena koji kodiraju proteine adherentnih i čvrstih veza (Slika 18B-D). Kadherini su grupa proteina koja se karakteriše ulogom u uspostavljanju adherentnih veza, među kojima se u pogledu osetljivosti na kadmijum ističe protein E-kadherin. Tretman isključivo kadmijumom(II) je doveo do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja relativne ekspresije iRNK za gen *CDH1*, koji kodira protein E-kadherin. Zanimljivo, obe koncentracije EPS-AN8 su, u zajedničkom tretmanu sa kadmijumom(II), efikasno sprečile zapaženo povećanje. Nakon tretmana kadmijumom(II) ne uočavaju se značajne razlike u relativnoj ekspresiji iRNK proteina čvrstih veza, zonulina i okcludina, u poređenju sa kontrolom., Istovremeni tretmani kadmijumom(II) i nižom, odnosno, višom koncentracijom EPS-AN8, su bili bez značajnih promena u odnosu na netretirane ćelije.

Nakon 24 sata izloženosti rastvoru kadmijuma i istovremenih tretmana kadmijuma(II) i EPS-AN8, praćena je ekspresija proteina kladina (Slika 18E). Tretman samim kadmijumom(II) je prouzrokovao značajno smanjenje ($p < 0,05$) ekspresije kladina. Nasuprot tome, u simultanim tretmanima kadmijuma(II) i niže, odnosno, više koncentracije EPS-AN8, ne zapažaju se takve promene. U takvim tretmanima nivo ekspresije kladina je bio statistički nepromenjen u odnosu na kontrolu.



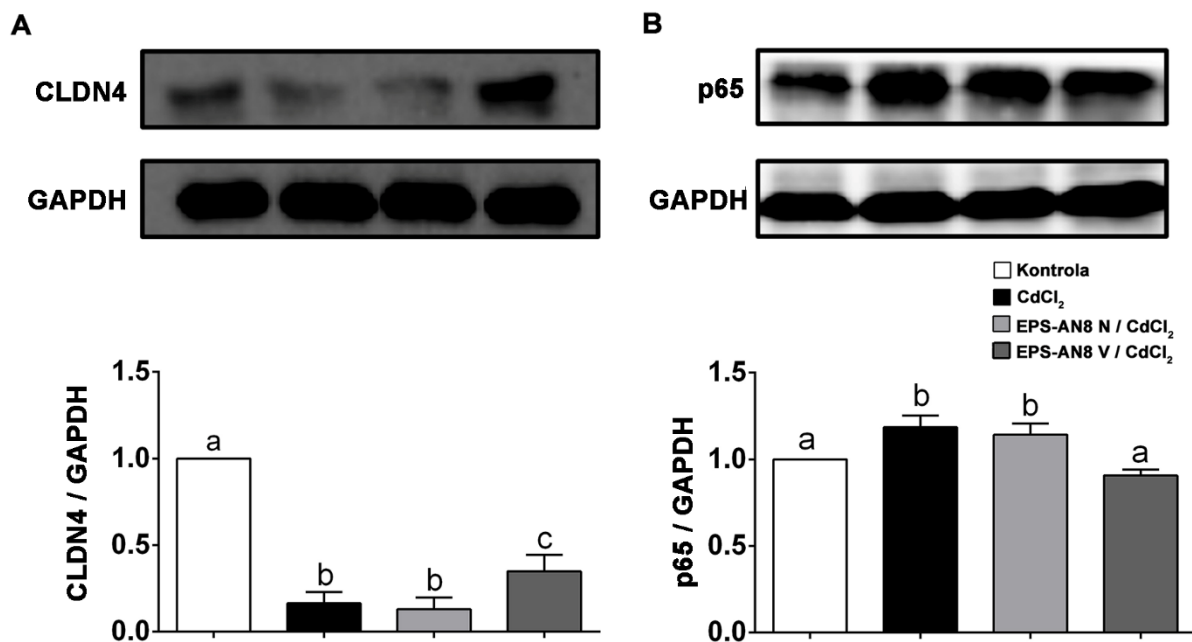
Slika 18. Uticaj EPS-AN8 na redukciju oštećenja međućelijskih veza izazvanih izlaganjem kadmijumu(II). EPS-AN8 je dodat u vidu niže (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, N) i više (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, V) koncentracije. (A) Stepen propustljivosti diferenciranog sloja ćelija je praćen prolaskom LY boje, nakon 24 sati tretmana kadmijumom (II), kao i istovremenih tretmana kadmijumom(II) i nižom i višom koncentracijom EPS-AN8. Dobijene vrednosti su normalizovane u odnosu na vrednosti kontrole. Meren je i efekat na relativnu ekspresiju iRNK za (B) *CDH1*; (C) *ZO-1*; (D) *OCLN*; (E) Efekat na ekspresiju kladina (reprezentativni western blot i denzitometrijska analiza). Rezultati ekspresije su izraženi u odnosu na konstitutivno ekspimiran protein GAPDH. Jednofaktorska ANOVA i Tuckey post hoc test su korišćeni za međusobno poređenje rezultata. Vrednosti obeležene različitim slovima a i bce su se statistički značajno ($p < 0,005$) razlikovale.

4.1.9. Terapijsko delovanje EPS-AN8 po nastanku kadmijumovih(II) oštećenja u diferenciranim *Caco-2* ćelijama

U ovoj doktorskoj disertaciji primenjen je i terapijski pristup smanjenja intenziteta oštećenja izazvanih kadmijuma u diferenciranim *Caco-2* ćelijama. Po završenim tretmanima, praćen je efekat na ekspresiju proteina čvrstih veza, kladina, i jedarne forme NF κ B, proteina p65 (Slika 19).

Nakon izlaganja diferenciranih *Caco-2* ćelija kadmijumu(II), a potom medijumu za gajenje ćelija, uočava se značajno ($p < 0,05$) smanjenje nivoa ekspresije kladina u odnosu na kontrolu (Slika 19A). Značajno snižena ($p < 0,05$) ekspresija je prisutna i u prisustvu obe koncentracije EPS-AN8 u poređenju sa kontrolom. Važno je napomenuti da je detektovan nivo kladina pri tretmanima kadmijumom(II), pa nakon 24 sata višom koncentracija EPS-AN8 značajno ($p < 0,05$) viši u odnosu na tretman samim kadmijumom(II).

Primećuje se i da je nivo ekspresije p65 ostao povišen nakon 24 sata od završetka izloženosti kadmijumu(II) (Slika 19B). Značajno ($p < 0,05$) viši nivo ekspresije p65 karakteriše i tretman diferenciranih Caco-2 ćelija nižom koncentracijom EPS-AN8 po primarnom delovanju kadmijuma(II). Zanimljivo, nakon prvobitne izloženosti kadmijumu(II), kod naknadnog tretmana višom koncentracijom EPS-AN8 nisu zabeležene statistički značajne promene u odnosu na netretirane ćelije. Odnosno terapija višom koncentracijom EPS-AN8 je značajno smanjila kadmijumom(II) uzrokovano povećano ekspimiranje proteina p65.

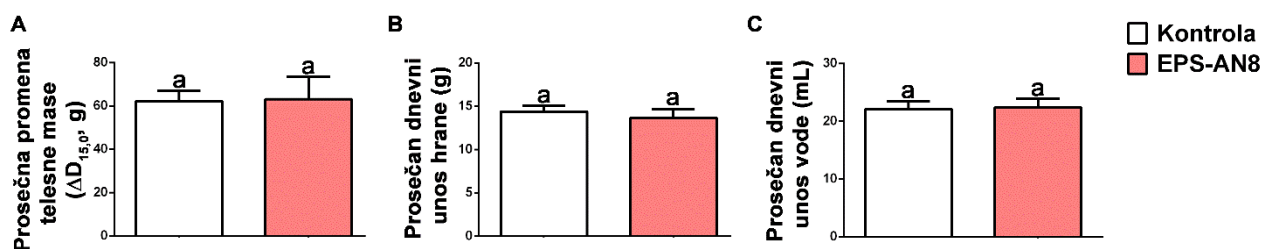


Slika 19. Terapeutski efekat EPS-AN8 na kadmijumovo štetno delovanje. Efekat je praćen na nivou: A) Ekspresije proteina kladina (reprezentativni western blot i denzitometrijska analiza); B) Ekspresije proteina p65 (reprezentivni western blot i denzitometrijska analiza). Rezultati ekspresije su izraženi u odnosu na konstitutivno ekspimiran protein GAPDH. Za međusobno poređenje dobijenih rezultata ekspresije korišćena je jednofaktorska ANOVA i Tuckey post hoc test. Vrednosti obeležene različitim slovima abecede su se statistički značajno ($p < 0,005$) razlikovale.

4.2. Utvrđivanje *in vivo* zaštitnog efekta EPS-AN8 na produženu oralnu izloženost kadmijumu(II)

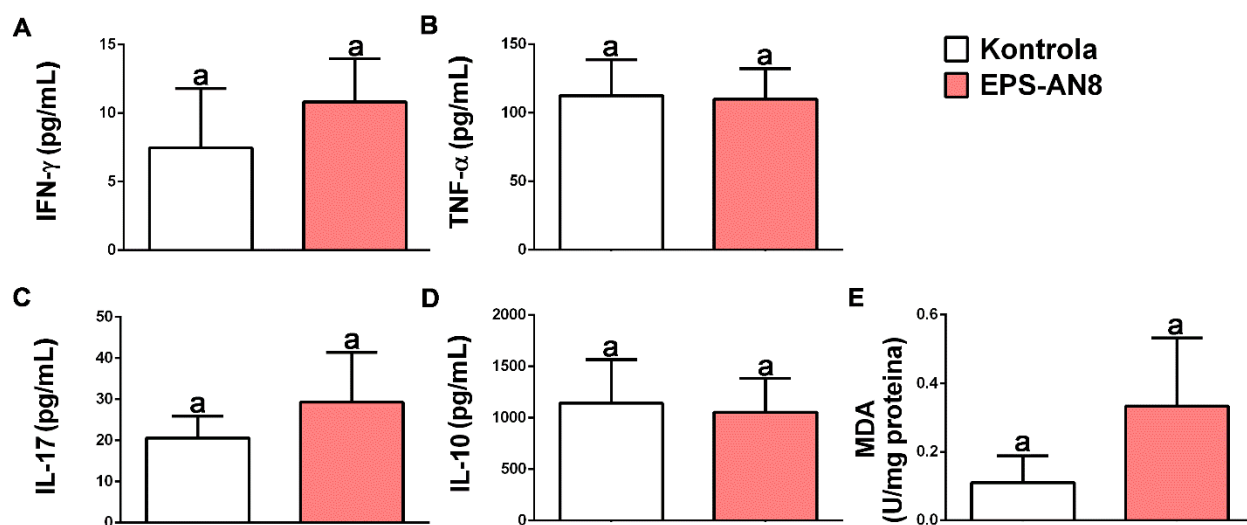
4.2.1. Praćenje efekata oralno unetog EPS-AN8 na zdrave DA pacove

U cilju ispitivanja bezbedne primene EPS-AN8 i detektovanja potencijalnih neželjenih posledica po organizam, životinje su kroz hranu svakog dana, u periodu od 15 dana, unosile 100 µg/mL EPS-AN8. Nakon perioda od 15 dana, nije detektovan ni jedan smrtni ishod životinja. Nisu primećene promene u dobitku/gubitku telesne mase, ni u prosečnom dnevnom unosu hrane, kao ni promene u prosečnom dnevnom unosu vode, između kontrolne grupe (netretirane životinje) i grupe koja je dobijala EPS-AN8 (Slika 20).



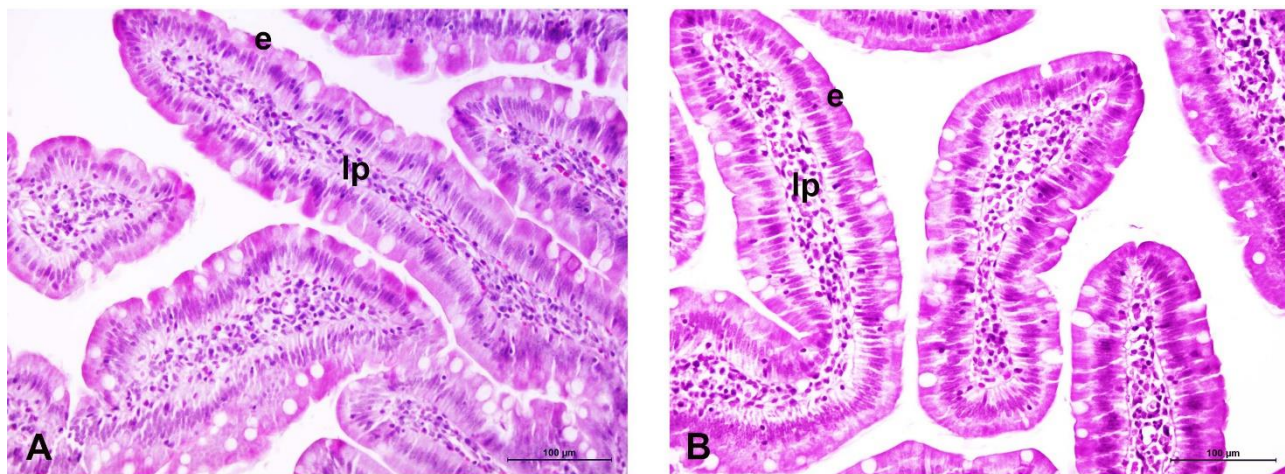
Slika 20. Prikaz efekata EPS-AN8 na osnovne parametre zdravih životinja. (A) Prosečna promena telesne mase nakon 15 dana administracije EPS-AN8 prikazana je na nivou grupa i izražena je u gramima (g). (B) Prosečan dnevni unos hrane je izražen na nivou grupa, u gramima (g). (C) Prosečan dnevni unos vode na nivou grupa, prikazan u mililitrima (mL). Za poređenje dobijenih rezultata korišćen je Studentov t test. Vrednosti koje su obeležene različitim slovima abecede su se statistički značajno razlikovale ($p < 0.05$).

Potencijalno ostvarene promene pri unosu EPS-AN8, tokom 15 dana kroz hranu, su praćene i na nivou produkcije imunomodulatornih citokina u homogenatima duodenuma (Slika 21). Između kontrolnih životinja i životinja koje su dobijale EPS-AN8 se ne uočava statistički značajna razlika u oslobađanju proinflatornih (IFN- γ , TNF- α , IL-17) i anti-inflatornih (IL-10) citokina (Slika 21A-D). Pored navedenih citokina, praćena je i promena u količini malondialdehida koja bi ukazala na moguće izazivanje oksidativnog stresa po unosu EPS-AN8. Međutim, statistički značajne promene nisu zabeležene (Slika 21 E).



Slika 21. Prikaz efekata EPS-AN8 na produkciju citokina i formiranje malondialdehida. Izmerena je proizvodnja (A) IFN- γ ; (B) TNF- α ; (C) IL-17; (D) IL-10; (E) malondialdehida. Za poređenje dobijenih rezultata korišćen je Studentov t test. Vrednosti koje su obeležene različitim slovima abecede su se statistički značajno razlikovale ($p < 0.05$).

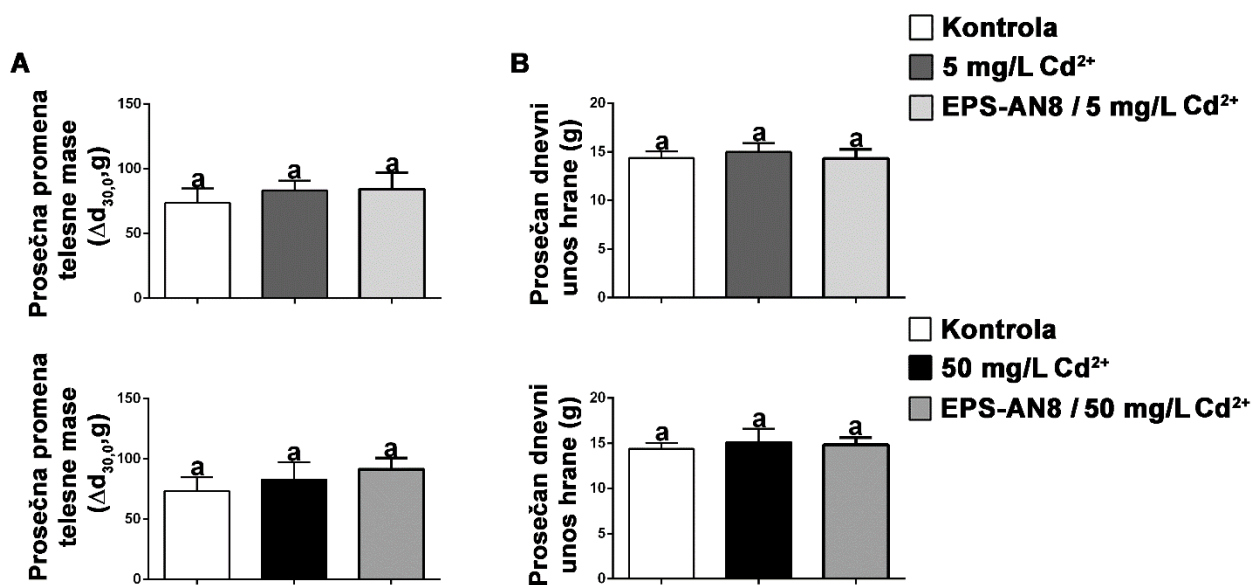
Sa ciljem dodatne potvrde bezbedne upotrebe izabrane koncentracije EPS-AN8, rađena je histopatološka analiza preparata duodenuma. Histološka slika duodenuma kontrolnih i eksperimentalnih životinja se nije razlikovala (Slika 22). Kod obe grupe jedinki, duge crevne resice su pravilno organizovane sa cilindričnim epitelom koji se sastoji od enterocita i peharastih ćelija, sa jezdrima postavljenim u donjoj polovini ćelije. *Lamina propria* je tanka sa normalnim sadržajem ćelija.



Slika 22. Efekat unosa EPS-AN8, kroz hranu, na histološku organizaciju duodenuma zdrave životinje. (A) Reprezentativna mikrografija preseka duodenuma životinje iz kontrolne grupe; (B) Reprezentativna mikrografija preseka duodenuma životinje koja je oralnim putem unosila EPS-AN8. Skraćenice: lp-*lamina propria*; e-epitel.

4.2.2. Osnovni podaci nakon oralnog unosa EPS-AN8 i produžene oralne izloženosti kadmijumu(II)

Mušjaci DA soja pacova su unosili, u nižoj (5 mg/L) i višoj (50 mg/L) dozi, kadmijumu(II) kroz pijaću vodu u toku produženog vremenskog perioda (30 dana). Životinje, koje su pripadale grupama koje unose EPS-AN8, su svakog dana kroz standardnu pacovsku hranu dobijale 100 µg/mL EPS-AN8. Tokom trajanja eksperimenta, nije došlo do smrti životinja. Razlike u promenama telesne mase između grupa nisu detektovane (Slika 23A). Ni prosečan unos hrane nije varirao među grupama (Slika 23B). Prosečan dnevni unos kadmijuma(II) je izračunat na osnovu količine popijene vode i telesne mase jedinke (Tabela 9).



Slika 23. Prikaz opštih podataka po završenom eksperimentu koji je imao za cilj da ispita zaštitne efekte EPS-AN8 na ostvarivanje štetnosti oralno unetog kadmijuma(II), u produženom vremenskom periodu. Rezultati eksperimentalnih grupa koje su podrazumevali izloženost nižoj (5 mg/L) dozi kadmijuma(II) su prikazani u gornjem redu, dok su rezultati dobijeni za višu (50 mg/L) dozu kadmijuma(II) prikazani u donjem redu. Osnovni podaci su dobijeni praćenjem: (A) Prosečne promene telesne mase, koja je izračunata kao razlika u telesnim masama na 30.dan i na dan početka eksperimenta, na nivou grupe. Rezultat je prikazan u gramima (g). (B) Prosečnog dnevnog unosa hrane na nivou grupe, iskazan u g. Rezultati su prikazani kao SV (n=4 i n=5) ± SD. Za međusobno upoređivanje rezultata korišćena je jednofaktorska ANOVA. Vrednosti koje nisu obeležene istim slovom abecede su se statistički značajno (p<0,05) razlikovale

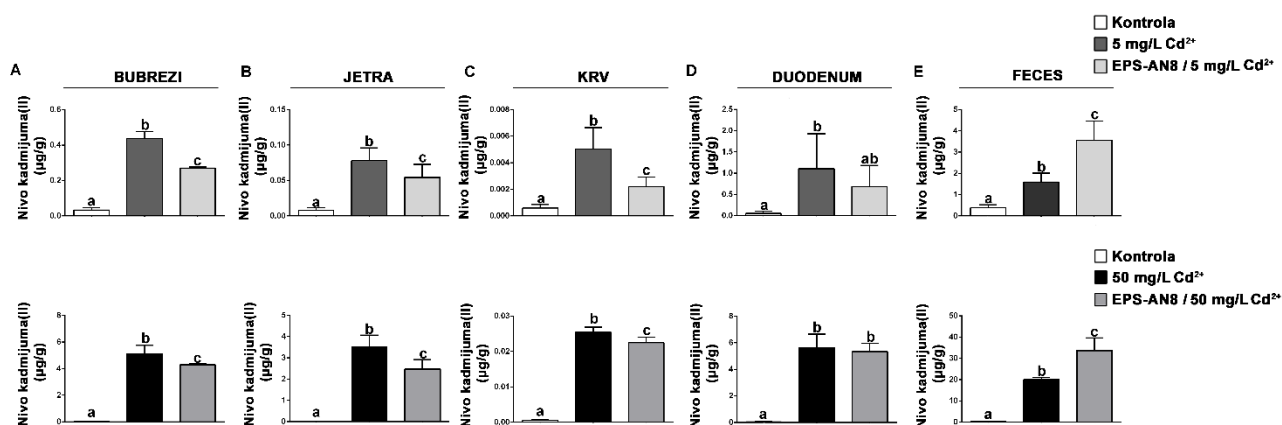
Tabela 9. Prikaz prosečnog dnevnog unosa kadmijuma i p vrednosti između poređenih grupa. Za poređenje dve grupe je upotrebljen Studentov t-test. Statistički značajnim razlikama su smatrane vrednosti p<0.05.

Naziv grupe	Prosečan dnevni unos kadmijuma(II) (mg/kg)	p vrednost
Kontrolna	0	p=0,0741
5 mg/L Cd ²⁺	0,72 ± 0,1	
EPS-AN8 / 5 mg/L Cd ²⁺	0,83 ± 0,1	
50 mg/L Cd ²⁺	7,2 ± 0,3	p=0,8461
EPS-AN8 / 50 mg/L Cd ²⁺	7,3 ± 0,3	

4.2.3. Uticaj EPS-AN8 na smanjenje deponovanja kadmijuma(II) u organizmu DA pacova

Tokom izloženosti kadmijumu(II) povećava se akumulacija navedenog toksičnog metala u organizmu. Sadržaj kadmijuma je u bubrezima, jetri, krvi i duodenumu, odnosno glavnim ciljnim organima njegove toksičnosti određen metodom ICP-MS. Pored toga, izmerena je koncentracija kadmijuma i u fekalnom materijalu, kako bi se došlo do saznanja o stopi ekskrecije metala iz organizma.

Rezultati izmerene koncentracije kadmijuma su prikazani na Slici 24. Nakon produžene oralne izloženosti kadmijumu(II), unos niže, odnosno, više doze korišćene u ovoj doktorskoj tezi je doveo do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja sadržaja toksičnog metala u bubrezima, jetri, krvi, duodenumu i fecesu, u odnosu na kontrolne životinje. Zanimljivo, kod životinja koje su paralelno sa kadmijumom(II) unosile kroz hranu EPS-AN8, uočava se smanjenje koncentracije kadmijuma u organizmu. Naime, značajno smanjen nivo ($p < 0,05$) kadmijuma se primećuje u bubrezima, jetri i krvi nakon izloženosti višoj i nižoj dozi kadmijuma(II), u prisustvu EPS-AN8. Osim toga, u grupama koje su istovremeno sa višim i nižim dozama kadmijuma(II) unosile i EPS-AN8, zabeleženo je značajno veće ($p < 0,05$) prisustvo jona kadmijuma u fecesu u odnosu na kontrolne životinje, ali i u odnosu na životinje izložene samo kadmijumu(II). Važno je napomenuti da zapaženi efekat smanjenog sadržaja jona kadmijuma, do kojeg dovodi unošenje EPS-AN8 putem hrane, nije primećen u duodenumu. U tom tkivu, uočava se trend smanjenja prisustva metala, ali bez ostvarene statističke značajnosti između grupa izoženih samo kadmijumu(II) i grupa koje su unosile i kadmijum(II) i EPS-AN8.

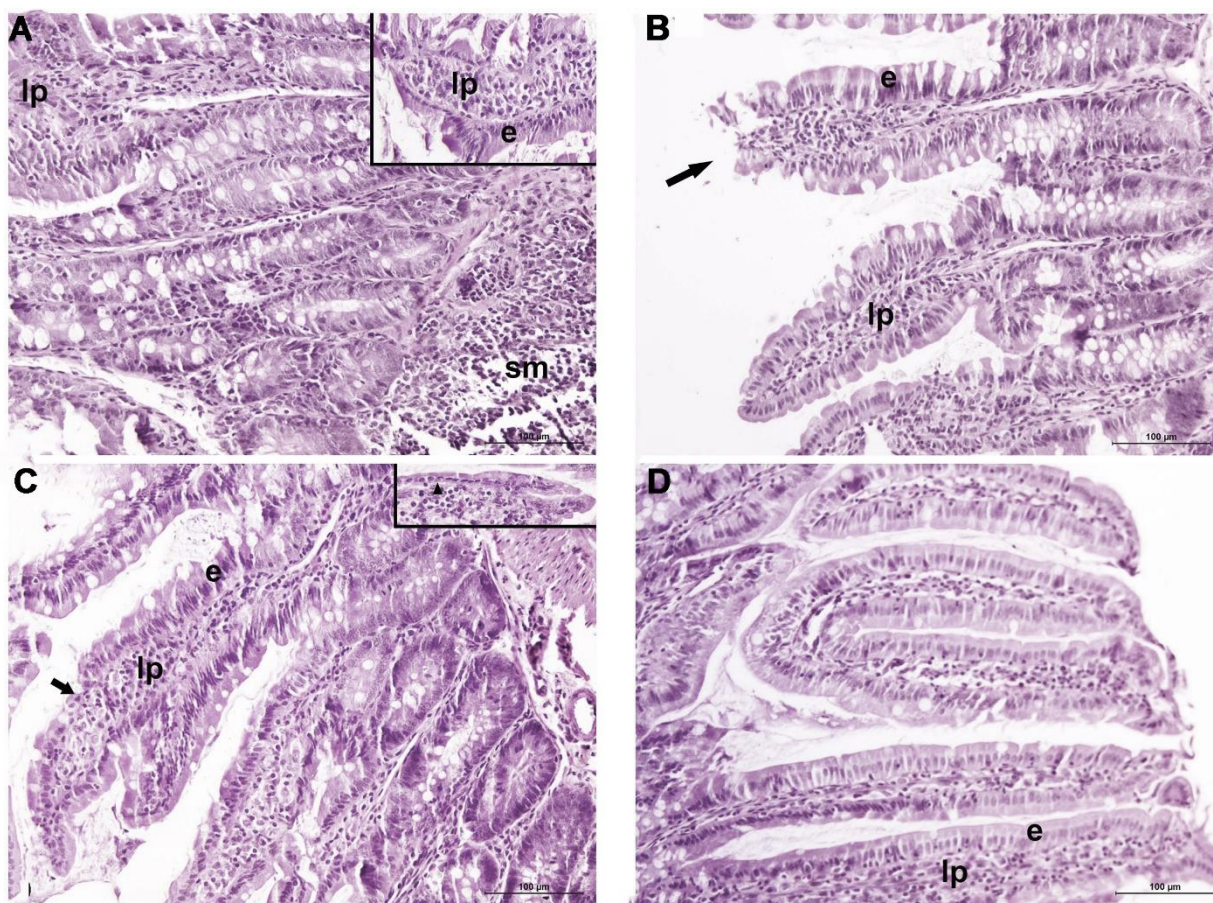


Slika 24. Efekat EPS-AN8 na deponovanje kadmijuma u organizmu pri produženoj oralnoj izloženosti kadmijumu(II). Deponovanje je prikazano za unos niže (5 mg/L, gornji red) i više (50 mg/L, donji red) doze kadmijuma(II) u (A) bubrezima; (B) jetri; (C) krvi; (D) duodenumu; i (E) fecesu. Rezultati su prikazani kao $SV(n=4 \text{ i } n=5) \pm SD$, dok su jednofaktorska ANOVA i Tuckey post hoc test korišćeni za njihovo poređenje. Vrednosti obeležene različitim slovima abecede su se statistički značajno ($p < 0,05$) razlikovale.

4.2.4. Uticaj unosa EPS-AN8 na ublažavanje histopatoloških promena prouzrokovanih kadmijumom(II)

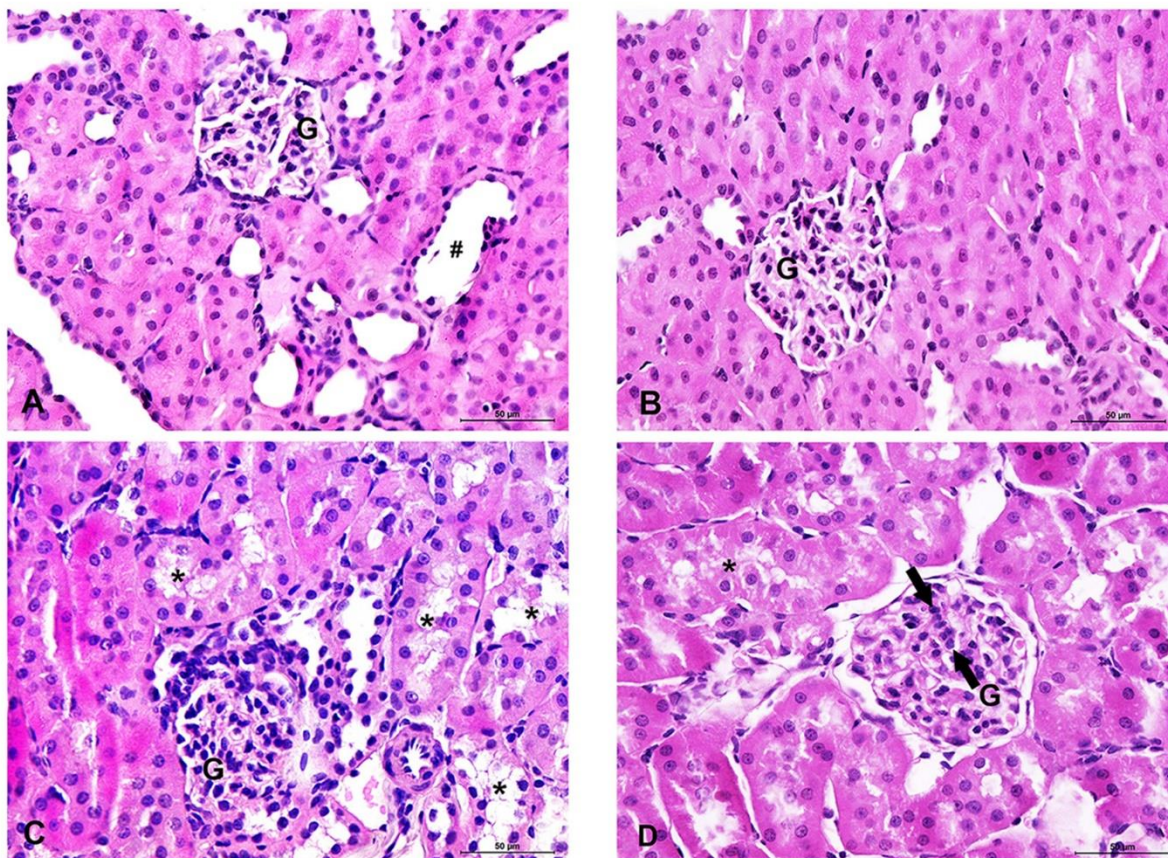
Histopatološke promene nakon produžene oralne izloženosti delovanju dve doze kadmijuma(II) i unosa EPS-AN8 su analizirane na poprečnim presecima duodenuma, bubrega i jetre.

Oralno unet kadmijum(II) je uticao, na dozno-zavisian način, na normalnu histološku strukturu sluzokože duodenuma (Slika 25). Kod pacova koji su unosili 5 mg/L kadmijuma(II) primećuje se skraćjenje i zadebljanje resica, dok se u bazi crevnih žlezda primećuje blaga hiperplazija. Epitel je na pojedinim mestima oštećen i naizgled sadrži veći broj mucinogenih (peharastih) ćelija. U *lamini propria* se primećuje povećana infiltracija leukocita. Navedene promene su još uočljivije u histološkoj građi duodenuma životinja koje su u produženom vremenskom periodu unosile 50 mg/L kadmijuma(II). Nasuprot tome, kod obe grupe životinja koje su kroz hranu unosile EPS-AN8 vidljivo su smanjene navedene histopatološke promene, pri čemu izgleda da su kod grupe EPS-AN8 / 50 mg/L Cd²⁺ mucinogene ćelije prisutne u manjoj meri nego u grupi koja nije unosila EPS-AN8.



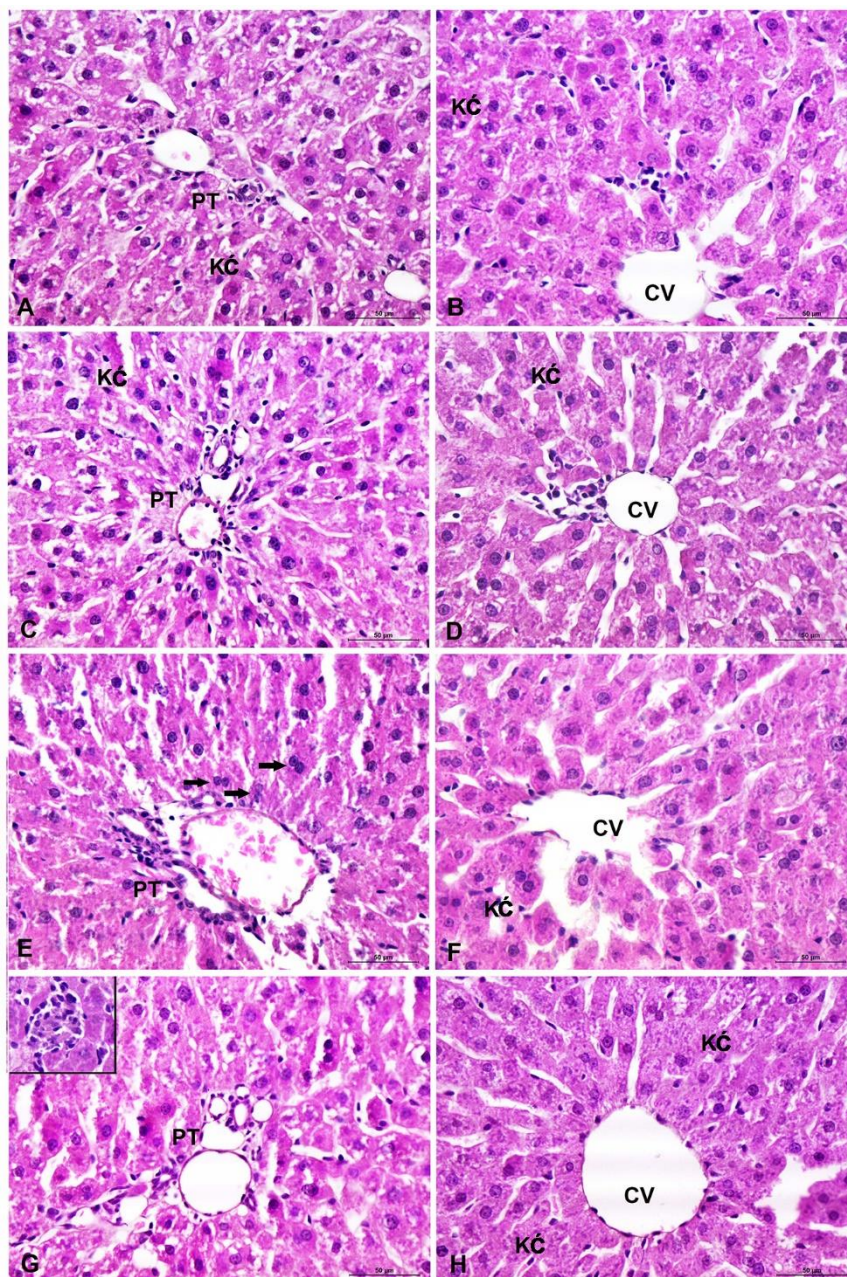
Slika 25. Efekat EPS-AN8 na smanjenje histopatoloških promena izazvanih kadmijumom(II) u duodenumu. Reprezentativne mikrografije za duodenum DA pacova iz različitih grupa: (A) 5 mg/L Cd²⁺; (B) EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺; (C) 50 mg/L Cd²⁺; (D) EPS-AN8 / 50 mg/L Cd²⁺. Strelice ukazuju na potpuno odsustvo dela epitela i oštećenje vrha crevne resice. Skraćenice: e-epitel, lp-lamina propria, sm-submokoza. Originalno uveličanje je 20x.

Na snimcima histoloških preseka bubrega kod životinja izloženih nižoj dozi kadmijuma(II) detektovane su kortikalne lezije koje uključuju infiltraciju inflamatornih ćelija, hipertrofiju epitelnih ćelija proksimalnih tubula i blagu dilataciju distalnih tubula (Slika 26A). Opisane histološke promene, koje se mogu dovesti u vezu sa efektom niže doze rastvora kadmijuma, su potpuno neutralisane kod grupe koja je pored izloženosti odgovarajućoj dozi kadmijuma(II) kroz hranu unosila EPS-AN8 (Slika 26B). Kod životinja koje su unosile višu dozu kadmijuma(II), primećena je snažna infiltracija inflamatornih ćelija, povećanje glomerula i hipercelularnost, kao i degeneracija proksimalnih tubula u rasponu od vakuolizacije ćelija i gubitka četkaste ivice do izraženijih oštećenja uključujući i gubitak epitelnih ćelija (Slika 26C). Opisani štetni efekti su ublaženi kod grupe pacova koja je u prisustvu EPS-AN8 oralno izložena višoj dozi kadmijuma(II) (Slika 26D).



Slika 26. Efekat EPS-AN8 na smanjenje pojave histopatoloških promena u bubrezima izazvanih kadmijumom(II). Reprezentativni snimci histoloških preseka bubrega DA pacova predstavnika različitih grupa, bojenih hematoxilinom i eozinom: (A) 5 mg/L Cd²⁺; (B) EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺; (C) 50 mg/L Cd²⁺; (D) EPS-AN8 / 50 mg/L Cd²⁺. #-dilatacija distalnih tubula. *-degeneracija proksimalnih tubula. Strelice pokazuju na proliferišuće ćelije mezangijuma. Skraćenica: G-glomerul. Originalno uveličanje je 40x.

Histološkom analizom na nivou jetre su uočene brojne histopatološke promene indukovane nižom i višom dozom kadmijuma(II), pri čemu je viša doza izazvala jači intenzitet promena (Slika 27). Kod obe, samo kadmijumom(II), tretirane grupe se primećuju brojni vakuolizirani hepatociti sa uveličanom vakuolom, gubitak trabekularne organizacije jetrinog reznjica kao i difuzni infiltrati inflamatornih ćelija. Endotel portne vene je često diskontinuiran na pregledanim histološkim presecima. Zabeležene su i aktivirane Kupferove ćelije koje zauzimaju lumen sinusoida. Na poprečnim presecima jetre životinja unutar grupe koja je pila višu dozu kadmijuma(II) zapažaju se i hepatociti sa piknotičkim nukleusom (Slika 27E-F). Histopatološke promene usled produžene oralne izloženosti kadmijumu(II) su uočljivije u periportnom području, nego oko centralne vene. Histološki preseki jetre životinja koje su pored niže i više doze kadmijuma(II), unosile svakog dana i EPS-AN8 su se karakterisali jasno vidljivim smanjenjem histopatološkog oštećenja oko centralne vene i parenhima periportnog regiona (Slika 27C, D, G, H).



Slika 27. Efekat unosa EPS-AN8 na redukciju stepena oštećenja jetre izazvanog produženim oralnim izlaganjem kadmijumu(II). Akcenat je stavljen na periportnu i pericentralnu zonu lobulusa. Na slici su predstavljene reprezentativne mikrografije tkiva jetre DA pacova predstavnika različitih grupa, bojene hematoksilinom i eozinom: (A, B) pacova izloženih 5 mg/L Cd²⁺; (C, D) životinja iz grupe EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺; (E, F) grupe 50 mg/L Cd²⁺; (G,H) grupe EPS-AN8 / 50 mg/L Cd²⁺. Strelice pokazuju na dvojedarne hepatocite i ćelije sa piknotičkim jedrom. Pt-trijada portnog kanala, KC-Kupferove ćelije, CV-centralna vena. Originalno uveličanje je 40x.

4.2.5. Uticaj EPS-AN8 na ublaženje pojave kadmijumom(II) izazvanog oksidativnog stresa u duodenumu

Da bismo ustanovili efekat unosa EPS-AN8 na kadmijumom(II) prouzrokovan oksidativni stres, u homogenatima duodenuma su praćeni parametri koji ukazuju na njegovo prisustvo, poput detekcije količine MDA, aktivnosti enzima katalaze i GST, kao i prisustva GSH (Slika 28).

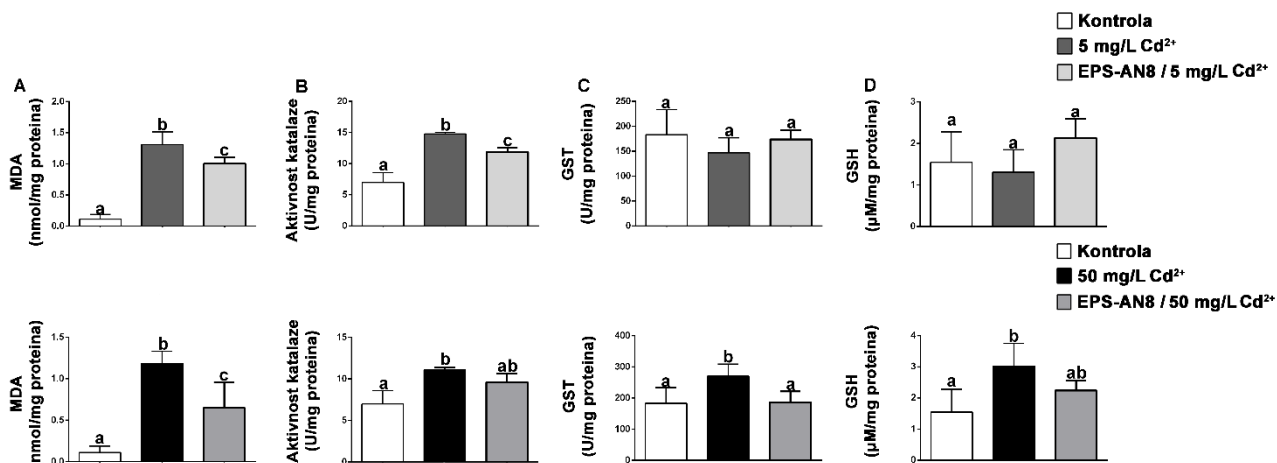
Obe doze kadmijuma(II) su značajno povećale ($p < 0,05$) nivo MDA u poređenju sa kontrolom (Slika 28A). Kod grupa koje su unosile i EPS-AN8 (EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺ i EPS-AN8 / 50 mg/L Cd²⁺) nivo MDA je značajno niži ($p < 0,05$) u poređenju sa grupama koje su unosile samo

kadmijum(II), ali je i dalje prisutno značajno povećanje ($p < 0,05$) u odnosu na nivo kod kontrolnih životinja.

U odgovoru na nižu i višu dozu kadmijuma(II), značajno ($p < 0,05$) je povećana aktivnost katalaze u homogenatima duodenuma, u poređenju sa kontrolom (Slika 28B). Grupu EPS-AN8 / 5 mg/L Cd^{2+} karakteriše značajno smanjena ($p < 0,05$) aktivnost ovog enzima, dok životinje grupe EPS-AN8 / 50 mg/L Cd^{2+} odlikuje smanjenje koje se ne razlikuje statistički značajno ni od kontrolne grupe, ali ni od grupe 50 mg/L Cd^{2+} .

Pri produženoj oralnoj izloženosti nižoj dozi kadmijuma(II) nisu zabeležene statistički značajne promene na aktivnost GST (Slika 28C). Suprotno tome, aktivnost je značajno povišena ($p < 0,05$) pri produženom oralnom tretmanu višom dozom kadmijuma(II). Zanimljivo, pri unosu EPS-AN8, aktivnost se nije razlikovala od aktivnosti GST u homogenatima pacova kontrolne grupe.

Slične promene su identifikovane i kod analize izmerenog nivoa GSH. Promena nivoa GSH nije zabeležen u odgovoru na izloženost 5 mg/L kadmijuma(II). Međutim, nivo detektovanog GSH je značajno ($p < 0,05$) povišen kod grupe koja je pila 50 mg/L kadmijuma(II). Pri paralelnom unosu EPS-AN8 uočava se smanjenje nivoa u odnosu na GSH nivo jedinki koje su samo unosile 50 mg/L kadmijuma(II), ali bez statističke značajnosti (Slika 28D).



Slika 28. Efekat unosa EPS-AN8 na smanjenu pojavu kadmijumom(II) indukovano oksidativnog stresa. Rezultati su grupisani prema odgovarajućoj dozi kadmijuma(II): u gornjem redu su prikazani rezultati za nižu dozu (5 mg/L) kadmijuma(II), dok donji red čine rezultati za višu dozu (50 mg/L). Oksidativni stres je praćen preko (A) malondialdehida (MDA), koji nastaje kao proizvod lipidne peroksidacije; (B) aktivnosti enzima katalaze; (C) aktivnosti glutationtransferaze (GST); i (D) nivoa redukovano glutationa (GSH). Rezultati su prikazani kao SV ($n=4$ i $n=5$) \pm SD, dok su jednofaktorska ANOVA i Tuckey post hoc test su korišćeni za njihovo poređenje. Vrednosti obeležene različitim slovima abecede su se statistički značajno ($p < 0,05$) razlikovale.

4.2.6. Uticaj EPS-AN8 na sprečavanje inflamacije izazvane kadmijumom(II) u duodenumu

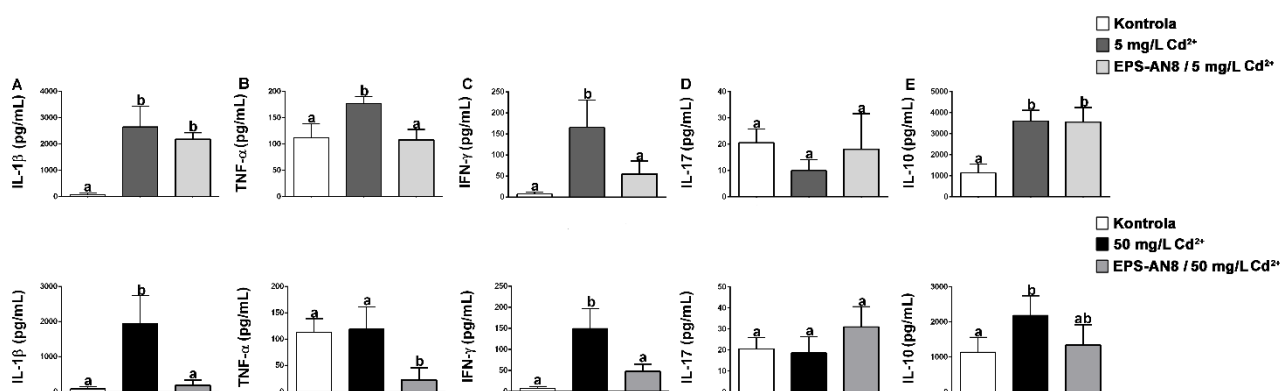
Da bismo proverili potencijalnu zaštitu koju obezbeđuje unos EPS-AN8 od inflamacije tkiva duodenuma prouzrokovanu kadmijumom(II), analiziran je sadržaj citokina u homogenatima (Slika 29).

Obe doze kadmijuma(II) su nakon produžene oralne izloženosti dovele do značajnog ($p < 0,05$) povećanja sadržaja proinflamatornog citokina IL-1 β (Slika 29A), pri poređenju sa sadržajem tog citokina u duodenumu kontrolnih jedinki. Pri unosu EPS-AN8 i izloženosti nižoj dozi kadmijuma(II) sadržaj IL-1 β je, takođe, povišen ($p < 0,05$). Međutim, u prisustvu EPS-AN8, viša doza kadmijuma(II) nije zabeležena promena u sadržaju citokina u odnosu na kontrolu, a statistički je značajno ($p < 0,05$) smanjen u odnosu na tretman samom višom dozom kadmijuma(II).

Niža doza kadmijuma(II) je značajno ($p < 0,05$) povisila sadržaj TNF- α u odnosu na kontrolu, dok viša doza nije izazvala istovetni efekat (Slika 29B). Kod životinja koje su paralelno unosile EPS-AN8 i bile izložene nižoj dozi, nivo TNF- α se nije razlikovao od sadržaja ovog citokina u duodenumu kontrolnih životinja. Pri izloženosti višoj dozi kadmijuma(II) i unosu EPS-AN8, nivo citokina je značajno niži ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu.

U odgovoru na obe doze kadmijuma(II), značajno ($p < 0,05$) je povećan sadržaj proinflatornog citokina IFN- γ (Slika 29C) u poređenju sa kontrolom. Ovaj citokinski odgovor se ne uočava u duodenumu životinja koje su zajedno sa nižom, odnosno, višom dozom kadmijuma(II) unosile EPS-AN8.

Produžena oralna izloženost nižoj i višoj dozi kadmijuma(II) nije ostvarila statistički značajne promene na nivo proinflatornog citokina IL-17, dok je sadržaj imunomodulatornog citokina IL-10 značajno ($p < 0,05$) povećan za obe doze kadmijuma(II), pri čemu ni paralelni unos EPS-AN8 nije doveo do značajnih promena (Slika 29D i E).

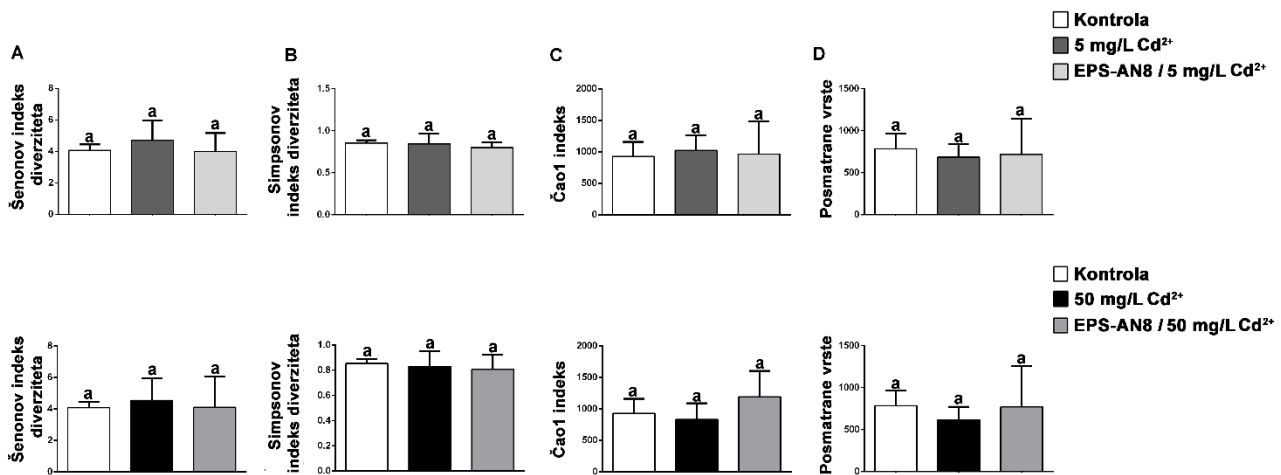


Slika 29. Efekat paralelnog unosa EPS-AN8 na kadmijumom(II) izazvanu produkciju citokina. Rezultati su grupisani prema odgovarajućoj dozi kadmijuma(II): u gornjem redu su prikazani rezultati za nižu dozu (5 mg/L) kadmijuma(II), dok donji red čine rezultati za višu dozu (50 mg/L). Prikazan je profil produkcije citokina: (A) IL-1 β ; (B)TNF- α ; (C)IFN- γ ; (D) IL-17; (E) IL-10. Rezultati su iskazani u vidu SV ($n=4$ i $n=5$) \pm SD, dok su jednofaktorska ANOVA i Tuckey post hoc test su korišćeni za njihovo poređenje. Vrednosti obeležene različitim slovima abecede su se statistički značajno ($p < 0,05$) razlikovale.

4.2.7. Uticaj EPS-AN8 na redukovanje promena u sastavu mikrobiote izazvane kadmijumom(II)

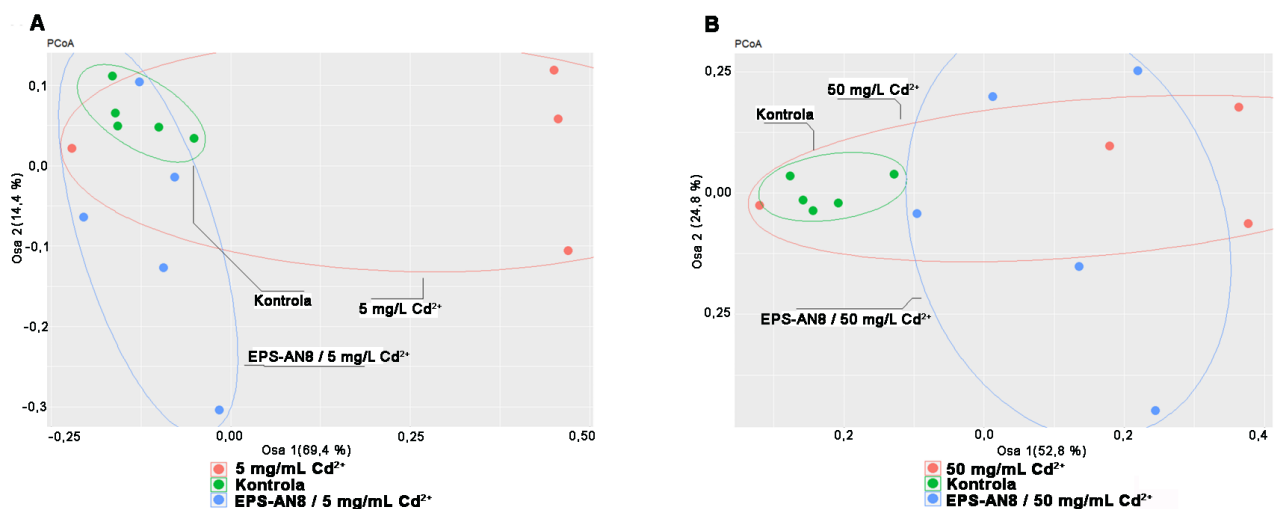
Sa ciljem ispitivanja promena u mikrobioti duodenuma usled produžene oralne izloženosti kadmijumu(II), i praćenje potencijalnih efekata unosa EPS-AN8 na te promenu, iz lumena duodenuma je izolovana, zatim i sekvencirana celokupna DNK metodom 16S rDNK amplikon sekvenciranja uparenih krajeva, korišćenjem Illumina NovaSeq platforme.

Alfa diverzitet predstavlja parametar biodiverziteta unutar grupe i u ovom radu je izražen kroz Šenonov, Simpsonov, Čao1 indeks, kao i indeks posmatranih vrsta (Slika 30). Produžena oralna izloženost nižoj i višoj dozi kadmijuma(II) nije prouzrokovala statistički značajne promene, kada je reč o Šenonovom, Simpsonovom i Čao1 indeksu. Ni kod životinja koje su paralelno unosile i EPS-AN8 se ne uočavaju značajne promene, u poređenju sa kontrolom. Na osnovu indeksa posmatranih vrsta, prisutan je trend smanjenja usled produžene oralne izloženosti kadmijumu(II), ali promene, takođe, nisu statistički značajne.



Slika 30. Alfa diverzitet mikrobiote duodenuma. Rezultati su grupisani prema odgovarajućoj dozi kadmijuma(II): u gornjem redu su prikazani rezultati za nižu dozu (5 mg/L) kadmijuma(II), dok donji red čine rezultati za višu dozu (50 mg/L). Alfa diverzitet je izražen preko (A) Šenonovog indeksa diverziteta; (B) Simpsonovog indeksa diverziteta; (C) Čao1 indeksa diverziteta; (D) Posmatranih vrsta. Rezultati su prikazani kao SV ($n=4$ i $n=5$) \pm SD, dok su jednofaktorska ANOVA i Tuckey post hoc test su korišćeni za njihovo poređenje. Vrednosti obeležene različitim slovima a becede su se statistički značajno ($p < 0,05$) razlikovale.

Vizuelizacija beta diverziteta, koji upoređuje sastav različitih grupa, je urađena pomoću PCoA i ukazala je da su grupe formirale različite pozicije u koordinantnom sistemu (Slika 31). Ovaj rezultat su potvrdili i testovi Anosim (Tabela 10) i Adonis (Tabela 11).



Slika 31. Prikaz beta diverziteta upotrebom PCoA analize. (A) PCoA analiza u kojoj su upoređene vrednosti za kontrolu, 5 mg/L Cd²⁺ i EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺. (B) PCoA analiza vrednosti za kontrolu, 50 mg/L Cd²⁺ i EPS / 50 mg/L Cd²⁺.

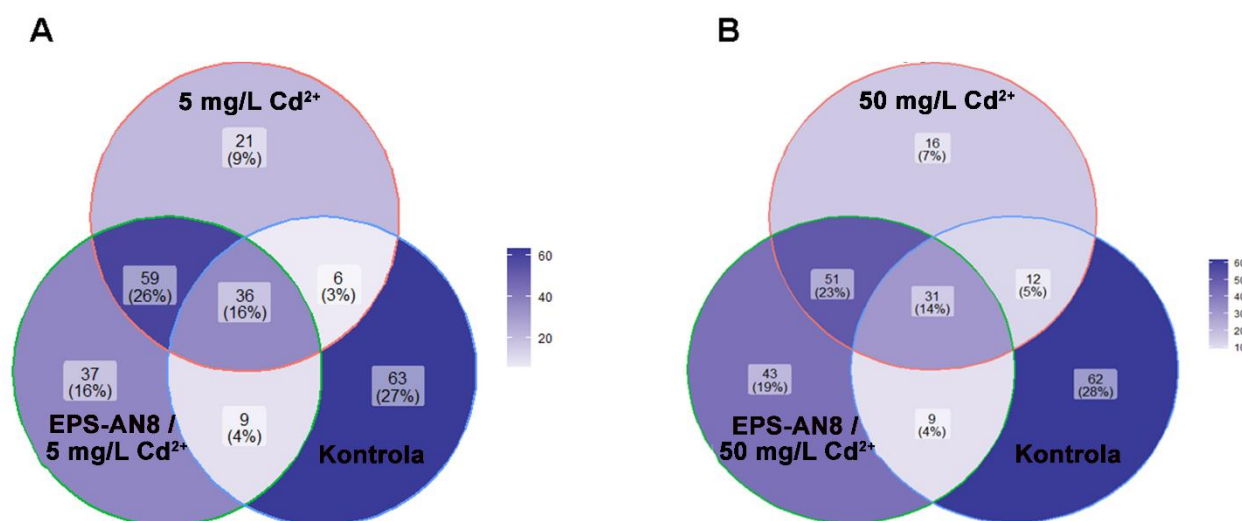
Tabela 10. Beta diverzitet izražen kroz Anosim. R vrednosti se kreću u opsegu od -1 do 1. Pozitivne vrednosti ukazuju da su razlike među grupama izraženije nego unutar grupe.

Anosim	R vrednost	P vrednost
Kontrola i 5 mg/L Cd ²⁺	0,4625	0,0479
Kontrola i EPS-AN8 / 5 mg/L Cd ²⁺	0,212	0,046
5 mg/L Cd ²⁺ i EPS-AN8 / 5 mg/L Cd ²⁺	0,3563	0,073
Kontrola i 50 mg/L Cd ²⁺	0,5	0,0239
Kontrola i EPS-AN8 / 50 mg/L Cd ²⁺	0,468	0,0085
50 mg/L Cd ²⁺ i EPS-AN8 / 50 mg/L Cd ²⁺	0,075	0,285

Tabela 11. Beta diverzitet izražen kroz Adonis. R² -vrednost daje kvantifikativnu informaciju o procentualnoj zastupljenosti operativnih taksonomskih jedinica, odgovornih za razliku između grupa.

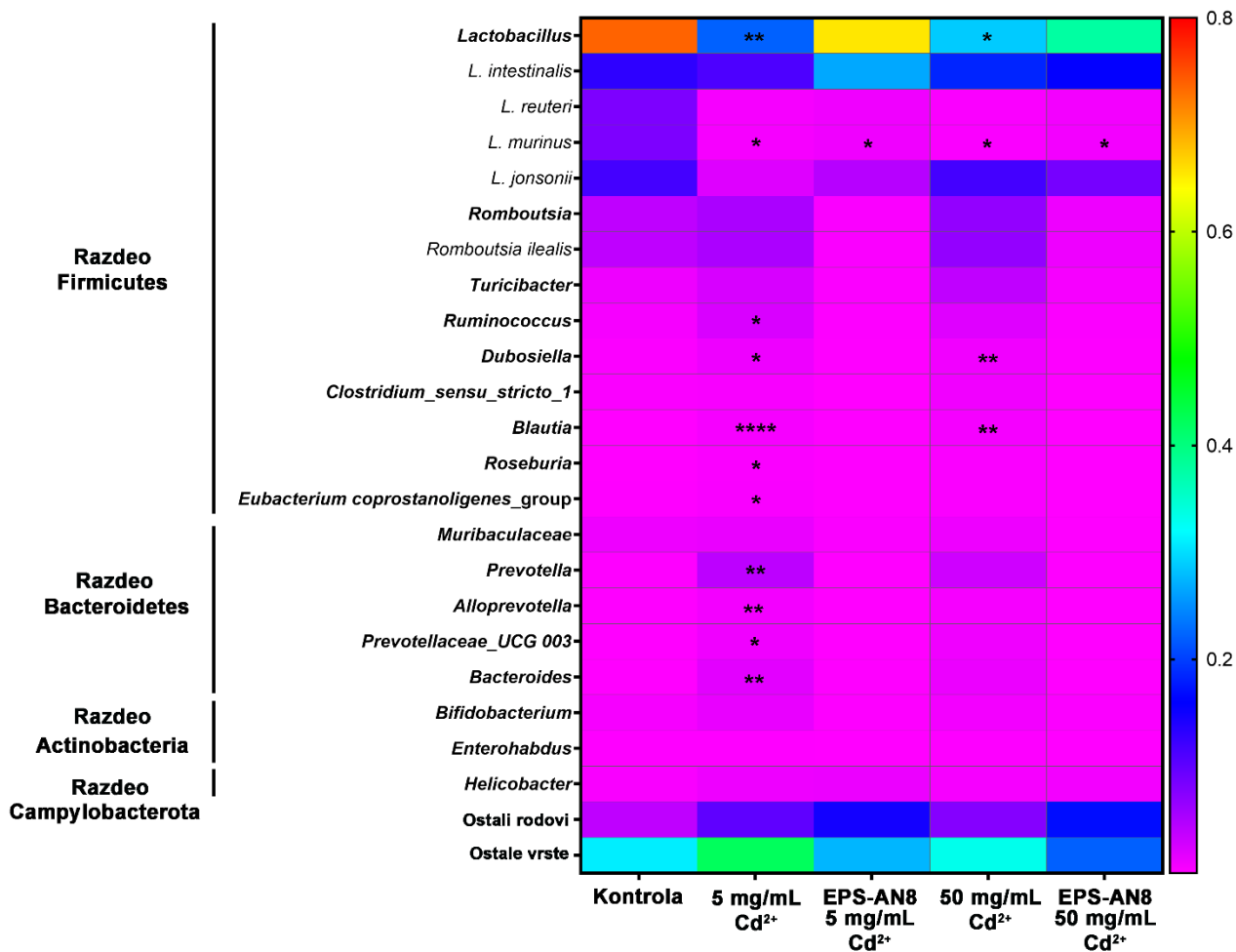
Adonis	R ² -vrednost	P vrednost
Kontrola i 5 mg/L Cd ²⁺	0,3268	0,024
Kontrola i EPS-AN8 / 5 mg/L Cd ²⁺	0,2426	0,035
5 mg/L Cd ²⁺ i EPS-AN8 / 5 mg/L Cd ²⁺	0,3088	0,052
Kontrola i 50 mg/L Cd ²⁺	0,2909	0,032
Kontrola i EPS-AN8 / 50 mg/L Cd ²⁺	0,3838	0,008
50 mg/L Cd ²⁺ i EPS-AN8 / 50 mg/L Cd ²⁺	0,143	0,312

Analiza detektovanih operativnih taksonomskih jedinica (OTU) je otkrila postojanje OTU specifičnih samo za kontrolu (27 %), za 5 mg/L kadmijum(II) (9 %), za EPS-AN8 / 5 mg/L kadmijum (II) (16 %) (Slika 32A). Slični rezultati su dobijeni i za poređenje OTU kontrole (28 %), 50 mg/L kadmijuma(II) (16 %) i grupe EPS-AN8 / 50 mg/L kadmijum(II) (19 %) (Slika 32B).



Slika 32. Prikaz reprezentativnih OTU mikrobiote duodenuma upotrebom Venovog dijagrama za: (A) kontrolu, 5 mg/L Cd²⁺ i EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺; (B) kontrolu, 50 mg/L Cd²⁺ i EPS-AN8 / 50 mg/L Cd²⁺.

Ukupno 18 OTU kod svake ispitivane grupe, na nivou roda i vrste, je imalo relativnu zastupljenost iznad odabrane prazne vrednosti (0,001), i izabrano je za dalje analize. Najviše promena je detektovano u rezedelu Firmicutes i rezedelu Bacteroidetes (Slika 33). Laktobacili su bili najzastupljeniji bakterijski rod kod svih grupa, ali njihova brojnost je značajno ($p < 0,05$) smanjena usled produžene oralne izloženosti nižoj i višoj dozi kadmijuma(II). Produžena oralna izloženost nižoj dozi kadmijuma(II) je dovela do značajnog ($p < 0,05$) povećanja zastupljenosti 5 rodova u okviru razdela Firmicutes (*Ruminococcus*, *Dubosiella*, *Blautia*, *Roseburia* i *Eubacterium coprostanoligenes*) i 4 roda u okviru razdela Bacteroidetes (*Prevotella*, *Alloprevotella*, *Prevotellaceae* i *Bacteroides*), dok je viša doza značajno povisila zastupljenost 2 roda razdela Firmicutes (*Dubosiella* i *Blautia*). Uočene promene nisu detektovane pri paralelnom unosu EPS-AN8, odnosno nije zabeležena razlika u relativnoj zastupljenosti svih navedenih rodova u odnosu na kontrolu. Kod svih eksperimentalnih grupa, u poređenju sa kontrolnom grupom, se uočava značajno ($p < 0,05$) smanjenje u relativnoj zastupljenosti vrste *Lactobacillus murinus* (nova klasifikacija: *Ligilactobacillus murinus*).

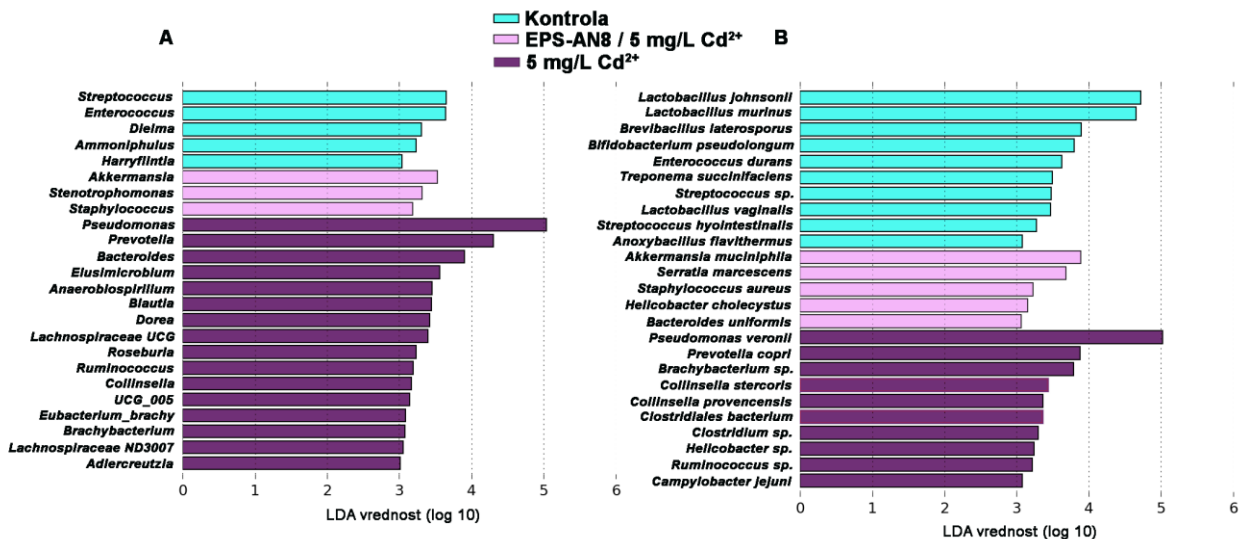


Slika 33. Uticaj unosa EPS-AN8 i produžene, oralne izloženosti kadmijumu(II) na relativnu zastupljenost rodova i vrsta u mikrobioti duodenuma DA pacova. Rezultati su prikazani kao medijane ± SD. Za poređenje rezultata je korišćena jednofaktorska ANOVA i Tuckey posthoc test. Statistički značajne promene su: * p<0,05; ** p<0,005; **** p<0,0001

LefSe metodom su identifikovani rodovi i vrste koji predstavljaju svojevrsne biomarkere grupe i dodatno ukazuju na postojanje razlika između eksperimentalnih grupa.

Upotrebom navedene metode, uporedili smo kontrolnu, EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺ i 5 mg/L Cd²⁺ grupu (Slika 34). Poređenjem na nivou rodova (Slika 34A), u kontrolnoj grupi, na osnovu LDA pogotka su se najviše isticali rodovi *Streptococcus* i *Enterococcus*, u grupi EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺ rodovi *Akkermansia* i *Stenotrophmonas*, dok su rodovi *Pseudomonas*, *Prevotella* i *Bacteroides* imali najvišu LDA vrednost u grupi koja je pila 5 mg/L kadmijuma(II).

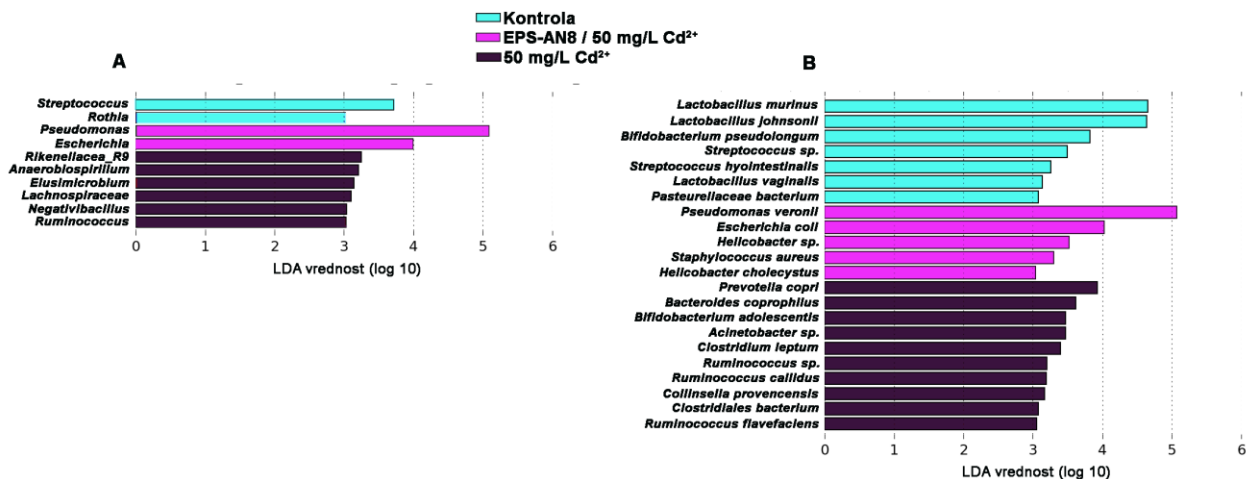
Na nivou vrste (Slika 34B), poređenje kontrolne, EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺ i 5 mg/L Cd²⁺ grupe LefSe metodom je ukazala na prisustvo 10 vrsta, diferencijalnih biomarkera, u kontroli (posebno su se isticali *L. johnsonii* i *L. murinus*), 5 u EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺ grupi (*Akkermansia muciniphila*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter cholecystus*, *Bacteroides uniformis*) i 10 u 5 mg/L Cd²⁺ grupi (*Pseudomonas veroni* i *Prevotella copri* sa imali najvišu zastupljenost).



Slika 34. Grafički prikaz biomarkera dobijenih na nivou roda i vrste LefSe analizom mikrobiote duodenuma DA pacova izloženih produženom, oralnom unosu niže doze kadmijuma(II). (A) Prikaz diferencijalnih rodova za kontrolu, EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺ i 5 mg/L Cd²⁺; (B) Prikaz diferencijalnih vrsta za kontrolu, EPS-AN8 / 5 mg/L Cd²⁺ i 5 mg/L Cd²⁺.

Poređenje kontrolne, EPS-AN8 / 50 mg/L Cd²⁺ i 50 mg/L Cd²⁺ grupe LefSe analizom je ukazalo na 2 diferencijalna roda kontrole (*Streptococcus* i *Rothia*). U grupi EPS-AN8 / 50 mg/L Cd²⁺ detektovani su rodovi *Pseudomonas* i *Escherichia*, dok je u grupi 50 mg/L Cd²⁺ zabeleženo 6 rodova (*Rikenellaceae RC9*, *Anaerobiospirillum*, *Elusimicrobium* i ostali) (Slika 35A).

U poređenju jedinki kontrole, EPS-AN8 / 50 mg/L Cd²⁺ i 50 mg/L Cd²⁺ detektovano je 7 diferencijalno prisutnih vrsta kod kontrole (*L. murinus* i *L. johnsonii* sa najvišom LDA vrednošću), 5 vrsta za grupu EPS-AN8/ 50 mg/L Cd²⁺ (*Pseudomonas veronni*, *Escherichia coli*, *Helicobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter cholecystus*, *Campylobacter jejuni* i *Arthrobacter* spp.) i 10 vrsta u 50 mg/L Cd²⁺ grupi (*Prevotella copri*, *Bacteroides coprophilus*, *Bifidobacterium adolescentis* su ostvarile najvišu LDA vrednost) (Slika 35B).



Slika 35. Grafički prikaz biomarkera dobijenih na nivou roda i vrste LefSe analizom mikrobiote duodenuma DA pacova izloženih produženom, oralnom unosu više doze kadmijuma(II). (A) Prikaz diferencijalnih rodova za kontrolu, EPS-AN8 / 50 mg/L Cd²⁺ i 50 mg/L Cd²⁺; (B) Prikaz diferencijalnih vrsta za kontrolu, EPS-AN8 / 50 mg/L Cd²⁺ i 50 mg/L Cd²⁺.

5. DISKUSIJA

Kadmijum je toksičan metal koji se povezuje sa poremećajima u ispravnom radu organa i sa razvojem širokog spektra bolesti organizma (Bimonte et al., 2021; Fagerberg i Barregard, 2021; Fu i Xi, 2020; Reyes-Hinojosa et al., 2019; Tellez-Plaza et al., 2013). Epidemiološke studije su pokazale da izloženost čak i niskoj dozi kadmijuma dovodi do štetnih efekata po zdravlje jedinke (Diaz et al., 2021; Wallin et al., 2016, 2014). Porast koncentracije ove zagađujuće supstance na globalnom nivou je uslovio potrebu za razvojem novih strategija u prevazilaženju i smanjenju štetnosti do kojih ona dovodi (Al Osman et al., 2019). Kada je reč o opštoj, nepušačkoj, populaciji, glavni vid izloženosti kadmijumu je oralnim putem (Satarug et al., 2010). Naime, široko rasprostranjena kontaminacija voda, zemljišta i vazduha dovodi do neizbežnog povećanja akumulacije ovog metala u biljkama i vodenim organizmima, samim tim kadmijum lako ulazi u lanac ishrane (Ikeda et al., 2018). Zbog navedenih razloga, izloženost kadmijumu u ovoj doktorskoj tezi je bazirana na njegovom oralnom unosu.

Različiti pristupi u postizanju smanjenja toksičnosti kadmijuma su podrazumevali primenu helirajućih terapija, esencijalnih elemenata, vitamina i proizvoda biljnog porekla (Zhai et al., 2015). Međutim, sve češće se mikroorganizmi favorizuju kao mogući vid rešenja (Zoghi et al., 2021). Primena mikrobioloških kultura u procesima detoksifikacije je postala realnost savremenog doba, pri čemu su se posebno istakle MKB kao efikasni biološki odstranjivači toksina (Liu et al., 2020). Opravdani razlozi za njihovu primenu su ekološka prihvatljivost, jednostavna upotreba i ekonomska održivost. Različiti sojevi laktobacila su već uveliko predmet brojnih studija, u pogledu eliminacije toksina (Zoghi et al., 2014). Najčešće su takvi sojevi okarakterisani kao probiotici. Detaljnija istraživanja ukazuju da je njihova uspešnost u realizaciji procesa dekontaminacije u najvećoj meri određena površinskim karakteristikama specifičnim za soj (Zoghi et al., 2014), među kojima je i prisustvo EPS, koji se povezuju sa većim brojem raznovrsnih funkcija. Egzopolisaharidi predstavljaju sloj polisaharida koji je slabije vezan za površinu ćelija, a može se sekretovati i u okolinu (Caggianiello et al., 2016). Važno je napomenuti da prisustvo EPS ne karakteriše sve pripadnike jedne vrste već je specifična osobina bakterijskog soja (Salazar et al., 2009; Werning et al., 2022). Zbog svoje specifične strukture i specifičnog sastava, EPS može imati važnu ulogu u adsorpciji toksičnih metala zato što negativno naelektrisane funkcionalne grupe ostvaruju elektrostatičke interakcije sa pozitivno naelektrisanim jonima metala (Pal i Paul, 2008; Shuhong et al., 2014). Iako su do sada zabeležene studije u kojima je pokazano da EPS molekuli mogu da adsorbuju jone kadmijuma u vodenom rastvoru (Polak-Berecka et al., 2014a), dalje studije u pravcu upotrebe EPS u suzbijanju štetnih efekata tog metala nisu urađene, prema našim saznanjima. Iako je neprocenjiv značaj upotrebe probiotika u medicini i farmaceutskoj industriji, sve češće se pribegava zameni živih bakterija njihovim nevijabilnim ekstraktima i produktima metabolizma, koji se označavaju kao postbiotici (Konstantinov et al., 2013; Patel i Denning, 2013). Razlozi za to se ogledaju u redukciji potencijalnih negativnih efekata po zdravlje, naročito imunokompromitovanih individua kod kojih se može javiti povišena inflamacija, i izbegavanje oslanjanja na bakterijski metabolizam (Mayorgas et al., 2021). Naime, bakterijski metabolizam može značajno da varira pri različitim sredinskim uslovima i time dovodi do upitnog ostvarenja ciljane biološke funkcije. U tom smislu, postbiotici su značajno bezbednije i efikasnije potencijalno rešenje. Imajući navedeno u vidu, rezultati ove doktorske disertacije povodom upotrebe izolovanog EPS-AN8 u *in vitro* i *in vivo* zaštiti od toksičnog delovanja kadmijuma(II) su od izuzetne važnosti.

5.1. *In vitro* mehanizmi zaštite od toksičnog delovanja kadmijuma(II) posredstvom EPS-AN8

U cilju odabira kandidata koji ispoljava najveću sposobnost vezivanja kadmijuma(II), nivo adsorpcije kadmijumovih jona je izmeren kod 8 različitih sojeva laktobacila iz BGLMM. Glavno zajedničko svojstvo testiranih sojeva je prisustvo EPS na površini ćelije. Dobijeni rezultati potvrđuju prethodne literaturne podatke da je nivo sposobnosti vezivanja jona metala specifična odlika za pojedinačne sojeve, koja varira na nivou vrste (Zhai et al., 2013). *Lactiplantibacillus plantarum*

BGAN8, jedan od sojeva sa najvećim procentom adsorbovanih jona kadmijuma(II) i kojeg odlikuje produkcija velike količine EPS (Bajic et al., 2020), je izabran za dalje analize.

Testovi vezivanja kadmijumovih jona, urađeni i za izolovani EPS-AN8, su pokazali da ti molekuli, takođe, poseduju veliki kapacitet za vezivanje jona metala u vodi. Pored toga, na osnovu variranja u procentima adsorbovanih jona nakon 24. časa, ustanovljeno je da je manja količina kadmijumovih jona reverzibilno vezana. Ova pojava je u skladu sa rezultatima iz studije tima Polack Berec (2014a), koji su prvi ukazali na prolazno, kratkotrajno smanjenje vezanih jona metala u periodu između 24 i 48 sati, a kasnije su i druge studije potvrdile (Zoghi et al., 2021).

Nakon primarnih naznaka da EPS-AN8 može biti potentan u borbi protiv štetnog efekta kadmijuma, pristupili smo njegovoj detaljnoj genetičkoj i fizičko-hemijskoj karakterizaciji.

Bioinformatičke analize sekvenciranog genoma soja *L. plantarum* BGAN8 su ukazale na organizaciju genetičkih determinanti uključenih u biosintezu EPS-AN8. U literaturi su geni odgovorni za biosintezu EPS označeni kao *cps* geni i grupisani su u klastere. Organizacija klastera je značajno varirala između sojeva laktobacila (Jiang i Yang, 2018). Uprkos tome zapaža se visoka konzervisanost gena, koja je pripisana horizontalnom transferu gena (Hidalgo-Cantabrana et al., 2014). Prema bioinformatičkoj predikciji, genetičke determinante relevantne za biosintezu EPS-AN8 su potencijalno lokalizovane na hromozomskoj (nod 8 i 17) i plazmidnoj DNK (nod 20), što je karakteristika manjeg broja genoma laktobacila koji proizvode EPS na svojoj površini. U studiji koja je obuhvatala analizu genoma 43 soja laktobacila, kod samo 7 sojeva su klasteri gena locirani i na plazmidu (Jiang i Yang, 2018). Detaljnom *in silico* analizom genoma soja BGAN8 su pronađeni geni koji kodiraju sve neophodne proteine-učesnike u biosintezi EPS-AN8, poput primarne glikoziltransferaze, proteina regulatora biosinteze EPS, flipaze, polisaharidne ko-polimeraze i pripadnika *CpsD/CpsB* familije tirozin-kinaza.

Genom soja *L. plantarum* WCFS1 je prvi sekvencirani genom laktobacila (Kleerebezem et al., 2003) sa detaljnom okarakterisanom genetičkom poleđinom proteinske mašinerije koja učestvuje u biosintezi EPS (Remus et al., 2012). Štaviše, kod soja WCFS1 je utvrđen najveći broj *cps* klastera-*cps1(A-J)*, *cps2(A-J)*, *cps3(A-J)* i *cps4(A-J)*. Navedene karakteristike čine genom soja WCFS1 najčešće korišćenim referentnim genomom za definisanje organizacije *cps* gena laktobacila. Upoređivanjem aminokiselinskih sekvenci proteina kodiranih *cps* genima soja WCFS1 i proteinskih produkata detektovanih gena od interesa soja BGAN8 bliže je određena organizacija genetičkih determinanti uključenih u biosintezu EPS-AN8. Rezultati su ukazali na odsustvo klastera *cps1* u genomu soja BGAN8, za koje je pokazano u literaturi da je najčešće odsutan (Jiang i Yang, 2018). U okviru regiona genoma soja BGAN8, veličine 36 964 bp (Nod 20), prisutna su 3 gena sa visokim procentom identičnosti genima *cps2* klastera (*cps2A-C*) koji se povezuju sa pojavom rastegljivog fenotipa kolonija i najverovatnije su odgovorni za veći deo sadržaja EPS (Lee et al., 2016). Zanimljivo je da se lokacija pomenutog regiona od interesa, u genomu AN8, na osnovu predikcionih analiza vezuje za plazmidnu DNK, za razliku od genetičkih determinanti odgovornih za biosintezu EPS soja WCFS1, koje se nalaze na hromozomskoj DNK. Međutim, ovo nije jedinstven slučaj u literaturi da su genetičke determinante odgovorne za rastegljiv fenotip prisutne na plazmidu (Zivkovic et al., 2015). U regionu Nod 20 je lokalizovan i *rfb (A-D)* operon za koji je ustanovljeno da je neophodan preduslov za biosintezu dTDP-L-ramnoze, ali i da mutacija u njemu dovodi do biosinteze EPS smanjene molekularne mase (Zivkovic et al., 2015). Klaster *cps3 (cps3A-J)* prisutan u genomu soja WCFS1 je sa visokim procentom identičnosti pronađen u genomu soja BGAN8 u okviru regiona na hromozomskoj DNK (Nod 17), dok je za klaster *cps4 (cps4A-J)* pokazan visok procenat identičnosti sa genima u okviru Nod 8. Osim što sadrži gene za kompletnu mašineriju neophodnu za biosintezu EPS, literaturni podaci ukazuju i da je klaster *cps4* visoko konzervisan i prisutan u svim sekvenciranim genomima laktobacila koji proizvode EPS, a kod nekih sojeva je i jedini prisutni *cps* klaster (Jiang i Yang, 2018). Mutante sa inaktivisanim genima u okviru *cps4* je odlikovala smanjena

količina sintetisanog EPS, ali se molekularna masa i sastav EPS nisu razlikovale u odnosu na divlji soj (engl. *wild type*) (Remus et al., 2012).

Da bismo detaljnije okarakterisali izolovan i prečišćen EPS-AN8, pomoću metode molekulskog sejanja, gasno-tečne hromatografije i analize FTIR spektra odredili smo njegove fizičko-hemijske karakteristike. Molekularna masa EPS-AN8, koja iznosi 2×10^5 Da, se uklapa u opseg molekularnih masa tipičnih za HePS koje su varirale u opsegu vrednosti od 10^4 do 10^5 Da (Nikolic et al., 2012; Sánchez et al., 2006; Tallon et al., 2003). Isto tako je i utvrđena vrednost poluprečnika rotacije ($86,65 \pm 3,46$ nm) u skladu sa literaturnim podacima za EPS drugih sojeva (Bachtarzi et al., 2020). Analiza sastava EPS-AN8 je identifikovala gradivne jedinice u vidu monosaharida glukoze, galaktoze, ramnoze i manoze. U najvećem broju analiziranih sadržaja monosaharida, koji učestvuju u formiranju HePS, su takođe identifikovani glukoza i galaktoza, kao najčešće prisutni monosaharidi (Mozzi et al., 2006). Pored glukoze i galaktoze, u literaturnim podacima je manoza treći najčešće okarakterisan monosaharid po zastupljenosti (Jiang i Yang, 2018). Međutim, u slučaju EPS-AN8 izmeren je viši nivo ramnoze, što predstavlja dodatnu potvrdu funkcionalnog *rfb(ACBD)* operona. Iako EPS najvećeg broja laktobacila karakterišu isti tipovi monosaharida, mnogo važniji uticaj na ogromnu raznolikost funkcija, koje EPS ostvaruju, ima proporcijski odnos monosaharida, naelektrisanje, prisustvo bočnih lanaca, molekularna masa, tipovi glikozidnih veza, i rigidnost molekula (Jiang i Yang, 2018; Li et al., 2014). Najizraženija traka na $1042,50 \text{ cm}^{-1}$, dobijena analizom FTIR spektra je dodatno potvrdila polisaharidnu prirodu EPS-AN8 (Dinić et al., 2018). Vrlo važno je napomenuti da su u FTIR spektru EPS-AN8 detektovana i prisustva karboksilnih, amidnih i hidroksilnih funkcionalnih grupa vezanih za monosaharide. Sve navedene funkcionalne grupe, zajedno sa postojanjem fosfatnih grupa koje mogu podleći spontanoj deprotonizaciji i doprineti povećanju kapaciteta za vezivanje (Pal i Paul, 2008), učestvuju u interakciji sa metalima i mogu objasniti jak afinitet EPS-AN8 za jone kadmijuma.

Za izučavanje *in vitro* mehanizama zaštite od toksičnosti kadmijuma, koje EPS-AN8 ostvaruje, korišćen je model diferenciranih Caco-2 ćelija. S obzirom, da je pri oralnom unosu kadmijuma prva meta njegovog štetnog efekta GIT, intestinalne epitelne ćelije, Caco-2, predstavljaju pogodan model sistem za ovu vrstu naučne studije. Osim toga, Caco-2 ćelije su intenzivno korišćene za *in vitro* testiranja širokog varijeteta supstanci u pogledu njihove sposobnosti prolaska i narušavanja intestinalne barijere, kao i definisanja mehanizama delovanja (Yee, 1997). Neretko su se podaci dobijeni na Caco-2 ćelijama podudarali sa rezultatima kasnije urađenih kliničkih studija na ljudima (Angelis i Turco, 2011). Štaviše, Caco-2 ćelije su upotrebljen model i u pređašnjim naučnim istraživanjima koji su za ciljeve imale identifikovanje mehanizama u osnovi štetnosti i samog kadmijuma(II) (Gerasimenko et al., 2016; Hyun et al., 2007; Rusanov et al., 2015).

Procenjena vrednost subtoksične koncentracije CdCl_2 , koja izaziva kaskadu štetnih promena, ali ne i smrt ćelije, je bila $50 \mu\text{mol/L}$ i u skladu je sa rezultatima drugih studija iz literature (Hyun et al., 2007; Zhai et al., 2016). Zbog navedenog je primenjena u svim eksperimenta koji su uključili rad na ćelijama.

U više navrata je konstatovano da je glavni mehanizam kadmijumom indukovane toksičnosti oksidativni stres (Genchi et al., 2020b; Rani et al., 2014). Zbog toga smo pratili aktivnost dva važna enzima uključena u oksidativni/antioksidativni odgovor ćelije. Nakon 24 sata izloženosti diferenciranih Caco-2 ćelija kadmijumu(II), zabeležena je povišena aktivnost enzima koji je esencijalan za antioksidativni balans ćelije, SOD. Promena u aktivnosti enzima je izostala pri istovremenom tretmanu ćelija kadmijumom(II) i EPS-AN8. Značajno viša aktivnost SOD pri izlaganju kadmijumu(II) i odsustvo promene pri istovremenom EPS-AN8 tretmanu se mogu objasniti različitim nivoom prisutnih ROS. Naime, imajući u vidu ulogu SOD, njegova povišena aktivnost je usko povezana sa povišenom detekcijom ROS u ćeliji (He et al., 2017; Wang et al., 2018). Na osnovu toga možemo pretpostaviti da je pri istovremenom tretmanu EPS-AN8 i kadmijuma(II), niži nivo

ROS, a samim tim i niža aktivnost enzima SOD. Štaviše, ovaj rezultat može ukazati na bolje opšte stanje ćelija omogućeno paralelnim dodatkom EPS-AN8. Dodatno, praćena je relativna ekspresija gena *NQO1* koji kodira enzim NAD(P)H dehidrogenaza, za koju je primarno pokazano da katalizuje redukciju hinona, a potom i redukciju širokog dijapazona drugih supstrata (Pey et al., 2019). Uočava se isti trend promena koji je primećen i pri testiranju aktivnosti SOD. Naime, povišena je relativna ekspresija *NQO1* na nivou transkripcije pri izlaganju samom kadmijumu(II), dok takav rezultat odsustvuje pri simultanim tretmanima EPS-AN8 i kadmijuma(II).

Pored neposredne važnosti u formiranju fizičke barijere, IEC su od izuzetnog značaja kao deo urođenog mukoznog imunskog sistema i odlikuje ih oslobađanje različitih antimikrobnih molekula, poput hemokina i citokina (Kayama et al., 2020). Krajnji cilj oslobođenih molekula je obaveštenje i aktivacija imunskog sistema o detektovanoj potencijalnoj pretnji za organizam (Allaire et al., 2018). Pokazano je da izloženost rastvoru kadmijuma dovodi do povećanja produkcije važnog proinflamatornog citokina IL-8 (Hyun et al., 2007). Uloga IL-8 se ogleda u regrutovanju neutrofila, nakon detekcije prisustva različitih inflamatornih stimulusa, koje je od značaja za suzbijanje infekcije (Baggiolini i Clark-Lewis, 1992). Međutim, u slučajevima kada se prisutni stimulus, poput kadmijuma, ne može ukloniti, prekomerno oslobađanje citokina ima nepovoljan uticaj, koji se ogleda u razarajućem efektu na okolno tkivo. Takođe, prekomerna produkcija IL-8 je pronađena i u osnovi nekih autoimunskih bolesti (Lee et al., 2017). U našoj studiji je po prvi put pokazano da istovremeni tretman ćelija kadmijumom(II) i višom koncentracijom EPS-AN8 uspešno sprečava toksični metal da izazove prekomernu relativnu ekspresiju *IL-8*, na nivou transkripcije. Familija transkripcionih faktora NFκB se smatra centralnim regulatorima inflamacije u različitim tipovima ćelija (Mitchell et al., 2016), koja poseduje svoja mesta vezivanja na promotoru gena *IL-8* (Wu et al., 1997). Rezultati studije, koja je uključivala primenu inhibitora NFκB (engl. *pyrrolidine dithiocarbamate*, PDTTC) i dirigovanu mutaciju za mesto unutar konsenzusnog elementa za vezivanje NFκB na promotoru gena *IL-8*, su ukazali da je kadmijumom indukovana transkripciona aktivacija citokina *IL-8* regulisana regulatorom NFκB (Hyun et al., 2007). Zbog svega navedenog, rezultati ove doktorske disertacije, kojima je prvi put ukazano da se pri istovremenom tretmanu nižom, odnosno, višom koncentracijom EPS-AN8, u prisustvu jona kadmijuma, ne menja nivo eksprimirane aktivne forme NFκB, predstavljaju važan korak u karakterizaciji mehanizama koji leže u osnovi sprečavanja kadmijumom izazvane inflamacije posredstvom EPS-AN8.

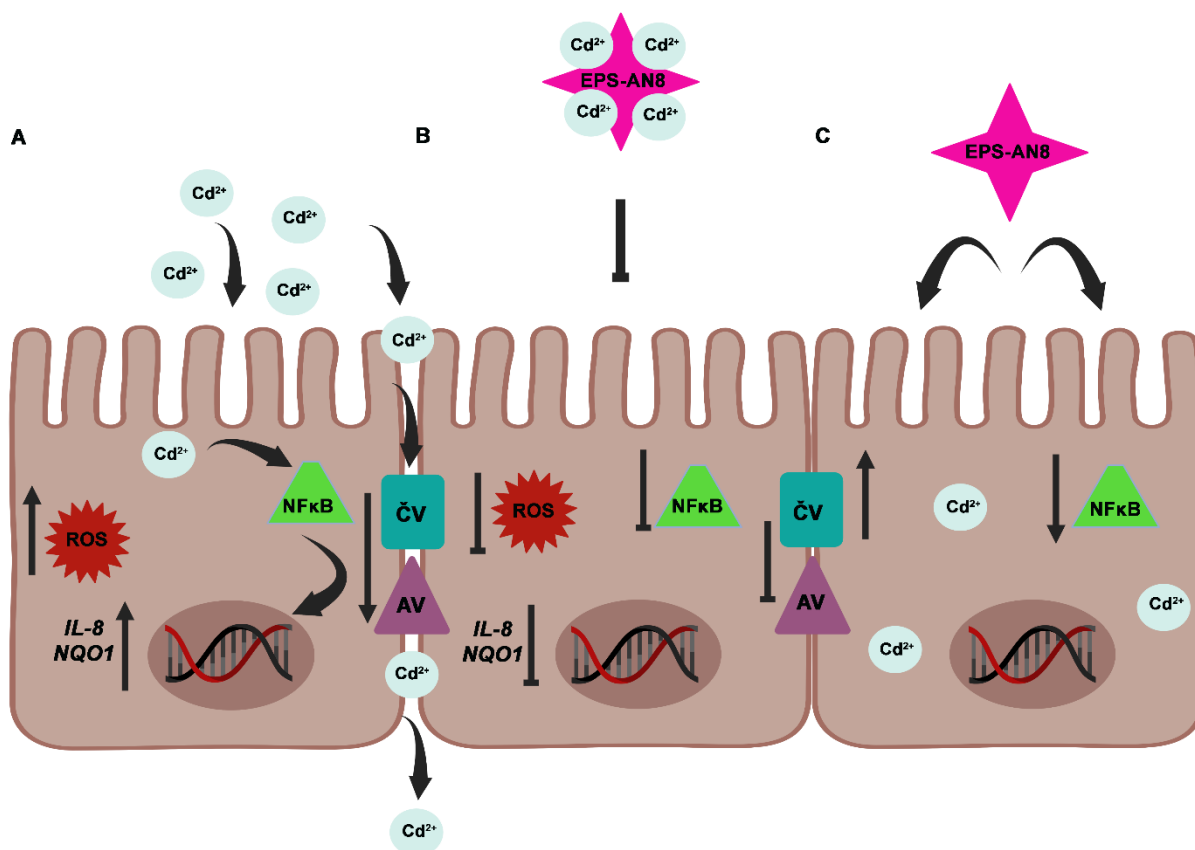
Oralno unet kadmijum uzrokuje morfološke promene u međućelijskim vezama IEC koje rezultuju povišenom propustljivošću intestinalne barijere. Na taj način joni kadmijuma obezbeđuju svoj prolazak kroz tkivo, ulazak u krvotok i posledično doprevaju do ostalih organa u kojima se akumuliraju (Tinkov et al., 2018). Iz navedenih razloga, očuvanje integriteta intestinalne barijere je od presudne važnosti. U ovoj studiji je testiran efekat na proteine adherentnih veza (lat. *zonula adherens*) i čvrstih veza. Kadmijumom(II) aktivirana prekomerna relativna ekspresija E-kadherina na nivou transkripcije, koja je u skladu sa rezultatima iz literature (Rusanov et al., 2015), izostaje pri istovremenim tretmanima EPS-AN8. Za protein E-kadherin je ustanovljen visok nivo osetljivosti u pogledu kadmijuma, koji se objašnjava postojanjem vezivnih mesta za jone kalcijuma sa kojim su joni kadmijuma u kompeticiji za vezivanje. Pri povišenoj koncentraciji jona kadmijuma i supstituciji kalcijumovih jona, onemogućena je funkcionalna aktivnost proteina, njegovo vezivanje za membranu i posledično, narušavaju se adherentne veze između ćelija (Prozialeck, 2000). Naša pretpostavka je da, povišenim nivoom transkripcije gena *CDH1*, ćelija pokušava da nadoknadi odsustvo funkcionalno ispravnog proteina. Međutim, pri izloženosti kadmijumu(II) u prisustvu EPS-AN8 uočava se izostanak takve reakcije ćelija. Iako se nakon 3 sata izloženosti kadmijumu(II) ne uočavaju promene u relativnoj ekspresiji kladina, koji učestvuje u uspostavljanju čvrstih veza, na nivou transkripcije (Rusanov et al., 2015), naša studija je demonstrirala da izloženost kadmijumu(II) u trajanju od 24 sata izaziva značajno smanjenje u njegovoj zastupljenosti na nivou proteina. Štaviše, zabeleženo smanjenje ekspresije proteina je odsutno pri istovremenoj izloženosti ćelija EPS-AN8 i kadmijumu(II). Osim toga, u cilju dodatne identifikacije funkcionalnosti stanja međućelijskih veza

diferenciranih Caco-2 ćelija, praćen je prolazak LY boje. Njen smanjen pasivni transport je finalno potvrdio bolju očuvanost i intaktnost intestinalne barijere pri istovremenom izlaganju diferenciranih Caco-2 ćelija kadmijumu(II) i EPS-AN8.

Na osnovu opisanih promena, može se zaključiti da, pri istovremenim tretmanima, EPS-AN8 ostvaruje značajan nivo *in vitro* zaštite diferenciranih Caco-2 ćelija od štetnih efekata kadmijuma, koja se ogleda u sprečavanju izazivanja oksidativnog stresa, inflamacije, i narušavanja međucelijskih veza. U osnovi ovako izraženog zaštitnog efekta može biti jaka sklonost EPS-AN8, podstaknuta njegovom strukturnom građom, za adsorpciju kadmijumovih jona, koja se pri istovremenim tretmanima može potpuno ispoljiti. Kadmijumovi joni, zarobljeni u kompleksu sa EPS-AN8, onemogućeni su da ispolje svoje mehanizme toksičnosti.

Budući da je za neke probiotički okarakterisane sojeve laktobacila (Zhai et al., 2016) pokazano da mogu terapijski da se primene u ublažavanju oštećenje koja je kadmijum(II) izazvao u HT-29 ćelijama, poput generisanja ROS, nakupljanja MDA i oslobađanja citokina IL-8, TNF- α , IL-1 β i IL-6, želeli smo da utvrdimo da li i EPS-AN8 može da nađe primenu u terapiji oštećenja prouzrokovanih ovom zagađujućom supstancom. U tu svrhu, nakon 24 sata tretmana kadmijumom(II) dodata je niža, odnosno, viša koncentracija EPS-AN8 i praćena je ekspresija proteina kludina i NF κ B. Iako se uočavaju naznake da i niža koncentracija EPS-AN8 može ublažiti nivo prisutne inflamacije u ćeliji posredstvom smanjenja ekspresije proteina p65, mnogo efikasnija je bila zaštita ostvarena višom koncentracijom EPS-AN8. Pored značajno smanjene ekspresije proteina p65 na nivo kontrole, tretman višom koncentracijom EPS-AN8 je uspešno izazvao i značajno povećanje ekspresije kludina u odnosu na tretman samim kadmijumom(II). Ovakav uticaj EPS nije jedinstven slučaj u literaturi. Štaviše, sve veći je broj studija koji je za ciljeve imao ispitivanje EPS u terapiji različitih patoloških stanja. Egzopolisaharidi soja *L. rhamnosus* GG su, takođe, u uslovima snažne inflamacije indukovane lipopolisaharidima u intestinalnim epitelnim ćelijama IPEC-J2, snizili ekspresiju proinflamatornih citokina IL-6, IL-12 i TNF- α , na nivou transkripcije (Gao et al., 2017). Autori studije su pokazali da u osnovi ovakvih efekata stoji inhibicija MAPK (engl. *Mitogen-activated protein kinases*) i NF κ B signalnog puta, kao i modulacija receptora sličnih Toll-u (engl. *Toll like receptors*, TLR). Osim pokazanog direktnog uticaja na smanjenje inflamacije, EPS može direktno uticati i na međucelijske veze. Egzopolisaharid EPS116 izolovan iz soja *L. plantarum* NCU116 kod pacova obolelih od kolitisa promovise oporavak funkcije intestinalne barijere (Zhou et al., 2018). Ovakvo delovanje EPS116 se odvija preko STAT3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) signalnog puta koji rezultira stimulacijom ekspresije proteina čvrstih veza. Uočene promene, usled delovanja EPS-AN8, koje se odvijaju u pravcu smanjenja inflamacije i oporavka međucelijskih veza mogu biti veoma važna polazna osnova za buduća ispitivanja EPS u vidu potencijalnih terapijskih molekula za izloženost toksičnim metalima.

Na osnovu navedenih rezultata, na Slici 36 su prikazani predloženi mehanizmi *in vitro* zaštitnog delovanja EPS-AN8 u borbi protiv kadmijuma(II).



Slika 36. Predloženi *in vitro* mehanizmi EPS-AN8 posredovane zaštite IEC od toksičnosti kadmijuma(II). (A) Toksičan efekat kadmijuma(II) ogledan u povišenim parametrima oksidativnog stresa, povišenoj inflamaciji i narušavanju međucelijskih veza; (B) Ostvarena zaštita od štetnog delovanja kadmijuma(II) pri simultanim tretmanima EPS-AN8, bazirana na adsorpciji kadmiju; (C) Naznake terapijskog efekta EPS-AN8 ostvarenog preko ublažavanja inflamacije i oštećenja međucelijskih veza. Skraćenice: ČV-čvrste veze; AV-adherentne veze. Slika je kreirana u programu BioRender.com

5.2. Zaštita DA pacova, posredovana EPS-AN8, od štetnih efekata produžene oralne izloženosti kadmijumu(II)

Nakon zapaženih *in vitro* rezultata, nastavljena su *in vivo* izučavanja sa ciljem ispitivanja uspešne primene EPS-AN8 i definisanja njegove uloge u zaštiti od kadmijuma.

Zbog značajne izloženosti opšte populacije povišenoj koncentraciji kadmijuma(II) posredstvom hrane i pijaće vode, u eksperimentima su životinje oralno unosile kadmijum(II), u produženom vremenskom periodu za koji je pokazano da dovodi do relevantnih toksičnih promena (Kulas et al., 2021; Ninkov et al., 2015; Tucovic et al., 2018).

EPS-AN8 je dat kroz standardnu hranu za laboratorijske pacove. S obzirom na sve veći broj naučnih studija sa definisanim ciljevima ogledanim u proizvodnji i lansiranju novih tipova funkcionalne hrane (Alongi i Anese, 2021; Topolska et al., 2021), odlučili smo se za takav pristup koji je, prema našim saznanjima, jedinstven u literaturi kada je reč o sprečavanju štetnih efekata toksičnih metala. Pod pojmom „funkcionalna hrana“ se podrazumeva sva hrana koja obezbeđuje dodatne zdravstvene dobrobiti poput podsticanja aktivnosti imunskog sistema, smanjenja rizika za nastanak kardiovaskularnih oboljenja, osteoporoze, gojaznosti ali i za poboljšanje memorije i fizičke kondicije (Kruger et al., 2012; Tahergorabi et al., 2015; Topolska et al., 2021; van Kleef et al., 2005).

Imajući u vidu značajnu i ireverzibilnu akumulaciju kadmijuma(II) u organizmu (Feng et al., 2022; Satarug et al., 2010), koja predstavlja dugoročnu pretnju po zdravstveno stanje (Wang et al., 2021), nakon završenog eksperimenta smo merili koncentraciju metala u ciljnim organima njegove

toksičnosti. Nivo deponovanog kadmijuma je praćen u bubrezima i jetri, organima koji pokazuju izraženu osetljivost na njegovo prisustvo u organizmu, kao i u duodenumu, prvom delu tankog creva koji je u dodiru sa jonima kadmijuma. S obzirom na važnu ulogu sistemske cirkulacije u distribuciji jona kadmijuma do različitih tkiva, deponovanje je analizirano i u krvi. Iz priloženih rezultata se jasno vidi da je, kroz hranu dat, EPS-AN8 uspešno smanjio akumulaciju kadmijumovih jona u bubrezima, jetri i krvi, pri unosu obe doze metala. Međutim, u duodenumu životinja koje su unosile EPS-AN8 i nižu, odnosno, višu dozu kadmijuma(II) nisu uočene značajne razlike u koncentraciji. Razlog za izostanak takvih promena može biti posledica eksperimentalne postavke. Pošto su životinje do poslednjeg dana eksperimenta unosile kadmijum(II), kao i EPS-AN8, očekivano je da u njihovom duodenumu koncentracija kadmijuma(II) bude značajna u odnosu na kadmijumom(II) netretirane životinje. Takođe, upotrebom ICP-MS moguće je detektovati i izmeriti koncentraciju kadmijuma(II) čak i ako je on prisutan u kompleksu sa EPS-AN8. U prilog EPS-AN8 posredovanog smanjenog deponovanja u tkivima stoje i rezultati analize jona metala u fecesu, gde se uočava značajno povećanje sadržaja kadmijuma što sugerira da upotreba EPS-AN8 dovodi do važnog porasta ekskrecije kadmijuma iz organizma. Navedena ispoljena svojstva EPS-AN8 se podudaraju sa okarakterisanim mehanizmima zaštite koje ostvaruju pojedini probiotici, poput soja *L. plantarum* CCFM610 čiji se doprinos u zaštiti ogleda u smanjenju deponovanja kadmijuma(II) u organizmu miševa, pri akutnom trovanju (Zhai et al., 2013). Isti soj je umanjio akumulaciju kadmijuma(II) i u telu tilapija *Oreochromis niloticus* (Zhai et al., 2017). Smanjen nivo deponovanja kadmijuma(II) usled unosa EPS-AN8 kroz hranu može biti direktna posledica izražene sklonosti EPS-AN8 ka vezivanju jona ovog toksičnog metala. Osim navedenog, za pojedine galaktooligosaharide je utvrđeno da indukuju povećanje apsorpcije esencijalnih elemenata u organizmu pacova poput kalcijuma, magnezijuma i fosfora (Pérez-Conesa et al., 2006), posredstvom direktnog efekta na promenu pH koja pospešuje njihovo usvajanje. Imajući u vidu ogromnu važnost prisustva esencijalnih elemenata (Afridi et al., 2014; Bhattacharya, 2022; Bridges i Zalups, 2005) kada je reč o ulasku jona kadmijuma u tkiva preko vezivanja za transportere dvovalentnih katjona, moguće je da EPS-AN8 ima tendenciju ispoljavanja zaštite i na taj način. Ipak, neophodna su dodatna eksperimentalna istraživanja koja bi potvrdila ovu pretpostavku.

Kako bi utvrdili da li su rezultati deponovanja kadmijuma(II) zaista pokazatelji realistične slike o generalnom stanju organa, posmatrali smo poprečne preseke duodenuma, bubrega i jetre pod svetlosnim mikroskopom. Iako se nivo izmerenog akumuliranog kadmijuma(II) u duodenumu ne razlikuje značajno između životinja koje su unosile EPS-AN8 i onih koje nisu, histološki preseki jasno ukazuju da su kod grupa pacova kojima je dat EPS-AN8 smanjeno prisustvo nepovoljnih promena uzrokovanih kadmijumom, poput narušene morfologije crevnih resica i prekida u kontinuitetu epitela. Rezultati histološke analize su jasan pokazatelj ispravnosti naše pretpostavke da u slučaju duodenuma životinja koje su paralelno unosile i EPS-AN8, detektovana koncentracija kadmijuma(II) nije relevantni odraz opšteg stanja navedenog dela gastrointestinalnog trakta, već posledica organizacije eksperimenta. Zabeleženi izostanci oštećenja bubrega i jetre ili snižen intenzitet oštećenja, kod životinja koje su pile kadmijum(II) i unosile EPS-AN8, mogu biti direktan odraz nižeg deponovanja jona kadmijuma u tim organima (Zhai et al., 2013).

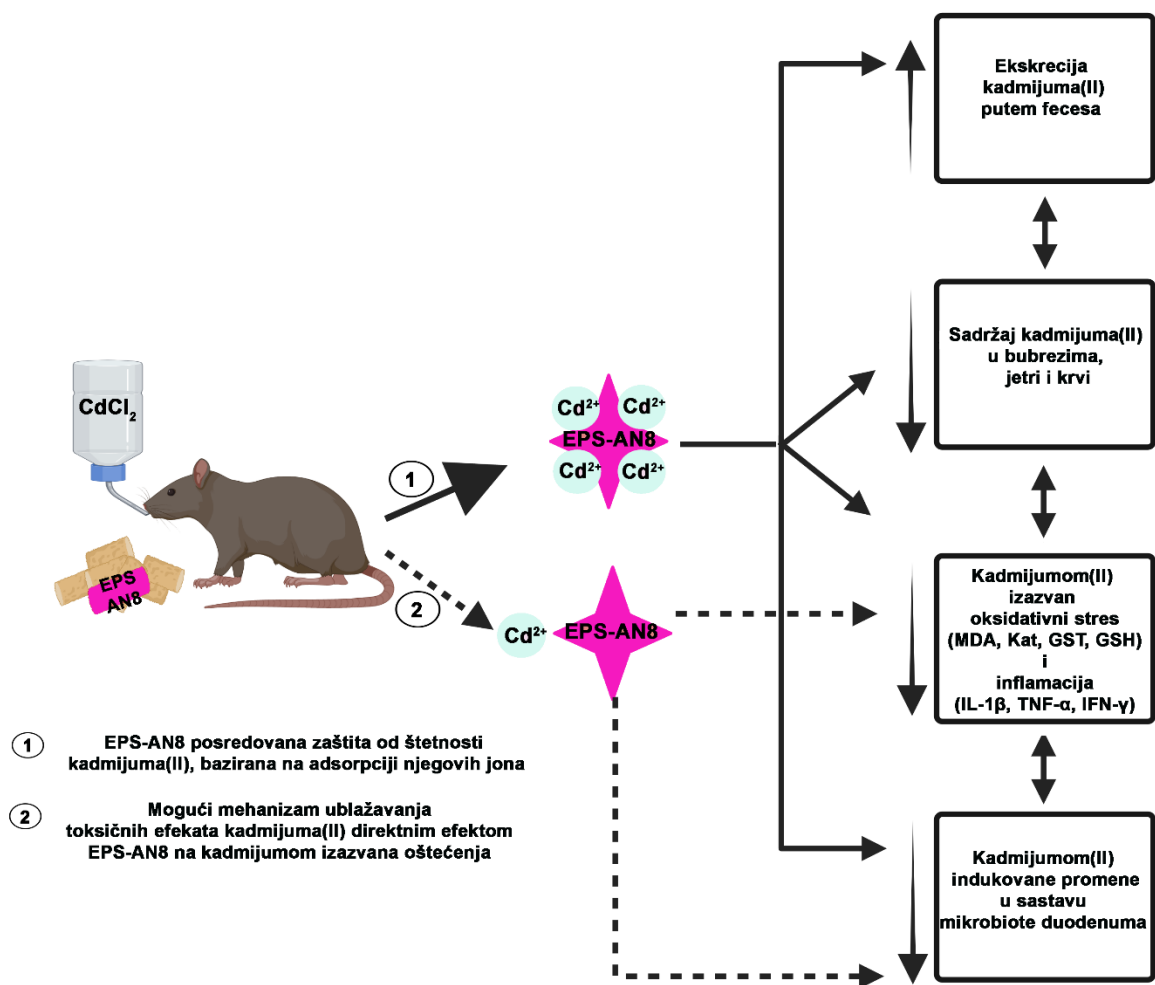
Oksidativni stres i inflamacija su povezani procesi koji se smatraju glavnim mehanizmima posredstvom kojih toksični metali ostvaruju svoj negativan uticaj (Ninkov et al., 2015; Rani et al., 2014). Za razliku od studije u kojoj je pri akutnom izlaganju kadmijumu(II) snižen nivo MDA, a povišeno prisustvo GSH i stimulirana aktivnost enzima katalaze (Zhai et al., 2013), u jetri i bubrezima, mi smo u homogenatima duodenuma životinja, koji su u produženom vremenskom periodu pili kadmijum(II), detektovali povišenu aktivnost enzima uključenih u antioksidativnu zaštitu (katalaze, GST) i nagomilavanje terminalnih proizvoda oksidativnog stresa (MDA, GSH). Uočene promene mogu predstavljati pokušaj domaćina da se izbori sa prisustvom ROS. Nakon unosa EPS-AN8 zabeležena su značajna odstupanja u promenama tipičnim za izlaganje kadmijumu(II). U prilog navedenim rezultatima je i da se pri istovremenom unosu EPS-AN8 i kadmijuma(II), ne zapažaju

značajno povišene koncentracije proinflammatoryh citokina (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) u duodenumu, koje su karakteristične za produženo, oralno izlaganje upotrebljenim dozama kadmijuma(II) (Ninkov et al., 2015). Različiti razlozi mogu biti u osnovi primećenih pojava. Primarni uzrok nižeg intenziteta oksidativnog stresa i inflamacije je verovatno smanjeno prisustvo slobodnih jona kadmijuma(II) koji se ne nalaze u kompleksu sa EPS-AN8 i koji mogu da prouzrokuju navedene patološke promene u duodenumu. Zatim, literaturni podaci ukazuju da neki EPS mogu da direktno utiču na smanjenje oksidativnog stresa i inflamacije u organizmu izazvanih delovanjem različitih stimulusa. Egzopolisaharid poreklom iz soja *L. plantarum* IJH-SONE68 je omogućio poboljšanje kliničke slike miševa obolelih od kontaktnog dermatitisa tako što je uspešno inhibirao prekomernu produkciju citokina IL-4 i aktivnost enzima hijaluronidaze koji podstiče inflamatornu reakciju (Noda et al., 2019). Dodatno, oralna primena istog EPS je smanjila prekomernu ekspresiju inflamatornog proteina makrofaga 2, mišjeg analoga humanog proinflammatoryh citokina IL-8, dok je pospešila oslobađanje imunomodulatornog citokina IL-10, u miševima sa indukovanim ulceroznim kolitisom (Noda et al., 2021). Osim toga, utvrđeno je da EPS izolovan iz soja *L. helveticus* MB2-1 ima izraženu aktivnost u uklanjanju slobodnih radikala (Li et al., 2014).

Brojne studije koje su se bavile izučavanjem nepovoljnog delovanja oralno unetog kadmijuma(II) su ukazale na njegov neposredni uticaj na crevnu mikrobiotu koji se najčešće ogledao u promeni njenog sastava (Li et al., 2019; Yang et al., 2021). Ipak, izmene u zastupljenosti bakterijskih taksona nisu konzistentne u literaturi. Visok nivo nepodudaranja može biti posledica različite mikrobiote creva eksperimentalnih životinja različitih dobavljača, uslova u uzgajivačnicama i lokalizacije crevne mikrobiote (npr. feces, slepo crevo) koji su korišćeni za analizu (Richardson et al., 2018). Dodatno, značajno je napomenuti da čak i različite forme kadmijuma, poput kadmijum-hlorida, kadmijum-glutationa, kadmijum-citrata i kadmijum-metalotionena, korišćene u eksperimentima rezultuju drugačijim promenama u crevnoj mikrobioti miša (Zhu et al., 2021). Zbog svega navedenog, u ovoj doktorskoj disertaciji smo pristupili i analizi dela crevne mikrobiote prisutne u duodenumu DA pacova. Odsustvo statistički značajnih promena pri poređenju vrednosti alfa diverziteta svake grupe je u skladu sa rezultatima studije koja je pratila rani odgovor mikrobiote pacova na unošenje rastvora kadmijuma (Richardson et al., 2018). Anosim testom je utvrđeno da je variranje između grupa izraženije nego unutar grupa, dok su rezultati Adonis analize ukazali na stepen različitosti detektovanih OTU. U razdelima Firmicutes i Bacteroidetes je zabeleženo najviše promena prouzrokovanih produženim, oralnim unosom kadmijuma(II). Obe doze kadmijuma(II) su redukovale relativnu zastupljenost laktobacila, potvrdivši rezultate iz literature (He et al., 2020; Ninkov et al., 2016; Tinkov et al., 2018). Paralelni unos EPS-AN8 je sprečio pojavu navedenog efekta kadmijuma(II). Uzevši u obzir sve zdravstvene benefite prisustva laktobacila u GIT-u (O'Callaghan i O'Toole, 2013), zapaženo dejstvo sugerise da dodatak EPS-AN8 u hrani ostvaruje značajnu ulogu i u zaštiti ovih vrlo važnih komensalnih bakterijskih predstavnika mikrobiote. Štaviše, obe doze kadmijuma(II) su favorizovale povećanje brojnosti pripadnika roda *Blautia* i roda *Dubosiella*. Premda se pojedini predstavnici roda *Dubosiella* u literaturi povezuju sa korisnim ulogama u smanjenju inflamacije i oksidativnog stresa (Liu et al., 2023), pripadnici roda *Blautia* su karakteristični za mikrobiotu starijih individua sa detektovanim poremećajima u metabolizmu glukoze (Motiani et al., 2020). Zbog navedenog svojstva su često označeni kao markeri preddijabetičnog stanja i dijabetesa tipa 2 (T2D) (Motiani et al., 2020). Ovaj podatak je posebno važan imajući u vidu sve češće povezivanje T2D i kadmijuma, preko njegove etiološke uloge u vidu sredinskog kontaminanta, u progresiji navedenog oboljenja (Jeon et al., 2015; Li et al., 2019). Kroz hranu unet EPS-AN8, pri izlaganju obema dozama kadmijuma(II), je u potpunosti sprečio promenu u relativnoj brojnosti rodova *Dubosiella* i *Blautia*. Niža doza kadmijuma (II) je stimulisala i namnožavanje pripadnika roda *Ruminococcus*, čija zastupljenost, takođe, pozitivno koreliše sa T2D (Gurung et al., 2020) i roda *Roseburia*, kojeg, pak, odlikuju predstavnici sa potencijalnom ulogom u ublažavanju patoloških stanja organizma domaćina (Tamanai-Shacoori et al., 2017). U ovoj doktorskoj disertaciji, promene u zastupljenosti rodova u okviru razdela Bacteroidetes, se ogledaju u značajnom porastu brojnosti pripadnika *Prevotella*, *Alloprevotella* i *Bacteroides* nakon produžene, oralne izloženosti nižoj dozi

kadmijuma(II). Slična tendencija se uočava i pri izlaganju višoj dozi kadmijuma(II), ali bez statističke značajnosti tih promena. Predstavnici roda *Prevotella* se najčešće opisuju kao promotori inflamacije i oboljenja spregnutih sa njom poput ulceroznog kolitisa i reumatoidnog artritisa (Larsen, 2017; Ley, 2016). S druge strane, pripadnici roda *Alloprevotella* su pronađeni u visokom broju u tkivu oralnog karcinoma skvamoznih ćelija (Zhang et al., 2019). Štaviše, njihova zastupljenost pozitivno koreliše sa težinom kliničke slike kod pacijenata sa hroničnim oboljenjem bubrega (Li et al., 2019), što je posebno zanimljivo osvrnuvši se na uticaj deponovanja jona kadmijuma i razvoj ove bolesti (Ferraro et al., 2010; Orr i Bridges, 2017). Vrste roda *Bacteroides* su oportunistički patogeni koji degraduju mucin i izazivaju oštećenje intestinalne barijere i okolnog tkiva (Zafar i Saier, 2021). Sve navedene promene u zastupljenosti pripadnika razdela Bacteroidetes pri produženoj oralnoj izloženosti kadmijumu(II), nisu zabeležene u prisustvu EPS-AN8, što dodatno potvrđuje njegov efekat na sprečavanje ostvarivanja kadmijumom izazvanih promena u mikrobioti duodenuma. Pokazane promene u relativnoj zastupljenosti pojedinih rodova su podržane i LefSe analizom koja je otkrila relevantne markere različitosti/diverziteta upoređenih grupa. Vrsta *Prevotella copri*, poznata po naseljavanju crevnog trakta miševa sa indukovanim kolitisom (Scher et al., 2013), se izdvojila kao jedan od diferencijalnih markera u mikrobioti duodenuma pacova izloženih nižoj dozi kadmijuma(II). Ista vrsta je detektovana i za višu dozu kadmijuma(II). Vrsta *Pseudomonas veronni* se izdvojila kao marker životinja tretiranih nižom dozom kadmijuma, ali i višom dozom pri unošenju EPS-AN8. Zanimljivo je da ova nepatogena bakterija pokazuje obećavajući potencijal za prečišćavanje otpadnih voda od sadržaja bakra i kadmijuma (Busnelli et al., 2021). Moguće je da mikrosredina duodenuma kod životinja, u kojoj je prisutna niža koncentracija jona kadmijuma(II), favorizuje razmnožavanje *P. veronni*. Marker grupe koja je pila nižu dozu kadmijuma(II) i paralelno unosila EPS-AN8 je *Akkermansia muciniphila*. *A. muciniphila* je bakterijska vrsta koja važi za obećavajućeg kandidata probiotika buduće generacije, za koju je pokazano da poboljšava funkcionalnost intestinalne barijere i povećava produkciju mucina u kolonu (Zhai et al., 2019). Takođe, za istu vrstu je ustanovljeno da njeno prisustvo negativno koreliše sa povišenim oksidativnim stresom i inflamacijom u debelom crevu (Feng et al., 2019). Njeno prisustvo je u skladu sa detektovanim smanjenim nivoom oksidativnog stresa i inflamacije u duodenumu životinja koje su unosile nižu dozu kadmijuma i EPS-AN8.

Rezultati naše studije ukazuju na važnu ulogu unošenja hrane obogaćene EPS-AN8 u zaštiti od štetnih efekata produžene, oralne izloženosti nižoj, odnosno, višoj dozi kadmijuma(II). Na osnovu postignutih rezultata predložena su dva molekularna mehanizma odgovorna za ostvarene zaštitne efekte EPS-AN8 (Slika 37). Prvi zaštitni mehanizam je baziran na važnoj sposobnosti adsorpcije kadmijumovih jona, za koju je i u literaturi pokazano da ima presudnu ulogu u ostvarivanju zaštite od toksičnih metala (Yi et al., 2017; Zhai et al., 2016). Formiranje kompleksa EPS-AN8 i kadmijumovih jona rezultuje u sprečavanju dalje distribucije metala u organizmu, njegovoj povišenoj ekskreciji, redukovanim parametrima oksidativnog stresa i inflamacije, kao i ublažavanju histoloških oštećenja duodenuma, bubrega i jetre, i sprečavanju promena u sastavu mikrobiote duodenuma prouzrokovanih kadmijumom. Drugi mehanizam podrazumeva direktan efekat EPS-AN8 na oporavak testiranih parametara, nezavisan od afiniteta EPS-AN8 za vezivanje kadmijumovih jona. U prilog takvom mehanizmu stoje rezultati *in vitro* dela studije koje ukazuju na potencijalnu ulogu EPS-AN8 u oporavku narušenih međucelijskih veza i snižavanju inflamacije. Ipak, bitno je naglasiti, da su za potvrdu drugog mehanizma neophodne dodatne studije.



Slika 37. Predloženi mehanizmi ostvarene EPS-AN8 zaštite od štetnih efekata produženog, oralnog unošenja kadmijuma(II). Skrećenica: Kat-katalaza. Slika je kreirana u programu BioRender.com

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu predstavljenih rezultata u okviru ove doktorske teze izvedeni su sledeći zaključci:

➤ **EPS-AN8 ostvaruje *in vitro* zaštitu diferenciranih Caco-2 ćelija od toksičnih efekata kadmijuma(II).**

1. Za osam sojeva laktobacila, koje je odlikovalo prisustvo EPS, je testirana adsorpcija jona kadmijuma u vodi. Nakon sat vremena inkubacije sa rastvorom kadmijuma, sojevi *L. plantarum* BGAN8, *L. plantarum* BGV2A-18 i *L. plantarum* BGP22 su vezali preko 90 % prisutnih jona ove zagađujuće supstance. Procenat kadmijumovih jona prisutnih u kompleksu sa EPS-AN8 je varirao u opsegu između 64 i 78 %, u toku 24 sata, ukazujući na reverzibilnu adsorpciju dela jona.

2. Bioinformatičkom analizom skvenciranog genoma soja *L. plantarum* BGAN8 su identifikovane genetičke determinante odgovorne za biosintezu EPS-AN8 sa visokom verovatnoćom lokalizacije na hromozomskoj, ali i plazmidnoj DNK. Upoređivanjem aminokiselinskih sekvenci proteinskih produkata, utvrđeno je prisustvo početna tri gena klastera *cps2*, odgovorna za rastegljiv fenotip EPS-AN8 i kompletni klasteri *cps3* i *cps4*.

3. EPS-AN8 je heteropolisaharid, molekularne mase 2×10^5 Da, izgrađen iz monosaharida glukoze, galaktoze, ramnoze i manoze. Analizom FTIR spektra je potvrđena polisaharidna priroda i detektovane su bočne, negativno naelektrisane, funkcionalne grupe koje podstiču afinitet za elektrostatičke interakcije sa pozitivno naelektrisanim jonima kadmijuma.

4. U prisustvu EPS-AN8 nije zabeležena kadmijumom indukovana povišena aktivnost enzima SOD, ni povišena ekspresija gena NQO1, što ukazuje na smanjeno prisustvo oksidativnog stresa u diferenciranim Caco-2 ćelijama.

5. Niža koncentracija EPS-AN8 ublažava pojavu inflamacije izazvane kadmijumom(II) u diferenciranim Caco-2 ćelijama, dok viša koncentracija u potpunosti sprečava promenu u relativnoj ekspresiji proinflamatornog citokina IL-8, na nivou transkripcije i jedarne forme NFκB, na nivou ekspresije proteina.

6. Primena niže, odnosno, više koncentracije EPS-AN8, u toku istovremenog tretmana sa kadmijumom(II), je uspešno zaštitila ćelije od kadmijumovog efekta koji se ogleda u narušavanju međućelijskih veza i povećanju propustljivosti intestinalno-epitelne barijere. Obe koncentracije su efikasno sprečile promene u nivou prolaska pasivne boje, kadmijumom stimulisano relativnu ekspresiju gena *CDH1* i smanjenu aktivnost kladina.

7. Terapijskom primenom EPS-AN8, nakon ostvarenog štetnog učinka jona kadmijuma u diferenciranim Caco-2 ćelijama, je demonstriran značaj EPS-AN8 u potencijalnom oporavku narušenih čvrstih veza posredstvom povećanja ekspresije kladina i ublažavanju inflamacije preko smanjenja ekspresije NFκB na nivo kontrole.

➤ **EPS-AN8 štiti DA pacove od štetnih efekata produžene oralne izloženosti kadmijumu(II).**

1. Kroz hranu unet EPS-AN8 dovodi do smanjenog deponovanja jona kadmijuma u bubrezima, jetri i krvi. U fecesu takvih životinja je uočen značajan porast koncentracije kadmijuma, što ukazuje na važnu ulogu EPS-AN8 u povećanoj ekskreciji toksičnog metala iz organizma.

2. Na mikrografijama poprečnih preseka duodenuma, bubrega i jetre DA pacova koji su unosili EPS-AN8 i pili nižu dozu rastvora kadmijuma su zabeležena odsustva histopatoloških oštećenja, dok se pri izlaganju višoj dozi kadmijuma(II) i EPS-AN8 uočava smanjen stepen oštećenja.
3. Paralelni unos EPS-AN8 je u duodenumu životinja značajno ublažio kadmijumom(II) izazvane promene u oksidativnom stresu, ogledane u povišenoj aktivnosti enzima katalaze i nakupljanju malondialdehida.
4. Pri produženoj oralnoj izloženosti životinja nižoj, odnosno, višoj dozi rastvora kadmijuma, zabeležen je značajan zaštitni efekat EPS-AN8 na sprečavanje porasta inflamacije, prouzrokovane štetnom aktivnošću kadmijuma, koja je rezultat povišene koncentracije najvažnijih proinflamatornih citokina u homogenatima duodenuma.
5. Karakteristične promene u sastavu mikrobiote duodenuma za produženi, oralni unos kadmijuma(II), poput porasta brojnosti oportunističkih patogenih bakterija i bakterija čiji je rast favorizovan prisustvom inflamacije u mikrosredini, kao i smanjena relativna zastupljenost laktobacila, su izostale pri paralelnom unosu EPS-AN8.

7. LITERATURA

- Abbas, A.K., 2020. Basic immunology: functions and disorders of the immune system, Sixth edition. ed. Elsevier, Philadelphia, PA.
- Abdel-Megeed, R.M., 2021. Probiotics: a Promising Generation of Heavy Metal Detoxification. *Biol. Trace Elem. Res.* 199, 2406–2413. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02350-1>
- Afridi, H.I., Kazi, T.G., Talpur, F.N., Kazi, A., Arain, S.S., Arain, S.A., Brahman, K.D., Panhwar, A.H., Naeemullah, null, Shezadi, M., Ali, J., 2014. Interaction between essential elements selenium and zinc with cadmium and mercury in samples from hypertensive patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 160, 185–196. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0048-y>
- Akerstrom, M., Sallsten, G., Lundh, T., Barregard, L., 2013. Associations between urinary excretion of cadmium and proteins in a nonsmoking population: renal toxicity or normal physiology? *Environ. Health Perspect.* 121, 187–191. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205418>
- Al Osman, M., Yang, F., Massey, I.Y., 2019. Exposure routes and health effects of heavy metals on children. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 32, 563–573. <https://doi.org/10.1007/s10534-019-00193-5>
- Al-Dhaheri, A.S., Al-Hemeiri, R., Kizhakkayil, J., Al-Nabulsi, A., Abushelaibi, A., Shah, N.P., Ayyash, M., 2017. Health-promoting benefits of low-fat akawi cheese made by exopolysaccharide-producing probiotic *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk. *J. Dairy Sci.* 100, 7771–7779. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12761>
- Allaire, J.M., Crowley, S.M., Law, H.T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., Vallance, B.A., 2018. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* 39, 677–696. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>
- Allam-Ndoul, B., Castonguay-Paradis, S., Veilleux, A., 2020. Gut Microbiota and Intestinal Trans-Epithelial Permeability. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6402. <https://doi.org/10.3390/ijms21176402>
- Alongi, M., Anese, M., 2021. Re-thinking functional food development through a holistic approach. *J. Funct. Foods* 81, 104466. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104466>
- Amara, S., Abdelmelek, H., Garrel, C., Guiraud, P., Douki, T., Ravanat, J.-L., Favier, A., Sakly, M., Ben Rhouma, K., 2008. Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. *J. Reprod. Dev.* 54, 129–134. <https://doi.org/10.1262/jrd.18110>
- Andersen, O., Nielsen, J.B., Svendsen, P., 1988. Oral cadmium chloride intoxication in mice: diethyldithiocarbamate enhances rather than alleviates acute toxicity. *Toxicology* 52, 331–342. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(88\)90137-0](https://doi.org/10.1016/0300-483x(88)90137-0)
- Andoh, A., Nishida, A., Takahashi, K., Inatomi, O., Imaeda, H., Bamba, S., Kito, K., Sugimoto, M., Kobayashi, T., 2016. Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 59, 65–70. <https://doi.org/10.3164/jcfn.15-152>
- Angelin, J., Kavitha, M., 2020. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *Int. J. Biol. Macromol.* 162, 853–865. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190>
- Angelis, I.D., Turco, L., 2011. Caco-2 cells as a model for intestinal absorption. *Curr. Protoc. Toxicol.* Chapter 20, Unit20.6. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2006s47>
- Angrisano, T., Pero, R., Peluso, S., Keller, S., Sacchetti, S., Bruni, C.B., Chiariotti, L., Lembo, F., 2010. LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC Microbiol.* 10, 172. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-172>
- Arredondo-Alonso, S., Rogers, M.R.C., Braat, J.C., Verschuuren, T.D., Top, J., Corander, J., Willems, R.J.L., Schürch, A.C., 2018. mlplasmids: a user-friendly tool to predict plasmid- and chromosome-derived sequences for single species. *Microb. Genomics* 4, e000224. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000224>
- Authority (EFSA), E.F.S., 2009. Cadmium in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* 7, 980. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.980>
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>

- Bachtarzi, N., Speciale, I., Kharroub, K., De Castro, C., Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., 2020. Selection of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus Plantarum* (*Lactiplantibacillus Plantarum*) Isolated from Algerian Fermented Foods for the Manufacture of Skim-Milk Fermented Products. *Microorganisms* 8, E1101. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081101>
- Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P., 2011. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 29, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.011>
- Baggiolini, M., Clark-Lewis, I., 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 307, 97–101. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80909-z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80909-z)
- Bajic, S.S., Cañas, M.-A., Tolinacki, M., Badia, J., Sánchez, B., Golic, N., Margolles, A., Baldomá, L., Ruas-Madiedo, P., 2020. Proteomic profile of extracellular vesicles released by *Lactiplantibacillus plantarum* BGAN8 and their internalization by non-polarized HT29 cell line. *Sci. Rep.* 10, 21829. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78920-z>
- Bennet, S.M.P., Ohman, L., Simren, M., 2015. Gut microbiota as potential orchestrators of irritable bowel syndrome. *Gut Liver* 9, 318–331. <https://doi.org/10.5009/gnl14344>
- Bernhard, D., Rossmann, A., Henderson, B., Kind, M., Seubert, A., Wick, G., 2006. Increased serum cadmium and strontium levels in young smokers: effects on arterial endothelial cell gene transcription. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 833–838. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000205616.70614.e5>
- Bernhoft, R.A., 2013. Cadmium toxicity and treatment. *ScientificWorldJournal* 2013, 394652. <https://doi.org/10.1155/2013/394652>
- Betrapally, N.S., Gillevet, P.M., Bajaj, J.S., 2016. Changes in the Intestinal Microbiome and Alcoholic and Nonalcoholic Liver Diseases: Causes or Effects? *Gastroenterology* 150, 1745–1755.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.073>
- Bhakta, J.N., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K., Wei, M.Q., 2012. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *J. Appl. Microbiol.* 112, 1193–1206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05284.x>
- Bhattacharya, S., 2022. Protective Role of the Essential Trace Elements in the Obviation of Cadmium Toxicity: Glimpses of Mechanisms. *Biol. Trace Elem. Res.* 200, 2239–2246. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02827-7>
- Bhattacharyya, M.H., Whelton, B.D., Peterson, D.P., Carnes, B.A., Moretti, E.S., Toomey, J.M., Williams, L.L., 1988. Skeletal changes in multiparous mice fed a nutrient-sufficient diet containing cadmium. *Toxicology* 50, 193–204. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(88\)90091-1](https://doi.org/10.1016/0300-483x(88)90091-1)
- Bimonte, V.M., Besharat, Z.M., Antonioni, A., Cella, V., Lenzi, A., Ferretti, E., Migliaccio, S., 2021. The endocrine disruptor cadmium: a new player in the pathophysiology of metabolic diseases. *J. Endocrinol. Invest.* 44, 1363–1377. <https://doi.org/10.1007/s40618-021-01502-x>
- Bishak, Y.K., Payahoo, L., Osatdrahimi, A., Nourazarian, A., 2015. Mechanisms of cadmium carcinogenicity in the gastrointestinal tract. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 16, 9–21. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.1.9>
- Brdarić, E., 2016. Uloga egzopolisaharida mlečnokiselinskih bakterija u zaštiti Caco-2 ćelija od štetnog delovanja kadmijuma, Master teza. ed. Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 274–308. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.007>
- Brzóška, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 39, 967–980. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(01\)00048-5](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(01)00048-5)
- Busnelli, M.P., Lazzarini Behrmann, I.C., Ferreira, M.L., Candal, R.J., Ramirez, S.A., Vullo, D.L., 2021. Metal-*Pseudomonas veronii* 2E Interactions as Strategies for Innovative Process Developments in Environmental Biotechnology. *Front. Microbiol.* 12, 622600. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.622600>
- Cadmium and cadmium compounds, 1993. . IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 58, 119–237.

- Caggianiello, G., Kleerebezem, M., Spano, G., 2016. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3877–3886. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7471-2>
- Camilleri, M., Gorman, H., 2007. Intestinal permeability and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 19, 545–552. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2007.00925.x>
- Canada, A.T., Calabrese, E.J., 1989. Superoxide dismutase: its role in xenobiotic detoxification. *Pharmacol. Ther.* 44, 285–295. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(89\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0163-7258(89)90068-5)
- Cannino, G., Ferruggia, E., Luparello, C., Rinaldi, A.M., 2009. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 9, 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.08.009>
- Chan, O.Y., Tan, K.T., Kwok, S.F., Chio, L.F., 1982. Study on workers exposed to cadmium in alkaline storage battery manufacturing and PVC compounding. *Ann. Acad. Med. Singapore* 11, 122–129.
- Chen, C., Xun, P., Nishijo, M., Sekikawa, A., He, K., 2015. Cadmium exposure and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies and case-control studies among individuals without occupational exposure history. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 17465–17474. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5464-9>
- Choi, J.-H., Rhee, I.-K., Park, Keun-Yong, Park, Kun-Young, Kim, J.-K., Rhee, S.-J., 2003. Action of green tea catechin on bone metabolic disorder in chronic cadmium-poisoned rats. *Life Sci.* 73, 1479–1489. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00433-8](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00433-8)
- Choi, S.M., Yang, L., Chang, Y., Chu, I.K., Dong, N., 2022. Study of the Efficacy of Probiotic Bacteria to Reduce Acrylamide in Food and In Vitro Digestion. *Foods Basel Switz.* 11, 1263. <https://doi.org/10.3390/foods11091263>
- Ciobanu, C., Slencu, B.G., Cuciureanu, R., 2012. Estimation of dietary intake of cadmium and lead through food consumption. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi* 116, 617–623.
- Clayburgh, D.R., Shen, L., Turner, J.R., 2004. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 84, 282–291. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700050>
- Clevers, H., 2013. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 154, 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.004>
- Coates, J., 2006. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5606>
- Corbrjidge, D., 2007. Infrared Analysis of Phosphorous Compounds. *J. Appl. Chem.* 6, 456–465. <https://doi.org/10.1002/jctb.5010061007>
- Crosnier, C., Stamataki, D., Lewis, J., 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7, 349–359. <https://doi.org/10.1038/nrg1840>
- Cui, Z.-G., Ahmed, K., Zaidi, S.F., Muhammad, J.S., 2021. Ins and outs of cadmium-induced carcinogenesis: Mechanism and prevention. *Cancer Treat. Res. Commun.* 27, 100372. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100372>
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A.R., Munters, E., Artois, T.J., Nawrot, T., Vangronsveld, J., Smeets, K., 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 23, 927–940. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9329-x>
- Daisley, B.A., Monachese, M., Trinder, M., Bisanz, J.E., Chmiel, J.A., Burton, J.P., Reid, G., 2019. Immobilization of cadmium and lead by *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mitigates apical-to-basolateral heavy metal translocation in a Caco-2 model of the intestinal epithelium. *Gut Microbes* 10, 321–333. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1526581>
- D’Amelio, P., Sassi, F., 2018. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcif. Tissue Int.* 102, 415–425. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0331-y>

- Dang, A.T., Marsland, B.J., 2019. Microbes, metabolites, and the gut-lung axis. *Mucosal Immunol.* 12, 843–850. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0160-6>
- Das, D., Baruah, R., Goyal, A., 2014. A food additive with prebiotic properties of an α -D-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *Int. J. Biol. Macromol.* 69, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.029>
- Davis, T.A., Volesky, B., Mucci, A., 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res.* 37, 4311–4330. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00293-8)
- de Freitas, G.R., da Silva, M.G.C., Vieira, M.G.A., 2019. Biosorption technology for removal of toxic metals: a review of commercial biosorbents and patents. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26, 19097–19118. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05330-8>
- De Vuyst, L., Degeest, B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 153–177. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x>
- Deng, Y., Wang, H., Zhou, J., Mou, Y., Wang, G., Xiong, X., 2018. Patients with Acne Vulgaris Have a Distinct Gut Microbiota in Comparison with Healthy Controls. *Acta Derm. Venereol.* 98, 783–790. <https://doi.org/10.2340/00015555-2968>
- Diaz, D., Ujueta, F., Mansur, G., Lamas, G.A., Navas-Acien, A., Arenas, I.A., 2021. Low-Level Cadmium Exposure and Atherosclerosis. *Curr. Environ. Health Rep.* 8, 42–53. <https://doi.org/10.1007/s40572-021-00304-w>
- Dinić, M., Lukić, J., Djokić, J., Milenković, M., Strahinić, I., Golić, N., Begović, J., 2017. *Lactobacillus fermentum* Postbiotic-induced Autophagy as Potential Approach for Treatment of Acetaminophen Hepatotoxicity. *Front. Microbiol.* 8, 594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00594>
- Dinić, M., Pecikoza, U., Djokić, J., Stepanović-Petrović, R., Milenković, M., Stevanović, M., Filipović, N., Begović, J., Golić, N., Lukić, J., 2018. Exopolysaccharide Produced by Probiotic Strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 Reduces Inflammatory Hyperalgesia in Rats. *Front. Pharmacol.* 9, 1. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00001>
- Djukić-Cosić, D., Ninković, M., Malicević, Z., Matović, V., Soldatović, D., 2007. Effect of magnesium pretreatment on reduced glutathione levels in tissues of mice exposed to acute and subacute cadmium intoxication: a time course study. *Magnes. Res.* 20, 177–186.
- Djurasevic, S., Jama, A., Jasnica, N., Vujovic, P., Jovanovic, M., Mitic-Culafic, D., Knezevic-Vukcevic, J., Cacic-Milosevic, M., Ilijevic, K., Djordjevic, J., 2017. The Protective Effects of Probiotic Bacteria on Cadmium Toxicity in Rats. *J. Med. Food* 20, 189–196. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0090>
- Doron, S., Snyderman, D.R., 2015. Risk and safety of probiotics. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 60 Suppl 2, S129–134. <https://doi.org/10.1093/cid/civ085>
- Dumkova, J., Vrlikova, L., Vecera, Z., Putnova, B., Docekal, B., Mikuska, P., Fictum, P., Hampl, A., Buchtova, M., 2016. Inhaled Cadmium Oxide Nanoparticles: Their in Vivo Fate and Effect on Target Organs. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 874. <https://doi.org/10.3390/ijms17060874>
- Durack, J., Kimes, N.E., Lin, D.L., Rauch, M., McKean, M., McCauley, K., Panzer, A.R., Mar, J.S., Cabana, M.D., Lynch, S.V., 2018. Delayed gut microbiota development in high-risk for asthma infants is temporarily modifiable by *Lactobacillus* supplementation. *Nat. Commun.* 9, 707. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03157-4>
- Elamin, E., Jonkers, D., Juuti-Uusitalo, K., van Ijzendoorn, S., Troost, F., Duimel, H., Broers, J., Verheyen, F., Dekker, J., Masclee, A., 2012. Effects of ethanol and acetaldehyde on tight junction integrity: in vitro study in a three dimensional intestinal epithelial cell culture model. *PloS One* 7, e35008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035008>
- Elonheimo, H.M., Mattila, T., Andersen, H.R., Bocca, B., Ruggieri, F., Haverinen, E., Tolonen, H., 2022. Environmental Substances Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease-A Scoping Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19, 3945. <https://doi.org/10.3390/ijerph19073945>
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventós, R.M., Serra-Majem, L., Pintó, X.,

- Basora, J., Muñoz, M.A., Sorlí, J.V., Martínez, J.A., Fitó, M., Gea, A., Hernán, M.A., Martínez-González, M.A., PREDIMED Study Investigators, 2018. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N. Engl. J. Med.* 378, e34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800389>
- Fagerberg, B., Barregard, L., 2021. Review of cadmium exposure and smoking-independent effects on atherosclerotic cardiovascular disease in the general population. *J. Intern. Med.* 290, 1153–1179. <https://doi.org/10.1111/joim.13350>
- Farhadi, A., Banan, A., Fields, J., Keshavarzian, A., 2003. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 479–497. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2003.03032.x>
- Fazeli, M., Hassanzadeh, P., Alaei, S., 2011. Cadmium chloride exhibits a profound toxic effect on bacterial microflora of the mice gastrointestinal tract. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 152–159. <https://doi.org/10.1177/09603271110369821>
- Felley, C.P., Corthésy-Theulaz, I., Rivero, J.L., Sipponen, P., Kaufmann, M., Bauerfeind, P., Wiesel, P.H., Brassart, D., Pfeifer, A., Blum, A.L., Michetti, P., 2001. Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 25–29. <https://doi.org/10.1097/00042737-200101000-00005>
- Feng, S., Liu, Y., Huang, Y., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., Chen, W., 2019. Influence of oral administration of *Akkermansia muciniphila* on the tissue distribution and gut microbiota composition of acute and chronic cadmium exposure mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 366, fnz160. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz160>
- Feng, X., Zhou, R., Jiang, Q., Wang, Y., Yu, C., 2022. Analysis of cadmium accumulation in community adults and its correlation with low-grade albuminuria. *Sci. Total Environ.* 834, 155210. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155210>
- Ferramola, M.L., Pérez Díaz, M.F.F., Honoré, S.M., Sánchez, S.S., Antón, R.I., Anzulovich, A.C., Giménez, M.S., 2012. Cadmium-induced oxidative stress and histological damage in the myocardium. Effects of a soy-based diet. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 265, 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.09.009>
- Ferraro, P.M., Costanzi, S., Naticchia, A., Sturniolo, A., Gambaro, G., 2010. Low level exposure to cadmium increases the risk of chronic kidney disease: analysis of the NHANES 1999-2006. *BMC Public Health* 10, 304. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-304>
- Flora, S.J.S., Pachauri, V., 2010. Chelation in metal intoxication. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 2745–2788. <https://doi.org/10.3390/ijerph7072745>
- Foligné, B., Daniel, C., Pot, B., 2013. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.008>
- Fox, M.R., 1979. Nutritional influences on metal toxicity: cadmium as a model toxic element. *Environ. Health Perspect.* 29, 95–104. <https://doi.org/10.1289/ehp.792995>
- Frati, F., Salvatori, C., Incorvaia, C., Bellucci, A., Di Cara, G., Marcucci, F., Esposito, S., 2018. The Role of the Microbiome in Asthma: The Gut-Lung Axis. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 123. <https://doi.org/10.3390/ijms20010123>
- Frengova, G.I., Simova, E.D., Beshkova, D.M., Simov, Z.I., 2000. Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures. *Can. J. Microbiol.* 46, 1123–1127. <https://doi.org/10.1139/w00-103>
- Freudenberger, T., Deenen, R., Kretschmer, I., Zimmermann, A., Seiler, L.F., Mayer, P., Heim, H.-K., Köhler, K., Fischer, J.W., 2014. Synthetic gestagens exert differential effects on arterial thrombosis and aortic gene expression in ovariectomized apolipoprotein E-deficient mice. *Br. J. Pharmacol.* 171, 5032–5048. <https://doi.org/10.1111/bph.12814>
- Fu, Z., Xi, S., 2020. The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicol. Mech. Methods* 30, 167–176. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K., Tsukita, S., 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141, 1539–1550. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.7.1539>

- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S., 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1777>
- Gadd, G.M., 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 271–279. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00095-1](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00095-1)
- Galati, G., O'Brien, P.J., 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 287–303. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034>
- Galazyn-Sidorczuk, M., Brzóska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., 2008. Estimation of Polish cigarettes contamination with cadmium and lead, and exposure to these metals via smoking. *Environ. Monit. Assess.* 137, 481–493. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-9783-2>
- Gao, K., Wang, C., Liu, L., Dou, X., Liu, J., Yuan, L., Zhang, W., Wang, H., 2017. Immunomodulation and signaling mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its components on porcine intestinal epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide. *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* 50, 700–713. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.05.002>
- Garcia-Rios, A., Torres-Peña, J.D., Perez-Jimenez, F., Perez-Martinez, P., 2017. Gut Microbiota: A New Marker of Cardiovascular Disease. *Curr. Pharm. Des.* 23, 3233–3238. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170317144853>
- Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M.S., Catalano, A., 2020a. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 679. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>
- Genchi, G., Sinicropi, M.S., Lauria, G., Carocci, A., Catalano, A., 2020b. The Effects of Cadmium Toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, E3782. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113782>
- Gerasimenko, T.N., Senyavina, N.V., Anisimov, N.U., Tonevitskaya, S.A., 2016. A Model of Cadmium Uptake and Transport in Caco-2 Cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 161, 187–192. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3373-7>
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M.A., Gómez-Zavaglia, A., 2015. Role of S-layer proteins in bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1877–1887. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1952-9>
- Gerbino, E., Carasi, P., Tymczyszyn, E.E., Gómez-Zavaglia, A., 2014. Removal of cadmium by *Lactobacillus kefir* as a protective tool against toxicity. *J. Dairy Res.* 81, 280–287. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000314>
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., Groneberg, D.A., 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol. Lond. Engl.* 1, 22. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-1-22>
- Goldhaber, S.B., 2003. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* 38, 232–242. [https://doi.org/10.1016/s0273-2300\(02\)00020-x](https://doi.org/10.1016/s0273-2300(02)00020-x)
- Gomaa, E.Z., 2020. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 113, 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
- Górska, S., Hermanova, P., Ciekot, J., Schwarzer, M., Srutkova, D., Brzozowska, E., Kozakova, H., Gamian, A., 2016. Chemical characterization and immunomodulatory properties of polysaccharides isolated from probiotic *Lactobacillus casei* LOCK 0919. *Glycobiology* 26, 1014–1024. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww047>
- Green, K.J., Getsios, S., Troyanovsky, S., Godsel, L.M., 2010. Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000125. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000125>
- Greene, H.L., Hambidge, K.M., Schanler, R., Tsang, R.C., 1988. Guidelines for the use of vitamins, trace elements, calcium, magnesium, and phosphorus in infants and children receiving total parenteral nutrition: report of the Subcommittee on Pediatric Parenteral Nutrient

- Requirements from the Committee on Clinical Practice Issues of the American Society for Clinical Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 48, 1324–1342. <https://doi.org/10.1093/ajcn/48.5.1324>
- Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A.C., Grundy, D., 2017. Gastrointestinal Physiology and Function. *Handb. Exp. Pharmacol.* 239, 1–16. https://doi.org/10.1007/164_2016_118
- Guarner, F., Malagelada, J.-R., 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet Lond. Engl.* 361, 512–519. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., Hediger, M.A., 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482–488. <https://doi.org/10.1038/41343>
- Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D.B., Morgun, A., Shulzhenko, N., 2020. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine* 51, 102590. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.051>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hamlett, N.V., Landale, E.C., Davis, B.H., Summers, A.O., 1992. Roles of the Tn21 merT, merP, and merC gene products in mercury resistance and mercury binding. *J. Bacteriol.* 174, 6377–6385. <https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6377-6385.1992>
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X., 2017. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 44, 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- He, X., Qi, Z., Hou, H., Qian, L., Gao, J., Zhang, X.-X., 2020. Structural and functional alterations of gut microbiome in mice induced by chronic cadmium exposure. *Chemosphere* 246, 125747. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125747>
- Hidalgo-Cantabrana, C., Sánchez, B., Milani, C., Ventura, M., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P., 2014. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 9–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02977-13>
- Hold, G.L., 2016. Gastrointestinal Microbiota and Colon Cancer. *Dig. Dis. Basel Switz.* 34, 244–250. <https://doi.org/10.1159/000443358>
- Hollander, D., Vadheim, C.M., Brettholz, E., Petersen, G.M., Delahunty, T., Rotter, J.I., 1986. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann. Intern. Med.* 105, 883–885. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-105-6-883>
- Honda, R., Swaddiwudhipong, W., Nishijo, M., Mahasakpan, P., Teeyakasem, W., Ruangyuttikarn, W., Satarug, S., Padungtod, C., Nakagawa, H., 2010. Cadmium induced renal dysfunction among residents of rice farming area downstream from a zinc-mineralized belt in Thailand. *Toxicol. Lett.* 198, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.04.023>
- Hrcir, T., 2022. Gut Microbiota Dysbiosis: Triggers, Consequences, Diagnostic and Therapeutic Options. *Microorganisms* 10, 578. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030578>
- Hyder, O., Chung, M., Cosgrove, D., Herman, J.M., Li, Z., Firoozmand, A., Gurakar, A., Koteish, A., Pawlik, T.M., 2013. Cadmium exposure and liver disease among US adults. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 17, 1265–1273. <https://doi.org/10.1007/s11605-013-2210-9>
- Hyun, J.S., Satsu, H., Shimizu, M., 2007. Cadmium induces interleukin-8 production via NF-kappaB activation in the human intestinal epithelial cell, Caco-2. *Cytokine* 37, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.02.011>
- Iebba, V., Totino, V., Gagliardi, A., Santangelo, F., Cacciotti, F., Trancassini, M., Mancini, C., Cicerone, C., Corazziari, E., Pantanella, F., Schippa, S., 2016. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol.* 39, 1–12.
- Ikeda, M., Nakatsuka, H., Watanabe, T., Shimbo, S., 2018. Estimation of dietary intake of cadmium from cadmium in blood or urine in East Asia. *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem. GMS* 50, 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.05.019>

- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, Sachiko, Tsukita, Shoichiro, 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 171, 939–945. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510043>
- Inaba, T., Kobayashi, E., Suwazono, Y., Uetani, M., Oishi, M., Nakagawa, H., Nogawa, K., 2005. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai–itai disease. *Toxicol. Lett.* 159, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.05.011>
- Islam, S.T., Lam, J.S., 2013. Wzx flippase-mediated membrane translocation of sugar polymer precursors in bacteria. *Environ. Microbiol.* 15, 1001–1015. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02890.x>
- Ismail, B., Nampoothiri, K.M., 2014. Molecular characterization of an exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 and its efficacy to improve the texture of starchy food. *J. Food Sci. Technol.* 51, 4012–4018. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0928-8>
- Ismail, B., Nampoothiri, K.M., 2010. Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Arch. Microbiol.* 192, 1049–1057. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0636-y>
- Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P., Koivula, T., 1991. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88, 90–97.
- Jafarpour, D., Shekarforoush, S.S., Ghaisari, H.R., Nazifi, S., Sajedianfard, J., 2015. Impact of synbiotic diets including inulin, *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on intestinal microbiota of rat exposed to cadmium and mercury. *Vet. Sci. Dev.* 5. <https://doi.org/10.4081/vsd.2015.6061>
- Jama, A., Mitić-Ćulafić, D., Kolarevic, S., Djurasevic, S., Knežević-Vukčević, J., 2012. Protective effect of probiotic bacteria against cadmium-induced genotoxicity in rat hepatocytes in vivo and in vitro. *Arch. Biol. Sci.* 64, 1197–1206. <https://doi.org/10.2298/ABS1203197J>
- Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68, 167–182. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>
- Järup, L., Berglund, M., Elinder, C.G., Nordberg, G., Vahter, M., 1998. Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand. J. Work. Environ. Health* 24 Suppl 1, 1–51.
- JB Prajapat, A.P., 2013. Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria. *Adv. Dairy Res.* 01. <https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000107>
- Jeon, J.Y., Ha, K.H., Kim, D.J., 2015. New risk factors for obesity and diabetes: Environmental chemicals. *J. Diabetes Investig.* 6, 109–111. <https://doi.org/10.1111/jdi.12318>
- Jiang, Y., Yang, Z., 2018. A functional and genetic overview of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Funct. Foods* 47, 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.060>
- Johansson, M.E.V., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Subramani, D.B., Holmén-Larsson, J.M., Thomsson, K.A., Bergström, J.H., van der Post, S., Rodriguez-Piñero, A.M., Sjövall, H., Bäckström, M., Hansson, G.C., 2011. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 3635–3641. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0822-3>
- Jolly, L., Vincent, S.J.F., Duboc, P., Neeser, J.-R., 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 367–374. <https://doi.org/10.1023/a:1020668523541>
- Jurášková, D., Ribeiro, S.C., Silva, C.C.G., 2022. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: From Biosynthesis to Health-Promoting Properties. *Foods* 11, 156. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>
- Kadry, M.O., Megeed, R.A., 2018. Probiotics as a Complementary Therapy in the Model of Cadmium Chloride Toxicity: Crosstalk of β -Catenin, BDNF, and StAR Signaling Pathways. *Biol. Trace Elem. Res.* 185, 404–413. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1261-x>

- Kang, M.-Y., Cho, S.-H., Lim, Y.-H., Seo, J.-C., Hong, Y.-C., 2013. Effects of environmental cadmium exposure on liver function in adults. *Occup. Environ. Med.* 70, 268–273. <https://doi.org/10.1136/oemed-2012-101063>
- Kayama, H., Okumura, R., Takeda, K., 2020. Interaction Between the Microbiota, Epithelia, and Immune Cells in the Intestine. *Annu. Rev. Immunol.* 38, 23–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-070119-115104>
- Kelly, C.J., Zheng, L., Campbell, E.L., Saeedi, B., Scholz, C.C., Bayless, A.J., Wilson, K.E., Glover, L.E., Kominsky, D.J., Magnuson, A., Weir, T.L., Ehrentauf, S.F., Pickel, C., Kuhn, K.A., Lanis, J.M., Nguyen, V., Taylor, C.T., Colgan, S.P., 2015. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe* 17, 662–671. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.005>
- Kelly, J., Kennedy, P., Cryan, J., Dinan, T., Clarke, G., Hyland, N., 2015. Breaking Down the Barriers: The Gut Microbiome, Intestinal Permeability and Stress-related Psychiatric Disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 9.
- Kern, M.S., Boron, M.L., Weidenhamer, J.D., 2021. Buyer beware: Inexpensive, high cadmium jewelry can pose severe health risks. *Sci. Total Environ.* 764, 142926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142926>
- Kim, J.-J., Kim, Y.-S., Kumar, V., 2019. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem. GMS* 54, 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>
- Kim, K., Melough, M.M., Vance, T.M., Noh, H., Koo, S.I., Chun, O.K., 2018. Dietary Cadmium Intake and Sources in the US. *Nutrients* 11, E2. <https://doi.org/10.3390/nu11010002>
- Kirkman, H.N., Gaetani, G.F., 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem. Sci.* 32, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003>
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., Stiekema, W., Lankhorst, R.M.K., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J., 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1990–1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337704100>
- Konstantinov, S.R., Kuipers, E.J., Peppelenbosch, M.P., 2013. Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 741–745. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.178>
- Kruger, M.C., Ha, P.C., Todd, J.M., Kuhn-Sherlock, B., Schollum, L.M., Ma, J., Qin, G., Lau, E., 2012. High-calcium, vitamin D fortified milk is effective in improving bone turnover markers and vitamin D status in healthy postmenopausal Chinese women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 66, 856–861. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.54>
- Kubier, A., Wilkin, R.T., Pichler, T., 2019. Cadmium in soils and groundwater: A review. *Appl. Geochem. J. Int. Assoc. Geochem. Cosmochem.* 108, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.104388>
- Kulas, J., Tucovic, D., Zeljkovic, M., Popovic, D., Popov Aleksandrov, A., Ukropina, M., Cakic Milosevic, M., Glamoclija, J., Kataranovski, M., Mirkov, I., 2021. Proinflammatory effects of environmental cadmium boost resistance to opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*: Implications for sustained low-level pulmonary inflammation? *Toxicology* 447, 152634. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152634>
- Kwak, J.I., Nam, S.-H., Kim, L., An, Y.-J., 2020. Potential environmental risk of solar cells: Current knowledge and future challenges. *J. Hazard. Mater.* 392, 122297. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122297>
- Laine, R.A., Esselman, W.J., Sweeley, C.C., 1972. Gas-liquid chromatography of carbohydrates. *Methods Enzymol.* 28, 159–167. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(72\)28012-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(72)28012-0)
- Larsen, J.M., 2017. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology* 151, 363–374. <https://doi.org/10.1111/imm.12760>

- Laws, A., Gu, Y., Marshall, V., 2001. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* 19, 597–625. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(01\)00084-2](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(01)00084-2)
- Lee, I.-C., Caggianiello, G., van Swam, I.I., Taverne, N., Meijerink, M., Bron, P.A., Spano, G., Kleerebezem, M., 2016. Strain-Specific Features of Extracellular Polysaccharides and Their Impact on *Lactobacillus plantarum*-Host Interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3959–3970. <https://doi.org/10.1128/AEM.00306-16>
- Lee, Keum Hwa, Kronbichler, A., Park, D.D.-Y., Park, Y., Moon, H., Kim, Hyungdo, Choi, J.H., Choi, Y., Shim, S., Lyu, I.S., Yun, B.H., Han, Y., Lee, D., Lee, S.Y., Yoo, B.H., Lee, Kyung Hwan, Kim, T.L., Kim, Heonki, Shim, J.S., Nam, W., So, H., Choi, S., Lee, S., Shin, J.I., 2017. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun. Rev.* 16, 1160–1173. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.09.012>
- Ley, R.E., 2016. Gut microbiota in 2015: *Prevotella* in the gut: choose carefully. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 69–70. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.4>
- Li, F., Wang, M., Wang, J., Li, R., Zhang, Y., 2019. Alterations to the Gut Microbiota and Their Correlation With Inflammatory Factors in Chronic Kidney Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 206. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00206>
- Li, J.-Y., Jin, M.-M., Meng, J., Gao, S.-M., Lu, R.-R., 2013. Exopolysaccharide from *Lactobacillus planterum* LP6: antioxidation and the effect on oxidative stress. *Carbohydr. Polym.* 98, 1147–1152. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.027>
- Li, P., Li, X., Gu, Q., Lou, X.-Y., Zhang, X.-M., Song, D.-F., Zhang, C., 2016. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 reveals its genetic adaptation and potential probiotic profiles. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 17, 569–579. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600176>
- Li, W., Ji, J., Chen, X., Jiang, M., Rui, X., Dong, M., 2014. Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydr. Polym.* 102, 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.053>
- Li, Y., Zhang, Z., Liu, H., Zhou, H., Fan, Z., Lin, M., Wu, D., Xia, B., 2016. Characteristics, sources and health risk assessment of toxic heavy metals in PM2.5 at a megacity of southwest China. *Environ. Geochem. Health* 38, 353–362. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9722-z>
- Liu, A., Zheng, Y., Liu, L., Chen, S., He, L., Ao, X., Yang, Y., Liu, S., 2020. Decontamination of Aflatoxins by Lactic Acid Bacteria. *Curr. Microbiol.* 77, 3821–3830. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02220-y>
- Liu, T.-H., Wang, J., Zhang, C.-Y., Zhao, L., Sheng, Y.-Y., Tao, G.-S., Xue, Y.-Z., 2023. Gut microbial characteristic comparison reveals potential anti-aging function of *Dubosiaella newyorkensis* in mice. *Front. Endocrinol.* 14, 1133167. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1133167>
- Liu, Z., Dong, L., Jia, K., Zhan, H., Zhang, Z., Shah, N.P., Tao, X., Wei, H., 2019. Sulfonation of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 exopolysaccharide amplifies its antioxidant activities in vitro and in a Caco-2 cell model. *J. Dairy Sci.* 102, 5922–5932. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15831>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lukic, J., Strahinic, I., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, L., Begovic, J., 2013. Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5735–5744. <https://doi.org/10.1128/AEM.01807-13>
- Madden, E.F., Fowler, B.A., 2000. Mechanisms of nephrotoxicity from metal combinations: a review. *Drug Chem. Toxicol.* 23, 1–12. <https://doi.org/10.1081/dct-100100098>

- Margolis, K.G., Cryan, J.F., Mayer, E.A., 2021. The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. *Gastroenterology* 160, 1486–1501. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.066>
- Martín-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., Dejana, E., 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* 142, 117–127. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.1.117>
- Massoud, R., Zoghi, A., 2022. Potential probiotic strains with heavy metals and mycotoxins bioremoval capacity for application in foodstuffs. *J. Appl. Microbiol.* 133, 1288–1307. <https://doi.org/10.1111/jam.15685>
- Matović, V., Buha, A., Đukić-Cosić, D., Bulat, Z., 2015. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 78, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.011>
- Mattila-Sandholm, T., Blum, S., Collins, J.K., Crittenden, R., de Vos, W., Dunne, C., Fondén, R., Grenov, G., Isolauri, E., Kiely, B., Marteau, P., Morelli, L., Ouwehand, A., Reniero, R., Saarela, M., Salminen, S., Saxelin, M., Schiffrin, E., Shanahan, F., Vaughan, E., von Wright, A., 1999. Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 393–399. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00029-7)
- Mayorgas, A., Dotti, I., Salas, A., 2021. Microbial Metabolites, Postbiotics, and Intestinal Epithelial Function. *Mol. Nutr. Food Res.* 65, e2000188. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000188>
- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.-M., Dousset, X., 2013. *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol.* 36, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.010>
- Messner, B., Türkcan, A., Ploner, C., Laufer, G., Bernhard, D., 2016. Cadmium overkill: autophagy, apoptosis and necrosis signalling in endothelial cells exposed to cadmium. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 1699–1713. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2094-9>
- Mezynska, M., Brzóska, M.M., 2018. Environmental exposure to cadmium—a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 3211–3232. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0827-z>
- Michielan, A., D’Inca, R., 2015. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm.* 2015, 628157. <https://doi.org/10.1155/2015/628157>
- Mills, S., Stanton, C., Lane, J.A., Smith, G.J., Ross, R.P., 2019. Precision Nutrition and the Microbiome, Part I: Current State of the Science. *Nutrients* 11, 923. <https://doi.org/10.3390/nu11040923>
- Minj, J., Chandra, P., Paul, C., Sharma, R.K., 2021. Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: current applications and research perspectives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61, 2207–2224. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1774496>
- Mitchell, S., Vargas, J., Hoffmann, A., 2016. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 8, 227–241. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>
- Mitra, E., Ghosh, A.K., Ghosh, D., Mukherjee, D., Chattopadhyay, A., Dutta, S., Pattari, S.K., Bandyopadhyay, D., 2012. Protective effect of aqueous Curry leaf (*Murraya koenigii*) extract against cadmium-induced oxidative stress in rat heart. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 50, 1340–1353. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.048>
- Mohammed, M.K.A., Jabir, M.S., Abdulzahraa, H.G., Mohammed, S.H., Al-Azzawi, W.K., Ahmed, D.S., Singh, S., Kumar, A., Asaithambi, S., Shekargoftar, M., 2022. Introduction of cadmium chloride additive to improve the performance and stability of perovskite solar cells. *RSC Adv.* 12, 20461–20470. <https://doi.org/10.1039/d2ra03776a>
- Mokoena, M.P., Omatola, C.A., Olaniran, A.O., 2021. Applications of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins against Food Spoilage Microorganisms and Foodborne Pathogens. *Mol. Basel Switz.* 26, 7055. <https://doi.org/10.3390/molecules26227055>

- Monachese, M., Burton, J.P., Reid, G., 2012. Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6397–6404. <https://doi.org/10.1128/AEM.01665-12>
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., Remaud-Siméon, M., 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J., First International Symposium on Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: from Fundamentals to Applications* 11, 675–685. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00113-3)
- Moppert, X., Le Costaouec, T., Raguene, G., Courtois, A., Simon-Colin, C., Crassous, P., Costa, B., Guezennec, J., 2009. Investigations into the uptake of copper, iron and selenium by a highly sulphated bacterial exopolysaccharide isolated from microbial mats. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 599–604. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0529-8>
- Morillo, J.A., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M., 2006. Production of a metal-binding exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* using two-phase olive-mill waste as fermentation substrate. *Curr. Microbiol.* 53, 189–193. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0438-7>
- Morrow, H., 2010. Cadmium and Cadmium Alloys, in: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–36. <https://doi.org/10.1002/0471238961.0301041303011818.a01.pub3>
- Motiani, K.K., Collado, M.C., Eskelinen, J.-J., Virtanen, K.A., Löyttyniemi, E., Salminen, S., Nuutila, P., Kalliokoski, K.K., Hannukainen, J.C., 2020. Exercise Training Modulates Gut Microbiota Profile and Improves Endotoxemia. *Med. Sci. Sports Exerc.* 52, 94–104. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002112>
- Mouro, V.G.S., Ladeira, L.C.M., Lozi, A.A., de Medeiros, T.S., Silva, M.R., de Oliveira, E.L., de Melo, F.C.S.A., da Matta, S.L.P., 2021. Different Routes of Administration Lead to Different Oxidative Damage and Tissue Disorganization Levels on the Subacute Cadmium Toxicity in the Liver. *Biol. Trace Elem. Res.* 199, 4624–4634. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02570-5>
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E.M., Van der Meulen, R., Foulquié Moreno, M.R., Font de Valdez, G., De Vuyst, L., 2006. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4431–4435. <https://doi.org/10.1128/AEM.02780-05>
- Nguyen, B.T., Bujna, E., Fekete, N., Tran, A.T.M., Rezessy-Szabo, J.M., Prasad, R., Nguyen, Q.D., 2019. Probiotic Beverage From Pineapple Juice Fermented With *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains. *Front. Nutr.* 6, 54. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00054>
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., Topisirovic, L., Golic, N., Ruas-Madiedo, P., 2012. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.015>
- Nikonenko, N.A., Buslov, D.K., Sushko, N.I., Zhbankov, R.G., 2000. Investigation of stretching vibrations of glycosidic linkages in disaccharides and polysaccharides with use of IR spectra deconvolution. *Biopolymers* 57, 257–262. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)57:4<257::AID-BIP7>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)57:4<257::AID-BIP7>3.0.CO;2-3)
- Ninkov, M., Popov Aleksandrov, A., Demenesku, J., Mirkov, I., Mileusnic, D., Petrovic, A., Grigorov, I., Zolotarevski, L., Tolinacki, M., Kataranovski, D., Brceski, I., Kataranovski, M., 2015. Toxicity of oral cadmium intake: Impact on gut immunity. *Toxicol. Lett.* 237, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.06.002>
- Ninkov, M., Popov Aleksandrov, A., Mirkov, I., Demenesku, J., Mileusnic, D., Jovanovic Stojanov, S., Golic, N., Tolinacki, M., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Brceski, I., Kataranovski, M., 2016. Strain differences in toxicity of oral cadmium intake in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 96, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.021>

- Noda, M., Danshiitsoodol, N., Kanno, K., Uchida, T., Sugiyama, M., 2021. The Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 Prevents and Ameliorates Inflammatory Responses in DSS-Induced Ulcerative Colitis. *Microorganisms* 9, 2243. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112243>
- Noda, M., Sultana, N., Hayashi, I., Fukamachi, M., Sugiyama, M., 2019. Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 Prevents and Improves the Picryl Chloride-Induced Contact Dermatitis. *Mol. Basel Switz.* 24, E2970. <https://doi.org/10.3390/molecules24162970>
- Nogawa, K., Kido, T., 1993. Biological monitoring of cadmium exposure in itai-itai disease epidemiology. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 65, S43-46. <https://doi.org/10.1007/BF00381306>
- Nordberg, G.F., 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.015>
- Nordberg, G.F., Bernard, A., Diamond, G.L., Duffus, J.H., Illing, P., Nordberg, M., Bergdahl, I.A., Jin, T., Skerfving, S., 2018. Risk assessment of effects of cadmium on human health (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 90, 755–808. <https://doi.org/10.1515/pac-2016-0910>
- Nordberg, M., Nordberg, G.F., 2022. Metallothionein and Cadmium Toxicology-Historical Review and Commentary. *Biomolecules* 12, 360. <https://doi.org/10.3390/biom12030360>
- Oberhuber, G., Vogelsang, H., 1998. Gastrointestinal permeability in celiac disease. *Gastroenterology* 114, 226. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70661-4](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70661-4)
- O’Callaghan, J., O’Toole, P.W., 2013. *Lactobacillus*: host-microbe relationships. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 358, 119–154. https://doi.org/10.1007/82_2011_187
- Ola-Mudathir, K.F., Suru, S.M., Fafunso, M.A., Obioha, U.E., Faremi, T.Y., 2008. Protective roles of onion and garlic extracts on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 46, 3604–3611. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.004>
- Oleksy, M., Klewicka, E., 2018. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 450–462. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1187112>
- O’Neill, C.A., Monteleone, G., McLaughlin, J.T., Paus, R., 2016. The gut-skin axis in health and disease: A paradigm with therapeutic implications. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 38, 1167–1176. <https://doi.org/10.1002/bies.201600008>
- Orr, S.E., Bridges, C.C., 2017. Chronic Kidney Disease and Exposure to Nephrotoxic Metals. *Int. J. Mol. Sci.* 18, E1039. <https://doi.org/10.3390/ijms18051039>
- Pal, A., Paul, A.K., 2008. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48, 49–64. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0006-5>
- Pari, L., Shagirtha, K., 2012. Hesperetin protects against oxidative stress related hepatic dysfunction by cadmium in rats. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Toxikol. Pathol.* 64, 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.11.007>
- Parish, J.H., 1986. Genetic manipulation of *streptomyces* — A laboratory manual: By D A Hopwood, M J Bibb, K F Chater; T Kieser CJ Bruton, H M Kieser, D J Lydiate, C P Smith, J M Ward and H Schrempf. pp 356. The John Innes Foundation, Norwich, UK and Cold Spring Harbour Laboratory. 1985. \$25 ISBN 0-7084-0336-0. *Biochem. Educ.* 14, 196–196. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(86\)90228-1](https://doi.org/10.1016/0307-4412(86)90228-1)
- Passos, M. do C.F., Moraes-Filho, J.P., 2017. INTESTINAL MICROBIOTA IN DIGESTIVE DISEASES. *Arq. Gastroenterol.* 54, 255–262. <https://doi.org/10.1590/S0004-2803.201700000-31>
- Patel, R.M., Denning, P.W., 2013. Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? *Clin. Perinatol.* 40, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2012.12.002>

- Perczak, A., Goliński, P., Bryła, M., Waśkiewicz, A., 2018. The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 69, 32–45. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3051>
- Pérez Díaz, M.F.F., Acosta, M., Mohamed, F.H., Ferramola, M.L., Oliveros, L.B., Gimenez, M.S., 2013. Protective effect of soybeans as protein source in the diet against cadmium-aorta redox and morphological alteration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 806–815. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.016>
- Pérez-Conesa, D., López, G., Abellán, P., Ros, G., 2006. Bioavailability of calcium, magnesium and phosphorus in rats fed probiotic, prebiotic and synbiotic powder follow-up infant formulas and their effect on physiological and nutritional parameters. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2327–2336. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2618>
- Perez-Lopez, A., Behnsen, J., Nuccio, S.-P., Raffatellu, M., 2016. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 135–148. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.17>
- Perry, R.J., Peng, L., Barry, N.A., Cline, G.W., Zhang, D., Cardone, R.L., Petersen, K.F., Kibbey, R.G., Goodman, A.L., Shulman, G.I., 2016. Acetate mediates a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature* 534, 213–217. <https://doi.org/10.1038/nature18309>
- Petrova, E., Pashkunova-Martić, I., Schaier, M., Gluhcheva, Y., Pavlova, E., Helbich, T.H., Keppler, B., Ivanova, J., 2022. Effects of subacute cadmium exposure and subsequent deferiprone treatment on cadmium accumulation and on the homeostasis of essential elements in the mouse brain. *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem. GMS* 74, 127062. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.127062>
- Pey, A.L., Megarity, C.F., Timson, D.J., 2019. NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO1): an enzyme which needs just enough mobility, in just the right places. *Biosci. Rep.* 39, BSR20180459. <https://doi.org/10.1042/BSR20180459>
- Pham, P.L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., Cerning, J., 2000. Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and Analysis of Its Enzymatic Degradation during Prolonged Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2302–2310.
- Polak-Berecka, M., Sz wajgier, D., Waśko, A., 2014a. Biosorption of Al(+3) and Cd(+2) by an exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Food Sci.* 79, T2404-2408. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12674>
- Polak-Berecka, M., Waśko, A., Kubik-Komar, A., 2014b. Optimization of culture conditions for exopolysaccharide production by a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* E/N. *Pol. J. Microbiol.* 63, 253–257.
- Polak-Berecka, M., Waśko, A., Skrzypek, H., Kreft, A., 2013. Production of exopolysaccharides by a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus*: Biosynthesis and purification methods. *Acta Aliment.* 42, 220–228. <https://doi.org/10.1556/aalim.42.2013.2.9>
- Popov Aleksandrov, A., Mirkov, I., Tucovic, D., Kulas, J., Ninkov, M., Kataranovski, M., 2021. Cadmium and immunologically-mediated homeostasis of anatomical barrier tissues. *Toxicol. Lett.* 337, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.11.008>
- Popović, N., Brdarić, E., Đokić, J., Dinić, M., Veljović, K., Golić, N., Terzić-Vidojević, A., 2020. Yogurt Produced by Novel Natural Starter Cultures Improves Gut Epithelial Barrier In Vitro. *Microorganisms* 8, 1586. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101586>
- Popović, N., Djokić, J., Brdarić, E., Dinić, M., Terzić-Vidojević, A., Golić, N., Veljović, K., 2019. The Influence of Heat-Killed *Enterococcus faecium* BGPAS1-3 on the Tight Junction Protein Expression and Immune Function in Differentiated Caco-2 Cells Infected With *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. *Front. Microbiol.* 10, 412. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00412>
- Prozialeck, W.C., 2000. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 231–249. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.8905>
- Quigley, E.M.M., 2013. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol. Hepatol.* 9, 560–569.

- Rahman, I., Biswas, S.K., Jimenez, L.A., Torres, M., Forman, H.J., 2005. Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 42–59. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.42>
- Ramos-Zúñiga, J., Gallardo, S., Martínez-Bussenius, C., Norambuena, R., Navarro, C.A., Paradelo, A., Jerez, C.A., 2019. Response of the biomining *Acidithiobacillus ferrooxidans* to high cadmium concentrations. *J. Proteomics* 198, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.013>
- Rani, A., Kumar, A., Lal, A., Pant, M., 2014. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int. J. Environ. Health Res.* 24, 378–399. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.835032>
- Reed, K.K., Wickham, R., 2009. Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro. *Semin. Oncol. Nurs.* 25, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2008.10.002>
- Reeves, P.G., Chaney, R.L., 2004. Marginal nutritional status of zinc, iron, and calcium increases cadmium retention in the duodenum and other organs of rats fed rice-based diets. *Environ. Res.* 96, 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.02.013>
- Remus, D.M., van Kranenburg, R., van Swam, I.I., Taverne, N., Bongers, R.S., Wels, M., Wells, J.M., Bron, P.A., Kleerebezem, M., 2012. Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling. *Microb. Cell Factories* 11, 149. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-149>
- Reyes-Hinojosa, D., Lozada-Pérez, C.A., Zamudio Cuevas, Y., López-Reyes, A., Martínez-Nava, G., Fernández-Torres, J., Olivos-Meza, A., Landa-Solis, C., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Rojas Del Castillo, E., Martínez-Flores, K., 2019. Toxicity of cadmium in musculoskeletal diseases. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 72, 103219. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103219>
- Richardson, J.B., Dancy, B.C.R., Horton, C.L., Lee, Y.S., Madejczyk, M.S., Xu, Z.Z., Ackermann, G., Humphrey, G., Palacios, G., Knight, R., Lewis, J.A., 2018. Exposure to toxic metals triggers unique responses from the rat gut microbiota. *Sci. Rep.* 8, 6578. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24931-w>
- Robijn, G.W., Gutiérrez Gallego, R., van den Berg, D.J., Haas, H., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F., 1996. Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* LMG9433. *Carbohydr. Res.* 288, 203–218. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(96\)90799-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(96)90799-5)
- Rohde, M., 2019. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol. Spectr.* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018>
- Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C.G., 2005. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 88, 843–856. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72750-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72750-8)
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., Salminen, S., 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.* 69, 2011–2015.
- Rusanov, A.L., Smirnova, A.V., Poromov, A.A., Fomicheva, K.A., Luzgina, N.G., Majouga, A.G., 2015. Effects of cadmium chloride on the functional state of human intestinal cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 29, 1006–1011. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.018>
- Russo, P., López, P., Capozzi, V., De Palencia, P.F., Dueñas, M.T., Spano, G., Fiocco, D., 2012. Beta-glucans improve growth, viability and colonization of probiotic microorganisms. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 6026–6039. <https://doi.org/10.3390/ijms13056026>
- Ryu, D.-Y., Lee, S.-J., Park, D.W., Choi, B.-S., Klaassen, C.D., Park, J.-D., 2004. Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats. *Toxicol. Lett.* 152, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.03.015>
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J.A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J.C., de los Reyes-Gavilán, C.G., Ruas-Madiedo, P., 2009. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *J. Dairy Sci.* 92, 4158–4168. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2126>

- Sampson, T.R., Debelius, J.W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G.G., Ilhan, Z.E., Challis, C., Schretter, C.E., Rocha, S., Gradinaru, V., Chesselet, M.-F., Keshavarzian, A., Shannon, K.M., Krajmalnik-Brown, R., Wittung-Stafshede, P., Knight, R., Mazmanian, S.K., 2016. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 167, 1469-1480.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>
- Sánchez, J.-I., Martínez, B., Guillén, R., Jiménez-Díaz, R., Rodríguez, A., 2006. Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7495–7502. <https://doi.org/10.1128/AEM.01078-06>
- Sanders, M.E., Klaenhammer, T.R., 2001. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.* 84, 319–331. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74481-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74481-5)
- Satarug, S., 2012. Long-term exposure to cadmium in food and cigarette smoke, liver effects and hepatocellular carcinoma. *Curr. Drug Metab.* 13, 257–271. <https://doi.org/10.2174/138920012799320446>
- Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P.E.B., Williams, D.J., Moore, M.R., 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol. Lett.* 137, 65–83. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00381-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00381-8)
- Satarug, S., Garrett, S.H., Sens, M.A., Sens, D.A., 2010. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ. Health Perspect.* 118, 182–190. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901234>
- Satarug, S., Moore, M.R., 2004. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ. Health Perspect.* 112, 1099–1103.
- Satarug, S., Nishijo, M., Lasker, J.M., Edwards, R.J., Moore, M.R., 2006. Kidney dysfunction and hypertension: role for cadmium, p450 and heme oxygenases? *Tohoku J. Exp. Med.* 208, 179–202. <https://doi.org/10.1620/tjem.208.179>
- Satarug, S., Vesey, D.A., Gobe, G.C., 2017a. Current health risk assessment practice for dietary cadmium: Data from different countries. *Food Chem. Toxicol.* 106, 430–445. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.013>
- Satarug, S., Vesey, D.A., Gobe, G.C., 2017b. Kidney Cadmium Toxicity, Diabetes and High Blood Pressure: The Perfect Storm. *Tohoku J. Exp. Med.* 241, 65–87. <https://doi.org/10.1620/tjem.241.65>
- Scher, J.U., Sczesnak, A., Longman, R.S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., Rostron, T., Cerundolo, V., Pamer, E.G., Abramson, S.B., Huttenhower, C., Littman, D.R., 2013. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife* 2, e01202. <https://doi.org/10.7554/eLife.01202>
- Sen Gupta, R., Sen Gupta, E., Dhakal, B.K., Thakur, A.R., Ahnn, J., 2004. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Mol. Cells* 17, 132–139.
- Sharma, V., Sharma, A., Kansal, L., 2010. The effect of oral administration of *Allium sativum* extracts on lead nitrate induced toxicity in male mice. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 48, 928–936. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.002>
- Shen, J.-W., Shi, C.-W., Xu, C., 2013. Exopolysaccharides from *Pleurotus pulmonarius*: Fermentation Optimization, Characterization and Antioxidant Activity. *Food Technol. Biotechnol.* 51, 520–527.
- Sherwin, E., Rea, K., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2016. A gut (microbiome) feeling about the brain. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 32, 96–102. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000244>
- Shuhong, Y., Meiping, Z., Hong, Y., Han, W., Shan, X., Yan, L., Jihui, W., 2014. Biosorption of Cu(2+), Pb(2+) and Cr(6+) by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter ps-5*. *Carbohydr. Polym.* 101, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.021>
- Sinha, S., Lin, G., Ferenczi, K., 2021. The skin microbiome and the gut-skin axis. *Clin. Dermatol.* 39, 829–839. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2021.08.021>

- Snel, J., Vissers, Y.M., Smit, B.A., Jongen, J.M.J., van der Meulen, E.T., Zwijsen, R., Ruinemans-Koerts, J., Jansen, A.P.H., Kleerebezem, M., Savelkoul, H.F.J., 2011. Strain-specific immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* strains on birch-pollen-allergic subjects out of season. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 41, 232–242. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03650.x>
- Socafa, K., Doboszewska, U., Szopa, A., Serefko, A., Włodarczyk, M., Zielińska, A., Poleszak, E., Fichna, J., Właż, P., 2021. The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacol. Res.* 172, 105840. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105840>
- Söderholm, J.D., Peterson, K.H., Olaison, G., Franzén, L.E., Weström, B., Magnusson, K.E., Sjö dahl, R., 1999. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 117, 65–72. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70551-2](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70551-2)
- Sokovic Bajic, S., Djokic, J., Dinic, M., Veljovic, K., Golic, N., Mihajlovic, S., Tolinacki, M., 2019. GABA-Producing Natural Dairy Isolate From Artisanal Zlatar Cheese Attenuates Gut Inflammation and Strengthens Gut Epithelial Barrier in vitro. *Front. Microbiol.* 10, 527. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00527>
- Spanhaak, S., Havenaar, R., Schaafsma, G., 1998. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52, 899–907. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600663>
- Stack, H.M., Kearney, N., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., 2010. Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 500–507. <https://doi.org/10.1128/AEM.01524-09>
- Sterling, K.G., Dodd, G.K., Alhamdi, S., Asimenios, P.G., Dagda, R.K., De Meirleir, K.L., Hudig, D., Lombardi, V.C., 2022. Mucosal Immunity and the Gut-Microbiota-Brain-Axis in Neuroimmune Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 13328. <https://doi.org/10.3390/ijms232113328>
- Stinglele, F., Newell, J.W., Neeser, J.R., 1999. Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol.* 181, 6354–6360. <https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6354-6360.1999>
- Substance Priority List | ATSDR [WWW Document], 2023. URL <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html> (accessed 3.19.23).
- Suzuki, T., 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 631–659. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>
- Swaddiwudhipong, W., Mahasakpan, P., Jeekeeree, W., Funkhiew, T., Sanjum, R., Apiwatpaiboon, T., Phopueng, I., 2015. Renal and blood pressure effects from environmental cadmium exposure in Thai children. *Environ. Res.* 136, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.017>
- Tahergorabi, R., Matak, K.E., Jaczynski, J., 2015. Fish protein isolate: Development of functional foods with nutraceutical ingredients. *J. Funct. Foods* 18, 746–756. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.006>
- Tai, N., Wong, F.S., Wen, L., 2015. The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes mellitus and obesity. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 16, 55–65. <https://doi.org/10.1007/s11154-015-9309-0>
- Tai, Y.-T., Chou, S.-H., Cheng, C.-Y., Ho, C.-T., Lin, H.-C., Jung, S.-M., Chu, P.-H., Ko, F.-H., 2022. The preferential accumulation of cadmium ions among various tissues in mice. *Toxicol. Rep.* 9, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.01.002>
- Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M.C., 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res. Microbiol.* 154, 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.09.006>
- Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S.B., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A., 2017. *Roseburia* spp.: a marker of health? *Future Microbiol.* 12, 157–170. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0130>

- Tavakkoli, L., Khanjani, N., 2016. Environmental and occupational exposure to cadmium in Iran: a systematic review. *Rev. Environ. Health* 31, 457–463. <https://doi.org/10.1515/reveh-2016-0042>
- Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y., Ding, Q., Gao, C., Olsen, R.E., Ran, C., Zhou, Z., 2020. Paraprobiotics and Postbiotics of Probiotic Lactobacilli, Their Positive Effects on the Host and Action Mechanisms: A Review. *Front. Nutr.* 7, 570344. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.570344>
- Tellez-Plaza, M., Jones, M.R., Dominguez-Lucas, A., Guallar, E., Navas-Acien, A., 2013. Cadmium exposure and clinical cardiovascular disease: a systematic review. *Curr. Atheroscler. Rep.* 15, 356. <https://doi.org/10.1007/s11883-013-0356-2>
- Thanihaichelvan, M., Loheeswaran, S., Balashangar, K., Velauthapillai, D., Ravirajan, P., 2019. Polymer/Fullerene Blend Solar Cells with Cadmium Sulfide Thin Film as an Alternative Hole-Blocking Layer. *Polymers* 11, 460. <https://doi.org/10.3390/polym11030460>
- Thévenod, F., Lee, W.-K., 2013. Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways. *Arch. Toxicol.* 87, 1743–1786. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1110-9>
- Thévenod, F., Wolff, N.A., 2016. Iron transport in the kidney: implications for physiology and cadmium nephrotoxicity. *Met. Integr. Biometal Sci.* 8, 17–42. <https://doi.org/10.1039/c5mt00215j>
- Tian, J., Yang, X., Zhang, K., Zhao, Y., Cheng, F., Jin, Y., 2022. Influence of *Lactobacillus helveticus* ZF22 and TR1-1-3 strains on the aromatic flavor of fermented sausages. *Front. Nutr.* 9, 1058109. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1058109>
- Tinkov, A.A., Gritsenko, V.A., Skalnaya, M.G., Cherkasov, S.V., Aaseth, J., Skalny, A.V., 2018. Gut as a target for cadmium toxicity. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 235, 429–434. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.114>
- Topolska, K., Florkiewicz, A., Filipiak-Florkiewicz, A., 2021. Functional Food-Consumer Motivations and Expectations. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 5327. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105327>
- Tripathi, S., Srivastav, A.K., 2011. Cytoarchitectural alterations in kidney of Wistar rat after oral exposure to cadmium chloride. *Tissue Cell* 43, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2011.01.001>
- Tucovic, D., Popov Aleksandrov, A., Mirkov, I., Ninkov, M., Kulas, J., Zolotarevski, L., Vukojevic, V., Mutic, J., Tatalovic, N., Kataranovski, M., 2018. Oral cadmium exposure affects skin immune reactivity in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 164, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.117>
- Turner, A., 2019. Cadmium pigments in consumer products and their health risks. *Sci. Total Environ.* 657, 1409–1418. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.096>
- Turner, J.R., 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 799–809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>
- van Geel-Schutten, G.H., Flesch, F., ten Brink, B., Smith, M.R., Dijkhuizen, L., 1998. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 697–703. <https://doi.org/10.1007/s002530051353>
- van Kleef, E., van Trijp, H.C.M., Luning, P., 2005. Functional foods: health claim-food product compatibility and the impact of health claim framing on consumer evaluation. *Appetite* 44, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2005.01.009>
- van Roy, F., Berx, G., 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 3756–3788. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>
- Verhoef, R., Schols, H.A., Blanco, A., Siika-aho, M., Rättö, M., Buchert, J., Lenon, G., Voragen, A.G.J., 2005. Sugar composition and FT-IR analysis of exopolysaccharides produced by microbial isolates from paper mill slime deposits. *Biotechnol. Bioeng.* 91, 91–105. <https://doi.org/10.1002/bit.20494>

- Villacara, A., Kumami, K., Yamamoto, T., Mrsulja, B.B., Spatz, M., 1989. Ischemic modification of cerebrocortical membranes: 5-hydroxytryptamine receptors, fluidity, and inducible in vitro lipid peroxidation. *J. Neurochem.* 53, 595–601. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb07375.x>
- Volk, N., Lacy, B., 2017. Anatomy and Physiology of the Small Bowel. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* 27, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2016.08.001>
- Waalkes, M.P., 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* 533, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.011>
- Wallin, M., Barregard, L., Sallsten, G., Lundh, T., Karlsson, M.K., Lorentzon, M., Ohlsson, C., Mellström, D., 2016. Low-Level Cadmium Exposure Is Associated With Decreased Bone Mineral Density and Increased Risk of Incident Fractures in Elderly Men: The MrOS Sweden Study. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 31, 732–741. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2743>
- Wallin, M., Sallsten, G., Lundh, T., Barregard, L., 2014. Low-level cadmium exposure and effects on kidney function. *Occup. Environ. Med.* 71, 848–854. <https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102279>
- Wang, D., Sun, H., Wu, Y., Zhou, Z., Ding, Z., Chen, X., Xu, Y., 2016. Tubular and glomerular kidney effects in the Chinese general population with low environmental cadmium exposure. *Chemosphere* 147, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.069>
- Wang, H., Zhu, G., Shi, Y., Weng, S., Jin, T., Kong, Q., Nordberg, G.F., 2003. Influence of environmental cadmium exposure on forearm bone density. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 18, 553–560. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.3.553>
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Dong, M., 2014. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *Int. J. Biol. Macromol.* 63, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.036>
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., Hekimi, S., 2018. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 217, 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>
- Wang, Y., Zalups, R.K., Barfuss, D.W., 2010. Potential mechanisms involved in the absorptive transport of cadmium in isolated perfused rabbit renal proximal tubules. *Toxicol. Lett.* 193, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.12.007>
- Wang, Z., Sun, Y., Yao, W., Ba, Q., Wang, H., 2021. Effects of Cadmium Exposure on the Immune System and Immunoregulation. *Front. Immunol.* 12, 695484. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.695484>
- Wei, Y., Li, F., Li, L., Huang, L., Li, Q., 2019. Genetic and Biochemical Characterization of an Exopolysaccharide With in vitro Antitumoral Activity Produced by *Lactobacillus fermentum* YL-11. *Front. Microbiol.* 10, 2898. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02898>
- Weidenmaier, C., Peschel, A., 2008. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 276–287. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1861>
- Weissman, S.M., 1976. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. 2nd Edition. Yale J. Biol. Med. 49, 310–311.
- Werning, M.L., Hernández-Alcántara, A.M., Ruiz, M.J., Soto, L.P., Dueñas, M.T., López, P., Frizzo, L.S., 2022. Biological Functions of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria and Their Potential Benefits for Humans and Farmed Animals. *Foods* 11, 1284. <https://doi.org/10.3390/foods11091284>
- Wester, R.C., Maibach, H.I., Sedik, L., Melendres, J., DiZio, S., Wade, M., 1992. In vitro percutaneous absorption of cadmium from water and soil into human skin. *Fundam. Appl. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.* 19, 1–5. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(92\)90021-9](https://doi.org/10.1016/0272-0590(92)90021-9)
- Whanger, P.D., 1992. Selenium in the treatment of heavy metal poisoning and chemical carcinogenesis. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 6, 209–221.

- White, C., Gadd, G.M., 1998. Accumulation and effects of cadmium on sulphate-reducing bacterial biofilms. *Microbiol. Read. Engl.* 144, 1407–1415. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-5-1407>
- WHO-FAO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of the Joint FAO/WHO Working group on drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London:WHO
- Widyastuti, Y., Febrisiantosa, A., Tidona, F., 2021. Health-Promoting Properties of Lactobacilli in Fermented Dairy Products. *Front. Microbiol.* 12, 673890. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673890>
- Wilbur, S., Abadin, H., Fay, M., Yu, D., Tencza, B., Ingerman, L., Klotzbach, J., James, S., 2012. Toxicological Profile for Chromium, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Toxicological Profiles. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), Atlanta (GA).
- Wu, G.D., Lai, E.J., Huang, N., Wen, X., 1997. Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* 272, 2396–2403.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *Int. Sch. Res. Not.* 2011, e402647. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>
- Xu, C., Holscher, M.A., Jones, M.M., Singh, P.K., 1995. Effect of monoisoamyl meso-2,3-dimercaptosuccinate on the pathology of acute cadmium intoxication. *J. Toxicol. Environ. Health* 45, 261–277. <https://doi.org/10.1080/15287399509531995>
- Yadav, A.K., Espallat, A., Cava, F., 2018. Bacterial Strategies to Preserve Cell Wall Integrity Against Environmental Threats. *Front. Microbiol.* 9, 2064. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02064>
- Yamaura, Y., Chapron, B.D., Wang, Z., Himmelfarb, J., Thummel, K.E., 2016. Functional Comparison of Human Colonic Carcinoma Cell Lines and Primary Small Intestinal Epithelial Cells for Investigations of Intestinal Drug Permeability and First-Pass Metabolism. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 44, 329–335. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.068429>
- Yan, L.-J., Allen, D.C., 2021. Cadmium-Induced Kidney Injury: Oxidative Damage as a Unifying Mechanism. *Biomolecules* 11, 1575. <https://doi.org/10.3390/biom11111575>
- Yang, J., Chen, W., Sun, Y., Liu, J., Zhang, W., 2021. Effects of cadmium on organ function, gut microbiota and its metabolomics profile in adolescent rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 222, 112501. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112501>
- Yee, S., 1997. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm. Res.* 14, 763–766. <https://doi.org/10.1023/a:1012102522787>
- Yi, Y.-J., Lim, J.-M., Gu, S., Lee, W.-K., Oh, E., Lee, S.-M., Oh, B.-T., 2017. Potential use of lactic acid bacteria *Leuconostoc mesenteroides* as a probiotic for the removal of Pb(II) toxicity. *J. Microbiol. Seoul Korea* 55, 296–303. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6642-x>
- Yother, J., 2011. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 563–581. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162944>
- Yuan, X., Wang, J., Shang, Y., Sun, B., 2014. Health risk assessment of cadmium via dietary intake by adults in China. *J. Sci. Food Agric.* 94, 373–380. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6394>
- Zafar, H., Saier, M.H., 2021. Gut *Bacteroides* species in health and disease. *Gut Microbes* 13, 1–20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1848158>
- Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K., 2016. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>
- Zhai, Q., Feng, S., Arjan, N., Chen, W., 2019. A next generation probiotic, *Akkermansia muciniphila*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 3227–3236. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1517725>

- Zhai, Q., Narbad, A., Chen, W., 2015. Dietary strategies for the treatment of cadmium and lead toxicity. *Nutrients* 7, 552–571. <https://doi.org/10.3390/nu7010552>
- Zhai, Q., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Narbad, A., Chen, W., 2016. Oral Administration of Probiotics Inhibits Absorption of the Heavy Metal Cadmium by Protecting the Intestinal Barrier. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4429–4440. <https://doi.org/10.1128/AEM.00695-16>
- Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Narbad, A., Chen, Y.Q., Zhang, H., Tian, F., Chen, W., 2014. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against chronic cadmium toxicity in mice indicate routes of protection besides intestinal sequestration. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4063–4071. <https://doi.org/10.1128/AEM.00762-14>
- Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H., Chen, W., 2013. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1508–1515. <https://doi.org/10.1128/AEM.03417-12>
- Zhai, Q., Yu, L., Li, T., Zhu, J., Zhang, C., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., 2017. Effect of dietary probiotic supplementation on intestinal microbiota and physiological conditions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under waterborne cadmium exposure. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110, 501–513. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0819-x>
- Zhang, L., Liu, Y., Zheng, H.J., Zhang, C.P., 2019. The Oral Microbiota May Have Influence on Oral Cancer. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 476. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00476>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhou, X., Qi, W., Hong, T., Xiong, T., Gong, D., Xie, M., Nie, S., 2018. Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* NCU116 Regulate Intestinal Barrier Function via STAT3 Signaling Pathway. *J. Agric. Food Chem.* 66, 9719–9727. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03340>
- Zhu, J., Yu, L., Shen, X., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., Zhai, Q., 2021. Protective Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against Acute Toxicity Caused by Different Food-Derived Forms of Cadmium in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11045. <https://doi.org/10.3390/ijms222011045>
- Zivkovic, M., Miljkovic, M., Ruas-Madiedo, P., Strahinic, I., Tolinacki, M., Golic, N., Kojic, M., 2015. Exopolysaccharide production and rropy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1387–1396. <https://doi.org/10.1128/AEM.03028-14>
- Zoghi, A., Khosravi-Darani, K., Sohrabvandi, S., 2014. Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini Rev. Med. Chem.* 14, 84–98. <https://doi.org/10.2174/1389557513666131211105554>
- Zoghi, A., Massoud, R., Todorov, S.D., Chikindas, M.L., Popov, I., Smith, S., Khosravi-Darani, K., 2021. Role of the lactobacilli in food bio-decontamination: Friends with benefits. *Enzyme Microb. Technol.* 150, 109861. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109861>

BIOGRAFIJA

Emilija Z. Brdarić je rođena 14. jula 1992. godine, u Beogradu. Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet je upisala školske 2011/2012, studijska grupa - Molekularna biologija i fiziologija. Fakultet je završila u septembru 2015. godine sa prosečnom ocenom 9,21. Na istom fakultetu je završila master akademske studije 2016. godine modul - Molekularna biologija i fiziologija, studijska grupa - Genetičko inženjerstvo i biotehnologija, sa prosečnom ocenom 10,00. Master rad je uradila u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, pod nazivom: „Uloga egzopolisaharida mlečnokiselinskih bakterija u zaštiti Caco-2 ćelija od štetnog delovanja kadmijuma“ i odbranila u julu 2016. godine. U periodu osnovnih i master akademskih studija je nosilac Republičke stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisuje i doktorske studije školske 2016/2017, studijski program - Molekularna biologija, modul-Molekularna biologija prokariota. Kao član iste laboratorije je u junu 2017. izabrana u zvanje istraživač - pripravnik i angažovana na projektu OI173019: „Izučavanje gena i molekularnih mehanizama u osnovi probiotičke aktivnosti bakterija mlečne kiseline izolovanih sa područja Zapadnog Balkana“. U martu 2020. stiče zvanje istraživač - saradnik. Dobitnica je stipendije za tromesečno usavršavanje mladih istraživača u Asturiji, u Španiji. Učesnica je jednog projekta Fonda za nauku, tri projekta Fonda za inovacionu delatnost i jednog projekta fondacije „Pokreni se za nauku“. Autorka je i ko-autorka pet radova M21 kategorije i 12 saopštenja na međunarodnim i domaćim kongresima. Članica je Udruženja mikrobiologa Srbije i Srpskog društva za molekularnu biologiju.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Емилија З. Брдарић

Број индекса М3008/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Карактеризација молекуларних основа заштитног ефекта егзополисахарида
лактобацила у моделу ДА пацова изложених продуженом деловању кадмијума(II)**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, 29.03.2023.

Потпис аутора

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Емилија З. Брдарић

Број индекса M3008/2016

Студијски програм Молекулатна биологија; модул: молекуларна биологија прокариота

Наслов рада Карактеризација молекуларних основа заштитног ефекта егзополисахарида лактобацила у моделу ДА пацова изложених продуженом деловању кадмијума(II)

Ментори др Милица Живковић, др Бранко Јовчић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 29.03.2023.

Потпис аутора

Прилог 3

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Карактеризација молекуларних основа заштитног ефекта егзополисахарида лактобацила у моделу ДА пацова изложених продуженом деловању кадмијума(II)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 29.03.2023.

Потпис аутора

1. **Ауторство.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.