



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

Milena Stošić

**UTICAJ TRETMANA AKRILAMIDOM NA
ENDOKRINI PANKREAS PACOVA**

-doktorska disertacija-

Novi Sad, 2018. godina

Zahvaljujem se,

dr Jeleni Marković, mojoj mentorki, na spremnosti za rad sa mnom, na odlučnosti i nesebičnoj pomoći,

dr Milici Matavulj na pruženoj svesrdnoj pomoći da sprovedem ovo istraživanje, na korisnim savetima i podršci tokom izrade teze,

dr Danijeli Kojić za veliku stručnu pomoć i posvećenost u realizaciji praktičnog dela istraživanja koji je u vezi sa izučavanjem uticaja akrilamida na parametre oksidativnog stresa u Rin-5F ćelijama,

dr Verici Milošević i dr Mirjani Vojinović Miloradov na nesebičnom trudu i sugestijama koje su disertaciju podigle na viši nivo,

dr Vesni Rajković na iskrenoj, stručnoj i prijateljskoj pomoći i podršci za koje je imala snage u najtežim trenucima svog života,

kolegama za veliko strpljenje i bezrezervnu podršku,

porodici i prijateljima na безусловnoj ljubavi i veri u moj uspeh, zahvaljujući kojima sam imala snage da uspešno završim rad na ovoj doktorskoj disertaciji.

SADRŽAJ

POGLAVLJA

1.	UVOD	1
1.1.	PANKREAS	1
1.1.1.	Anatomija i morfologija pankreasa	1
1.2.	AKRILAMID	11
1.1.2.	Op-te karakteristike akrilamida	11
1.1.3.	Primena akrilamida	11
1.1.4.	Prisustvo akrilamida u namirnicama	12
1.1.5.	Metabolizam akrilamida i enzim CYP2E1	16
1.1.6.	Biomarkeri izlofenosti akrilamidu	17
1.1.7.	Negativni efekat akrilamida na biolo-ke sisteme	18
1.3.	OKSIDATIVNI I NITROZATIVNI STRES	22
1.3.1.	Pojam oksidativnog i nitrozativnog stresa	22
1.3.2.	Slobodni radikali	22
1.3.3.	Oksidativna o-te enja biomolekula	26
1.3.4.	Antioksidativni mehanizmi za-tite	28
1.3.5.	Uticaj akrilamida na pojavu oksidativnog stresa	34
1.4.	ELIJSKA SMRT	36
1.4.1.	Oksidativni stres i elijska smrt	36
1.4.2.	Apoptoza	37
1.4.3.	Bcl-2 familija proteina	39
2.	CILJEVI	40
3.	MATERIJAL I METODE	42
3.1.	EKSPERIMENTALNE FIVOTINJE	42
3.1.1.	Tretman i plan eksperimenta	42
3.1.2.	Obrada uzoraka pankreasa	42
3.1.3.	Histolo-ka i stereolo-ka analiza obojenih rezova pankreasa	44
3.1.4.	Kvantifikacija ekspresije proteina analizom digitalnih fotografija	48
3.1.5.	Priprema u serumu i odre ivanje koncentracije glukoze u serumu	49
3.2.	ELIJSKA KULTURA	49
3.2.1.	Tripsinizacija elija	49
3.2.2.	Priprema elijske suspenzije za sejanje na mikrotitar plo e	49
3.2.3.	Test vijabilnosti elija	50
3.2.4.	Priprema homogenata Rin-5F elija za odre ivanje aktivnosti antioksidativnih enzima	51
3.2.5.	Merenje koncentracije nitrta u supernatu elijske kulture Rin-5F elija	52
3.2.6.	Priprema homogenata Rin-5F elija i esej za odre ivanje lipidne peroksidacije	53
3.2.7.	Priprema homogenata Rin-5F elija i esej za odre ivanje redukovanoGSH i slobodnih -SH grupa proteina	54
3.2.8.	Merenje koncentracije proteina	55
3.2.9.	Lan ana reakcija polimeraze u realnom vremenu	55
3.3.	STATISTI KA OBRADA	57
4.	REZULTATI	58
4.1.	UTICAJ TRETMANA AKRILAMIDOM NA ENDOKRINI PANKREAS MUfJAKA PACOVA SOJA WISTAR, TRETIRANIH U JUVENILNOM PERIODU	58
4.1.1.	Op-ta mikroanatomska struktura Langerhansovih ostrvaca nakon primene akrilamida	58
4.1.2.	Dijametar i broj Langerhansovih ostrvaca nakon primene akrilamida	58
4.1.3.	Analiza kapilara Langerhansovih ostrvaca nakon primene akrilamida	59
4.1.4.	Stereolo-ka analiza - elija kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom	60
4.1.5.	Stereolo-ka analiza - elija kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom	64
4.1.6.	Analiza ekspresije odabranih proteina u elijama Langerhansovih ostrvaca kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom	68
4.1.7.	Analiza nivoa glukoze u serumu kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom	74
4.2.	UTICAJ TRETMANA AKRILAMIDOM NA RIN-5F ELIJSKU LINIJU	76
4.2.1.	Uticaj tretmana akrilamidom na vijabilnost Rin-5F elija	76
4.2.2.	Uticaj tretmana akrilamidom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne za-tite u Rin-5F elijama	77
4.2.3.	Uticaj tretmana akrilamidom na ekspresiju odabranih gena u Rin-5F elijama	81
5.	DISKUSIJA	88
5.1.	Uticaj tretmana akrilamidom na Langerhansova ostrvca pankreasa juvenilnih mufljaka pacova soja Wistar	88
5.2.	Uticaj tretmana akrilamidom na masu, funkciju i stereolo-ke parametre - i - elija Langerhansovih ostrvaca	89
5.3.	Efekat tretmana akrilamidom na pojavu oksidativnog i nitrozativnog stresa u elijama endokrinog pankreasa i Rin-5F elijskoj liniji	94
5.3.1.	Efekat tretmana akrilamidom na nivo NO ₂ i ekspresiju iNOS	95
5.3.2.	Efekat tretmana akrilamidom na antioksidativne enzime	98
5.3.3.	Efekat tretmana akrilamidom na transkripciju iRNK antioksidativnih enzima	99
5.3.4.	Efekat tretmana akrilamidom na slobodne óSH grupe i redukovani GSH	100
5.3.5.	Efekat tretmana akrilamidom na pojavu lipidne peroksidacije	101
5.4.	Efekat tretmana akrilamidom na aktivnost i ekspresiju CYP2E1 enzima	103
5.5.	Efekat tretmana akrilamidom na transkripciju gena za Bcl-2 i Bax	104
6.	ZAKLJUCCI	105
7.	REFERENCE	107

1. UVOD

1.1. PANKREAS

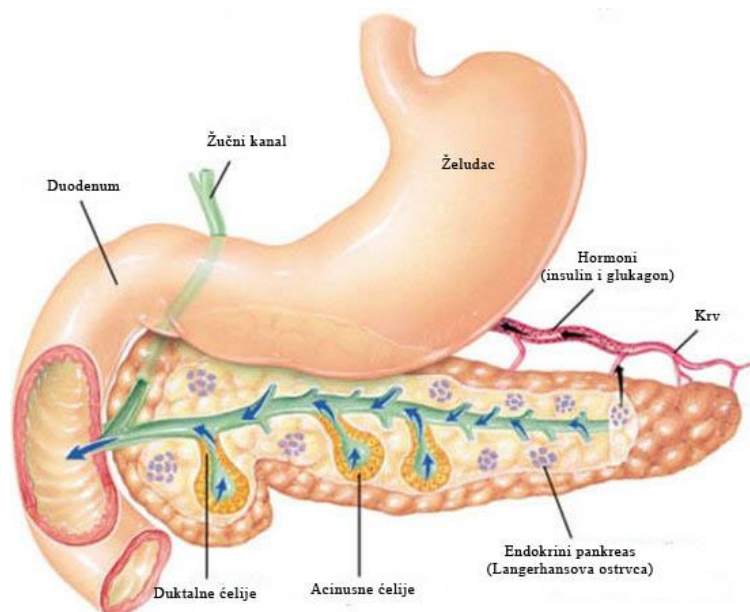
1.1.1. Anatomija i morfologija pankreasa

Pankreas (Sl. 1) je žlezda sa egzokrinom i endokrinom funkcijom koja anatomske i funkcionalno pripada digestivnom traktu. Sastoji se od egzokrinog i endokrinog tkiva, a sadrži i izvodne kanale (Collombat i sar., 2006). Kod sisara, pankreas je endodermalnog porekla i nastaje od embrionalnog prednjeg creva i kod adultnih sisara se nalazi u peritoneumu abdomena, iza želuca (Schoenwolf, 2014). Za ovaj organ je karakteristično da nema jasno diferencirane anatomske delove, međutim, prema specifičnom rasporedu vaskulature, pankreas može da se podeli na glavu, telo i rep (Collombat i sar., 2006). Glava leži u duodenalnoj krivini creva, dok se rep pankreasa nalazi u neposrednoj blizini slezine (Anđelković i sar., 2001). Embrionalni razvoj pankreasa započinje formiranjem dorzalne i ventralne evaginacije prednjeg creva, tj. formiranjem dorzalnog i ventralnog pankreasnog pupoljka čijim spajanjem nastaje ovaj organ. Dorzalni embrionalni pupoljak daje najveći deo pankreasa, dok je samo ventralni deo glavenog dela pankreasa poreklom od ventralnog pupoljka (Schoenwolf, 2014).

1.1.1.1. Egzokrini pankreas

Egzokrino tkivo pankreasa je serozno žlezdano tkivo i čini veći deo pankreasa, čak 98-99% ukupne zapremine organa (Anđelković i sar., 2001). Pankreas je vezivnim septama organizovan u lobuluse koji su građeni od sekretornih jedinica – acinusa, čiju strukturu sačinjavaju acinusne ćelije - pankreatociti. To su ćelije piramidalnog oblika i osnovni zadatak im je sinteza digestivnih enzima koji se sintetišu u zrnastom endoplazmatičnom retikulumu, odakle se transportuju u Goldžijev aparat, gde se pakuju u zimogene granule. Da bi se zaštitio integritet pankreasa, digestivni enzimi se nalaze u zimogenim granulama pankreocita u neaktivnoj formi. Kada dospeju u lumen duodenuma, enterokinaze konvertuju tripsinogen u tripsin koji, zatim, aktivira ostale enzime pankreasa (Anđelković i sar., 2001).

Digestivni enzimi iz acinusnih ćelija i elektroliti koje luče ćelije acinusnih izvodnih, interkalarnih, kanala se zajedno izlučuju u dvanaestopalačno crevo kroz glavni izvodni pankreasni kanal, Virsungov kanal (*ductus pancreaticus major – Wirsungi*) i pomažu u digestiji i apsorpciji nutrijenata iz digestivnog trakta. Virsungov kanal se proteže celom dužom osom organa i u duodenum se uliva preko jednog proširenja - Vaterove ampule. Pored glavnog, Virsungovog, kanala, u nekim slučajevima postoji i sporedni Santorinijev kanal, koji se takođe izliva u duodenum (Anđelković i sar., 2001).



Sl.1. Pankreas (Preuzeto uz modifikaciju sa internet stranice: <http://www.olivelab.org/the-pancreas-overview.html>)

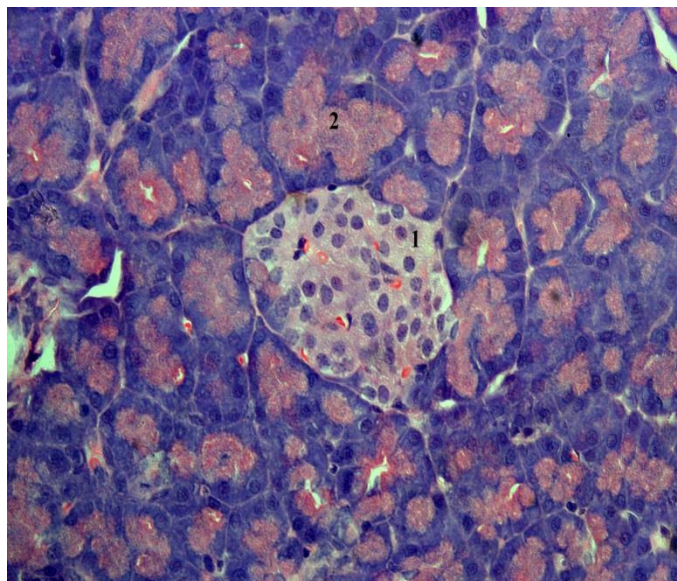
Sekrecija egzokrinog pankreasa je pod kontrolom hormona i nervnih impulsa. Prelazak kiselog himusa iz želuca u duodenum služi kao signal za lučenje sekretina i holecistokinina od strane njegovih enteroendokrinih ćelija. Uloga sekretina je da stimuliše ćelije interkalarnih kanala da luče tečnost sa visokom koncentracijom bikarbonantnih jona (HCO_3^-) čija uloga je da neutrališe kiselost želudačnog sadržaja u duodenumu i tako generiše povoljnu pH vrednost za aktivnost pankreasnih enzima (Ross i sar., 2002). Uloga holecistokinina je da stimuliše lučenje digestivnih enzima (Anđelković i sar., 2001). Osim hormonske regulacije, pankreas je i pod regulacijom autonomnog nervnog sistema (Ross i sar., 2002). Simpatička vlakna su zadužena za kontrolu protoka krvi kroz pankreas, dok su parasimpatička vlakna odgovorna za stimulaciju sekretorne aktivnosti pankreasa lučenjem acetilholina (Anđelković i sar., 2001).

1.1.1.2. Endokrini pankreas

Endokrini pankreas je organizovan u vidu grupacija endokrinih ćelija, Langerhansovih ostrvaca, koja su dobila ime po Polu Langerhansu (*Paul Langerhans, 1847-1888*) koji ih je prvi uočio u pankreasnom tkivu pre blizu 150 godina.

Langerhansova ostrvca (Sl. 2) čine oko 1-2% ukupnog volumena pankreasa i izgrađena su od heterogene populacije endokrinih ćelija koje su odgovorne za sintezu većeg broja hormona sa nizom različitih uloga u organizmu, među kojima je najvažnija ona koja se odnosi na metabolizam glukoze (Champe i sar., 2005). Pet tipova ćelija gradi Langerhansova ostrvca: α -ćelije, β -ćelije, δ -ćelije, PP-ćelije i ϵ -ćelije (Collombat i sar., 2006). Alfa-ćelije proizvode glukagon, hormon koji se luči kao odgovor na nizak nivo šećera u krvi, i ima zadatak da signalizira ciljnim tkivima da razgrađuju depoe glikogena ili stimuliše glukoneogenezu da bi se održala normoglikemija (Champe i sar., 2005). Beta-ćelije sintetizuju insulin koji se sekretuje kao odgovor na povišen nivo šećera u krvi i stimuliše ulazak glukoze u ćeliju gde može da se iskoristi kao energetska goriva, da se deponuju u vidu glikogena ili transformišu u masne kiseline. Insulin takođe inhibira glukoneogenezu u jetri (Champe i sar., 2005). Delta-ćelije sekretuju somatostatin koji ima niz različitih funkcija u organizmu koje se ostvaruju vezivanjem za 5 subtipova receptora (Portela-Gomes i sar., 2000). PP-ćelije sintetizuju pankreasni polipeptid, a

ϵ -ćelije gerlin (Champe i sar., 2005). Sekretija svih pankreasnih hormona je strogo regulisana i održava homeostazu glukoze uz aktivno delovanje perifernih tkiva kao što su jetra, mišići i adipozno tkivo (Jain i Lammert, 2009).



Sl. 2. Langerhansovo ostrvce u egzokrinom pankreasu. 1) Langerhansovo ostrvce, 2) acinusi egzokrinog pankreasa. H-E metoda bojenja. Uveličanje 400x.

U Langerhansovim ostrvcima glodara su najbrojnije β -ćelije (65-80%), a iza njih po brojnosti slede α -ćelije (15-20%). Ostale ćelijske grupe su zastupljene u malom procentu, od 3 do 5% (Elayat i sar., 1995). Za Langerhansova ostrvca pacova je karakteristično da su α - (Sl. 18) i δ -ćelije raspoređene po periferiji ostrva, dok β -ćelije (Sl. 11) zauzimaju centralni deo ostrva.

Specifična morfološka organizacija Langerhansovih ostrvaca kod pacova, gde β -ćelije čine centralni deo ostrvca, ukazuje na važnost bliskog kontakta ćelija ovog ćelijskog tipa za adekvatnu funkciju organa. Protok krvi unutar ostrvaca ide od β -ćelija ka α - i δ -ćelijama na periferiji ostrvca (B-A-D put) (Samols i sar., 1988). Ovakav put protoka krvi ima veze sa regulacijom lučenja hormona Langerhansovih ostrvaca. Sa druge strane, karakterističan način grupisanja endokrinih ćelija pankreasa kod glodara je u vezi i sa njihovim kontaktom preko pukotinastnih veza (eng. *gap junctions*) koji je električne prirode i omogućava da svi tipovi ćelija adekvatno reaguju na povišeni nivo glukoze kao celina (Benninger i sar., 2008). Ćelije Langerhansovih ostrvaca su inervisane i regulisane radom simpatičkog i parasimpatičkog nervnog sistema čime se obezbeđuje modulacija njihove aktivnosti na više nivoa, ne samo preko autokrine i parakrine regulacije.

Za razliku od ćelijske organizacije Langerhansovih ostrvaca kod glodara, u humanom pankreasu su endokrine ćelije relativno homogeno raspoređene po ostrvcu. Udeo α -ćelija u humanom endokrinom pankreasu je 33-46%, β -ćelija 48-59%, a δ -ćelije, PP-ćelije i ϵ -ćelije su zastupljene u malom procentu, kao i kod glodara (Cabrera i sar., 2006). Raspored endokrinih ćelija u humanom pankreasu koji se ne odlikuje karakterističnim redosledom u njihovom pozicioniranju već su svi tipovi ćelija u međusobnom kontaktu, ukazuje na to da je parakrina signalizacija među njima primarni put međućelijske komunikacije. Parakrina komunikacija između endokrinih ćelija pankreasa funkcioniše tako što insulin stimuliše β -ćelije dok istovremeno inhibira aktivnost α -ćelija, glukagon stimuliše α - i δ -ćelija, somatostatin inhibira aktivnost α - i β -ćelija, a grelin inhibira sekreciju insulina (Jain i Lammert, 2009). Homogeni raspored ćelijskih tipova

endokrinih ćelija pankreasa kod primata utiče na efikasnost funkcije β -ćelija, jer time omogućava da reaguju i na vrlo niske koncentracije glukoze u krvi (1 mM) na koje su β -ćelije u Langerhansovim ostrvcima glodara nereaktivne (Cabrera i sar., 2006).

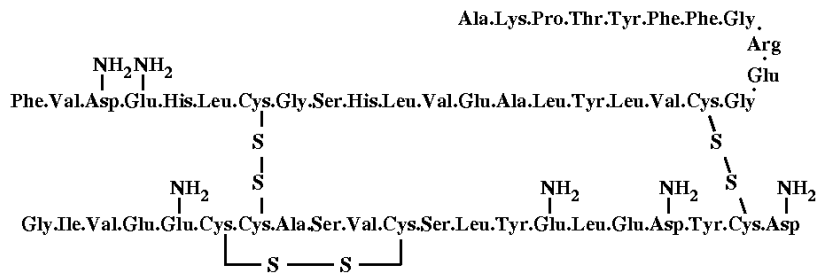
Neravnomerni raspored endokrinih ćelija u humanom pankreasu zahteva i specifičan tip krvotoka kroz ostrvo (Caicedo, 2013). Za razliku od krvotoka u ostrvcima glodara gde krv protiče redom kroz delove izgrađene od β -, α - i δ -ćelija, u humanim ostrvcima je to nemoguće budući da ne postoji region u ostrvcu koji je sagrađen od samo jednog ćelijskog tipa, već svih pet tipova endokrinih ćelija ostvaruje međusobni kontakt. U tom smislu je u humanim Langerhansovim ostrvcima moguća parakrina komunikacija i preko intersticijalnih prostora, ne samo preko krvotoka (Caicedo, 2013). Krvni sudovi u humanim Langerhansovim ostrvcima sadrže više glatke muskulature od krvnih sudova u ostrvcima kod miševa (Rodriguez-Diaz i sar., 2011). Zahvaljujući tome je moguća regulacija protoka krvi kroz ostrvce pošto su glatke mišićne ćelije u zidu krvnih sudova inervisane simpatičkim vlaknima i funkcionišu kao sfinkter. Pored simpatičke inervacije, moguće je da su i sfinkteri pod uticajem parakrinih signala koje luče endokrine ćelije, što znači da su endokrine ćelije verovatno u mogućnosti da regulišu protok krvi u Langerhansovom ostrvcu (Caicedo, 2013).

Telesna masa i masa pankreasa su u bliskoj korelaciji (Kim i sar., 2009). Ukupna masa β -ćelija se proporcionalno povećava u skladu sa telesnim zahtevima u različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima da bi kompenzovala potrebu za insulinom u datim okolnostima (Montanya i sar., 2000). Ta potreba za povećanom masom β -ćelija se nadoknađuje povećanjem broja ostrvaca, a ne povećanjem njihovog dijametra (Kim i sar., 2009). Prosečna veličina Langerhansovih ostrvaca je između 100 i 200 μm kod svih sisara, bez obzira na njihovu veličinu, što navodi na zaključak da postoje izvesne granice u dimenzijama Langerhansovih ostrvaca u okviru kojih ovaj endokrini organ zadržava optimalnu funkcionalnost (Jo i sar., 2007; Kim i sar., 2009). U tom smislu, nije veličina ostrvca ono što će razlikovati pankrease životinja koje se značajno razlikuju po dimenzijama, već njihov broj.

Masa β -ćelija je određena veličinom i brojem β -ćelija. Broj β -ćelija direktno zavisi od ravnoteže između neogeneze, replikacije i smrti β -ćelija (Montanya i sar., 2000). Opšte je prihvaćeno da tokom fetalnog perioda najveći broj β -ćelija nastaje u procesu diferencijacije iz prekursorskih ćelija, a da nakon rođenja najveći broj β -ćelija nastaje replikacijom već postojećih β -ćelija (Hellerström i sar., 1988). To znači da u postnatalnom periodu na broj β -ćelija utiče balans između replikacije i ćelijske smrti β -ćelija (Montanya i sar., 2000).

1.1.1.2.1. Insulin

Insulin (Sl. 3) je peptidni hormon koji sekretuju β -ćelije Langerhansovih ostrvaca pankreasa, čije osnovne uloge su održavanje normoglikemije omogućavanjem ulaska glukoze u ćelije, regulisanje metabolizma ugljenih hidrata, proteina i masti, i pozitivni uticaj na deobu ćelija i rast organizma zahvaljujući mitogenom efektom koji poseduje (Champe i sar., 2005).



Sl. 3. Struktura insulina (Preuzeto sa internet stranice: <http://www2.gvsu.edu/chm463/diabetes/insulin.html>)

Insulin je ključni hormon za regulaciju celularne energetike i balansa makronutrijenata, koji usmerava anaboličke procese tokom stanja sitosti (Champe i sar., 2005). Efekat insulina na metabolizam glukoze je posebno značajan u tri tkiva: jetri, mišićnom i adipoznom tkivu. U jetri insulin suprimira nastanak glukoze tako što inhibira glukoneogenezu i razlaganje glikogena. U mišićnom tkivu i jetri, insulin stimuliše sintezu glikogena, dok u mišićnom i adipoznom tkivu pojačava transport glukoze u ćelije ovih tkiva, povećavajući broj glukoznih transportera u ćelijskoj membrani (Champe i sar., 2005).

Insulin se sintetiše u β -ćelijama Langerhansovih ostrvaca pankreasa u vidu prekursora, preproinsulina koji se sastoji od 110 aminokiselina (Champe i sar., 2005). Delovanjem peptidaza u zrnastom endoplazmatičnom reitikulumu preproinsulin daje proinsulin koji se, zatim, savija i formiraju se disulfidni mostovi uz pomoć niza šaperonskih proteina zrnastog endoplazmatičnog reitikuluma, kao što su tiol-reduktaze (Fu i sar., 2013). Nakon stvaranja trodimenzionalne strukture, proinsulin se transportuje u Goldžijev aparat gde u sekretornim vezikulama prelazi u insulin i C-peptid. Insulin i C-peptid se nalaze u sekretornim granulama zajedno sa amilinom i drugim produktima sekrecije β -ćelija (Champe i sar., 2005). Biosintezu insulina kontroliše više faktora, međutim, glukozni metabolizam je najznačajniji fiziološki signal koji stimuliše transkripciju gena za insulin i translaciju nastale iRNK (Poitout i sar., 2006). Insulin predstavlja negativni signal za sopstvenu sekreciju iz β -ćelija. Istraživanja su pokazala da insulin učestvuje u nekoliko ćelijskih procesa u β -ćelijama uključujući regulaciju transkripcije gena za insulin i kasniju translaciju, propustljivost plazma membrane za katjone Ca^{2+} , i proliferaciju i preživljavanje β -ćelija (Leibiger i sar., 2008).

Konformacija molekula insulina zavisi od koncentracije u kojoj se insulin nalazi, kao i od pH vrednosti sredine. U zavisnosti od pomenutih faktora, insulinski molekul može da bude monomer, dimer ili heksamer (Fu i sar., 2013). Pri porastu koncentracije insulina, insulinski monomeri imaju tendenciju da stvaraju dimere. Ukoliko koncentracija insulina nastavi da raste, dimeri se u prisustvu katjona Zn^{2+} i pri adekvatnoj pH (10 mM Zn^{2+} i pH~6.0) udružuju i stvaraju heksamere (Smith i sar., 2003). Insulin se iz β -ćelija sekretuje u vidu heksamera, ali pošto se kroz krvotok kreće niz svoj koncentracijski gradijent, favorizuje se razlaganje heksamera insulina na monomerne jedinice. Monomerna forma je aktivna forma insulina, dok je heksamerna forma, forma u kojoj se insulin deponuje u ćeliji (Fu i sar., 2013).

Monomer insulina je izgrađen od dva polipeptidna lanca, "A" i "B". Insulinski molekul sadrži tri disulfidna mosta. Lanac "A" (21 aminokiselina) i lanac "B" (30 aminokiselina) su međusobno povezani sa dva disulfidna mosta (A7-B7, A20-B19), dok se treći disulfidni most nalazi unutar samog "A" lanca (A7-A11) (Fu i sar., 2013).

Beta-ćelije imaju sposobnost da sintetišu i nakupljaju velike količine insulina (Weir i Bonner-Weir, 2013). Insulin se u β -ćelijama nalazi u gusto pakovanim granulama u obliku nerastvornih insulinskih heksamera. Koncentracija insulina u ovim granulama je oko 40 mM (Fu i sar., 2013).

U β -ćeliji miša se nalazi blizu 13.000 insulinskih granula i one čine oko 10% ukupne zapremine β -ćelije, a svaka granula sadrži oko 200.000 insulinskih molekula (Fu i sar., 2013).

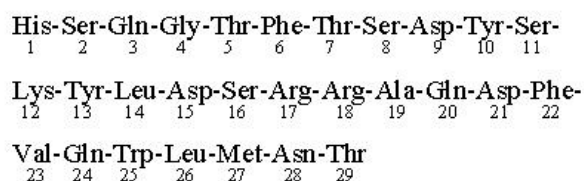
Beta-ćelije eksprimiraju i luče insulin u zavisnosti od promena u nivou nutrijenata u cirkulaciji (Weir i Bonner-Weir, 2013). Kada se izluči iz ćelije, insulin deluje u koordinaciji sa glukagonom i reguliše preuzimanje glukoze iz krvotoka, njeno korišćenje ili deponovanje. Glukoza je dominantan faktor koji kontroliše funkciju β -ćelija zahvaljujući glukoznom transporteru (GLUT 2) koji predstavlja mehanizam za prepoznavanje glukoze i reaguje na promenu njene ekstracelularne koncentracije. Nivo glukoze u krvi zdrave individue se kreće između 4 mM i 8 mM (Weir i Bonner-Weir, 2013). Sadržaj insulina u β -ćelijama je veoma dinamičan i povećava se u skladu sa prisustvom nutrijenata, a smanjuje kao odgovor na nedostatak nutrijenata (Fu i sar., 2013). Sekretija insulina iz Langerhansovih ostrvaca u portnu venu ima pulsativni karakter zbog postepenog nakupljanja insulina i koordinisanog lučenja iz miliona pankreasnih β -ćelija (Wilcox, 2005).

Sekretija insulina iz β -ćelija je kod zdravih individua bifazična. Prisustvo glukoze dovodi do "prve faze" sekrecije insulina koja se odlikuje brzim oslobađanjem insulina koji svoj pik ima 3-5 minuta nakon ulaska glukoze u krvotok, a traje oko 10 minuta (Kahn i sar., 1997). Oko 1% insulinskih granula je na raspolaganju za trenutno lučenje u krvotok kao odgovor na prisustvo glukoze (Olofsson i sar., 2002). Ostalih 99% insulinskih granula predstavlja "rezervni bazen" iz kojeg granule moraju da prođu kroz niz pripremnih reakcija da bi postale spremne da sekretuju insulin u krvotok. Pripremanje sekretornih insulinskih granula podrazumeva njihovu modifikaciju i translokaciju ka plazma membrani što je limitirajući faktor u kontekstu brzine insulinske egzocitoze (Fu i sar., 2013). Druga faza, postepena, blaža, sekrecije insulina sledi nakon početnog pika sekrecije i traje tokom cele faze hiperglikemije (Kahn i sar., 1997). Dok se u prvoj fazi sekretuje isključivo već sintetisani insulin, tokom druge faze se pored sintetisanog insulina sekretuje i novosintetisani insulin čiji signal za sintezu je nastala hiperglikemija (Wilcox, 2005). Sekretija insulina je kod zdravih individua uvek u saglasnosti sa količinom prisutne glukoze u krvi i zavisi od količine oralno unete glukoze, brzine pražnjenja želuca, apsorpcije glukoze iz gastrointestinalnog trakta, gastrointestinalnih hormona i nervnih signala iz gastrointestinalnog trakta što sve zajedno značajno modifikuje insulinski odgovor (Kahn, 1997). Sinteza i sekretija insulina je regulisana faktorima koji su u vezi sa unetim nutrijentima, ali i sa faktorima koji su u vezi sa stimulusima iz spoljašnje sredine i nezavisni su od unosa nutrijenata (Wilcox, 2005). Dva važna markera normalne funkcije β -ćelija su glukokinaza i glukozni transporter sa niskim afinitetom za glukozu (to je GLUT2 kod glodara, a u humanom pankreasu je to GLUT1). Glukokinaza je enzim koji katališe prvu reakciju glikolize, odnosno fosforilaciju glukoze, koja se dešava odmah po ulasku glukoze u ćeliju (Champe i sar., 2005). U tom smislu glukokinaza predstavlja svojevrsni senzor za glukozu. Povišeni nivo glukoze inicira prvu fazu sekrecije insulina iz sekretornih granula β -ćelija. Nakon ulaska glukoze u ćeliju i njene fosforilacije uz pomoć glukokinaze, započinje proces katabolizma glukoze koji povećava količinu ATP-a u ćeliji. Povećani ATP/ADP odnos izaziva zatvaranja ATP-zavisnih K^+ kanala i depolarizacije membrane što je signal za otvaranje potencijal-zavisnih kanala za Ca^{2+} , influks katjona Ca^{2+} i sekretiju hormona u krvotok (Caicedo, 2013). Iako je povećana koncentracija intracelularnog Ca^{2+} primarni signal za egzocitozu insulina izazvanu prisustvom glukoze, postoje i drugi ćelijski signali koje aktivira glukoza i koji imaju značajnu ulogu u ovom procesu. Tu spadaju cAMP, cGMP, inozitol 1, 4, 5-trifosfat (IP3) i diacil-glicerol (DAG) (Fu i sar., 2013). Nastanak cikličnog AMP-a i drugih intermedijera koji doprinose povećanju nivoa energije unutar

β -ćelija dodatno stimulišu oslobađanje insulina (Wilcox, 2005). Svi ovi dodatni faktori igraju značajnu ulogu u drugoj fazi sekrecije insulina, nakon translokacije sekretornih granula iz “rezervnog bazena” ka plazma membrani (Bratanova-Tochkova i sar., 2002). Faktori koji doprinose sekreciji insulina, a nemaju direktne veze sa nutrijentima najverovatnije deluju preko neuralnih stimulusa, kao što su holinergični i adrenergični put, preko peptidnih hormona i pozitivno naelektrisanih aminokiselina.

1.1.1.2.2. Glukagon

Glukagon (Sl. 4) je peptidni hormon, sačinjen od 29 aminokiselina, koji sintetišu α -ćelije Langerhansovih ostrvaca pankreasa. Osnovna uloga glukagona je da štiti od hipoglikemije i povećava nivo glukoze u krvi preko stimulacije glukoneogeneze i glikogenolize (Champe i sar., 2005).



Sl. 4. Struktura glukagona (Preuzeto sa internet stranice: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archiveid=12183>)

Glukagon se sintetiše kao veliki prekursorski molekul koji se nizom selektivnih proteolitičkih cepanja molekula prevodi u glukagon (Champe i sar., 2005). Sekrecija glukagona je prvenstveno regulisana preko nivoa glukoze u krvi koja izaziva promene u unutarćelijskoj produkciji ATP-a (Quesada i sar., 2008). Glukoza iz cirkulacije ulazi u α -ćelije pomoću GLUT1 transportera. Kada je nivo glukoze u krvi nizak, nizak ATP/ADP odnos u α -ćelijama drži ATP-zavisne kanale za K^+ otvorenim što vodi ka otvaranju T-tipa kanala za Ca^{2+} kada je potencijal membrane α -ćelija oko -60 mV (Bansal i Wang, 2010). Katjoni Ca^{2+} koji ulaze u ćeliju izazivaju depolarizaciju membrane i otvaranje voltažno zavisnih kanala za Na^+ i efluks Na^+ koji usled dodatne depolarizacije utiče na otvaranje L-tipa kanala za Ca^{2+} što rezultuje još većim influksom Ca^{2+} i egzocitozom granula glukagona. Kada je nivo glukoze u krvi visok, povišeni nivo ATP/ADP odnosa prouzrokuje zatvaranja ATP-zavisnih kanala za K^+ čime se sprečava i otvaranje T-tipa kanala za Ca^{2+} čime se inhibiraju i sukcesivni procesi na membrani koji bi doveli do egzocitoze granula glukagona (Bansal i Wang, 2010). Pored glukoze, sekreciju glukagona regulišu i masne kiseline kao i aminokiseline (Champe i sar., 2005). Sekrecije insulina i glukagona utiču jedna na drugu tako što insulin suprimira sekreciju glukagona, a glukagon podstiče lučenje insulina. U tom smislu, fiziološka uloga α -ćelija je da održava homeostazu glukoze u koordinaciji sa β -ćelijama.

Sekrecija glukagona je regulisana parakrinim delovanjem ostalih endokrinih ćelija Langerhansovih ostrvaca na α -ćelije. Parakrino delovanje insulina na α -ćelije je ključno i predstavlja najvažniji parakrini signalni mehanizam koji inhibira sekreciju glukagona, a regulacija se odvija na nivou regulacije membranskog potencijala α -ćelija (Quesada i sar., 2008). Osim što inhibira sekreciju glukagona, pokazano je da je insulin ključni signal za normalnu funkciju α -ćelija (Quesada i sar., 2008). Vezivanje insulina za insulinski receptor na α -ćelijama i aktivacijom fosfatidilinozitol-3-kinaznog (PIK3) signalnog puta se povećava osetljivost ATP-

zavisnog kanala za K^+ na molekul ATP-a (Leung i sar., 2006). Povećanjem aktivnosti ATP-zavisnog kanala za K^+ se inhibira sekrecija glukagona (Quesada i sar., 2008). Glukagon poseduje i autokrinu aktivnost u pankreasnim α -ćelijama povećavajući sopstvenu sekreciju vezivanjem za glukagonski receptor na α -ćelijama čime se stimuliše produkcija cAMP-a i povećava protein-kinaza A-zavisna egzocitoza glukagona (Quesada i sar., 2008).

Glukagon podstiče glikogenolizu u ćelijama jetre i oslobađanje glukoze u krv. Nakon stimulacije glukagonskih receptora na hepatocitima od strane glukagona dolazi do povećanja nivoa produkcije cAMP što ima za posledicu direktnu aktivaciju protein kinaze A. Protein kinaza A fosforiliše i aktivira enzim glikogen fosforilaza kinazu, koji, zatim, katališe reakciju fosforilacije i aktivacije glikogen fosforilaze (Exton, 1987). Glikogen fosforilaza "seče" molekul glikogena i oslobađa pojedinačne molekule glukoza-1-fosfata koji pomoću enzima fosfoglukomutaza i glukoza-6-fosfataza prelaze u glukoza-6-fosfat. Uklanjanjem fosfatne grupe sa glukoza-6-fosfata nastaje glukoza koja ulazi u krvotok (Exton, 1987). Pored oslobađanja glukoze iz rezervnih depoa, glukagon pojačava i glukoneogenezu u jetri (Jiang i Zhang, 2003). Protein kinaza A inhibira aktivnost glikogen sintaze čime sprečava sintezu glikogena (Exton, 1987).

1.1.1.3. Nastanak novih β -ćelija

Brojnost β -ćelija u *in vivo* uslovima se održava balansom između ćelijskog rasta i ćelijske smrti. Kod glodara dolazi do značajne reorganizacije endokrinog pankreasa u neonatalnom periodu pomoću intenzivne replikacije, neogeneze i apoptoze (Scaglia i sar., 1997). Pod normalnim uslovima, nakon rođenja prestaje nastanak novih endokrinih ćelija u pankreasu, međutim, postoje studije koje ukazuju na mogućnost endokrine regeneracije nakon povrede endokrinog tkiva (Bonner-Weir i Weir, 2005; Nir i sar., 2007; Rankin i Kushner, 2009).

Poznato je da se masa β -ćelija povećava tokom trudnoće (Nir i sar., 2007) i u stanjima insulinske rezistencije (Butler i sar., 2003), ali je za sada manje poznato kako dolazi do regeneracije β -ćelija nakon povrede tkiva usled dijabetesa. Autoimuni dijabetes je, obično, ireverzibilan, međutim, istraživanja na humanoj populaciji i na glodarima su pokazala da funkcija β -ćelija može delimično da se povрати kada se blokira autoimuni efekat (Bresson i sar., 2006; Suri i sar., 2006). Nakon hemijske ablacije 99% β -ćelija sa difterija toksinom, dolazi do regeneracije β -ćelija, međutim, ne od 1% preživelih β -ćelija, već od ćelija koje luče glukagon (Thorel i sar., 2010). Važno je naglasiti da do ovog procesa ne dolazi kada je oštećen manji procenat β -ćelija.

Postoje dva načina nastanka novih β -ćelija: 1. replikacijom od već postojećih β -ćelija i 2. neogenezom od nekog drugog tipa ćelija (Chung i Levine, 2010), gde spadaju diferencijacija duktalnih progenitorskih ćelija, diferencijacija progenitornih ćelija van duktalnog epitela i acinarna transdiferencijacija (Bonner-Weir i Weir, 2005). Najveći broj istraživanja na ovu temu je urađen na miševima za koje se zna da tip regeneracije u velikoj meri zavisi od stimulusa koji do regeneracije dovodi (Chung i Levine, 2010). Stepem plastičnosti adultnog pankreasa je mnogo veći nego što se ranije pretpostavljalo. U egzokrinom i endokrinom pankreasu postoji veliki broj različitih ćelijskih tipova, neke od njih su u mogućnosti da doprinesu regeneraciji β -ćelija, a koji tip će najviše doprineti regeneraciji zavisi od signala koji regeneraciju inicira (Levine i Itkin-Ansari, 2008). Ti signali mogu biti fiziološki (trudnoća, gojaznost), a regeneracija može da bude inicirana i povredom tkiva u vidu podvezivanja pankreasnog kanala, ablacije β -ćelija ili delimične pankreatomija (Chung i Levine, 2010).

1.1.1.2.3. Replikacija β -ćelija

Postoji značajan broj studija koje su se bavile proučavanjem replikacije β -ćelija (Sorenson i Brelje, 1997; Dor i sar., 2004; Hull i sar., 2005; Alonso i sar., 2007). Replikacija β -ćelija kod mladih adulta miševa može da se postigne sa nekoliko fizioloških ili eksperimentalnih modela kao što su gojaznost, infuzija glukozom, trudnoća, manipulacija ekspresijom hormona rasta i parcijalnom pankreatomijom (Brelje i sar., 1994; Sorenson i Brelje, 1997; Garcia-Ocana i sar., 2000; Hull i sar., 2005; Miettinen i sar., 2006; Alonso i sar., 2007). Pokazalo se da kod glodara sa uzrastom opada mogućnost replikacije β -ćelija (Tschen i sar., 2009).

Biologija β -ćelija kod ljudi se značajno razlikuje od one kod glodara. Pokazano je da humane β -ćelije imaju duži vek od glodarskih β -ćelija (Cnop i sar., 2010). Humana populacija β -ćelija je već u velikoj meri oformljena do 20. godine života i ostaje konstantna tokom ostatka života što sugeriše da je promena humanih β -ćelija retka pojava (Chung i Levine, 2010). Replikaciju humanih β -ćelija je teško pokazati u uslovima u kojima je ona kod glodara dokazana kao posledica dijabetesa tipa 2 (Butler i sar., 2003), trudnoće (Butler i sar., 2010) i parcijalne pankreatomije (Menge i sar., 2008). Smatra se da je replikacija β -ćelija najverovatnija u ranim stadijumima dijabetesa tipa 1, budući da kasnije, tokom bolesti, broj β -ćelija postaje i suviše mali da bi se replikovao (Chung i Levine, 2010).

1.1.1.2.4. Neogeneza β -ćelija od ćelija egzokrinog pankreasa

Zbog prisustva velikog broja različitih ćelijskih tipova u pankreasu, mnogi od njih su ispitivani kao potencijalni kandidati za proces neogeneze β -ćelija. Među njima su se kao najverovatniji kandidati pokazale acinarne ćelije, centroacinarne ćelije, duktalne ćelije i delta ćelije (Lardon i sar., 2004; Xu i sar., 2008; Zhou i sar., 2008; Houbracken i Bouwens, 2010). Ćelije duktalnog epitela su dugo smatrane za jedine ćelije koje učestvuju u procesu neogeneze β -ćelija kao progenitorne ćelije (Wang i sar., 1995). Toj tvrdnji su doprineli nalazi koji su pokazali da postoje insulin-prodružujuće ćelije u duktusu ili u njegovoj neposrednoj blizini. Istovremeno, i eksperimenti sa podvezivanjem pankreasnog kanala, kojim se izaziva povreda tkiva i gubitak β -ćelija, rezultuju naknadnim porastom u broju β -ćelija što nedvosmisleno ukazuje na neogenezu β -ćelijske mase nakon povrede tkiva (Wang i sar., 1995; Xu i sar., 2008). Takođe je kod ljudi sa hroničnim pankreatitisom pokazan povećan broj insulin-sekretujućih ćelija u duktusu (Phillips i sar., 2007). Iako postoje dokazi da je transdiferencijacija duktalnih ćelija pankreasa u β -ćelije moguća, stepen u kojem do toga dolazi je i dalje nejasan (Chung i Levine, 2010). *In vitro* istraživanja su pokazala da humane egzokrine ćelije mogu da se dediferenciraju u β -ćelije u humanom fetalnom pankreasu, međutim efikasnost ovog procesa je niska (Hao i sar., 2006).

1.1.1.2.5. Transdiferencijacija α - u β -ćelije

Transdiferencijacija β - iz α -ćelija je jedan od značajnih načina za regeneraciju izgubljene β -ćelijske mase (Nir i sar., 2007; Wang i sar., 2007; Chung i sar., 2010; Chung i Levine, 2010; Thorel i sar., 2010; Zaret i White, 2010). Chung i sar. (2010) su pokazali da nakon tretmana pankreasa sa aloksanom uz izvršeno parcijalno podvezivanje pankreasnog duktusa dolazi do masovnog odumiranja β -ćelija koje su posle 14 dana zamenjene novim ćelijama, nastalim neogenezom adultnih α -ćelija. Proces transdiferencijacije α - u β -ćelije podrazumeva i prisustvo intermedijarnih ćelija koje nastaju kada glukagon-pozitivne ćelije počinju da eksprimiraju

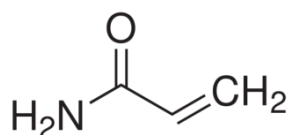
transkripcione faktore Pdx1 i Nkx6.1., karakteristične za β -ćelije (Chung i sar., 2010). U normalnim uslovima, adultne α -ćelije nisu visoko proliferativne, međutim, pod određenim okolnostima usled kojih dolazi do oštećenja insulin-sekretujućih ćelija, one počinju da se replikuju što rezultuje stvaranjem ćelijskog rezervoara iz kojeg će se regrutovati ćelije za transdiferencijaciju (Chung i sar., 2010; Thorel i sar., 2010). Pored ovog načina, uočeno je da α -ćelije mogu da se diferenciraju u β -ćelije direktnom konverzijom, bez prvobitne replikacije, čime se brže postiže normoglikemija (Chung i sar., 2010; Thorel i sar., 2010). Još nije poznato koji ćelijski signal je ključan za pojavu konverzije α - u β -ćelije (Chung i Levine, 2010). Podvezivanje pankreasnog kanala izaziva jaku ekspresiju citokina IL-1 α , IL-1 β , antagonista IL-1 receptora, IL-6, IL-10 i TNF- α , kao i drugih medijatora inflamacije: faktora aktivacije trombocita, supstance P i transkripcionog faktora NF- κ B u pankreasu (Steinle i sar, 1999; Bhatia i sar., 2000). Ipak, koji je od ovih signala primarni, još nije rasvetljeno, kao ni sam mehanizam ovog procesa. Još jedna nepoznanica u vezi sa procesom transdiferencijacije α - u β -ćelije je mera u kojoj treba da bude redukovana masa β -ćelija da bi započeo proces transdiferencijacije. Do sada su sva istraživanja na ovom polju rađena na eksperimentalnim modelima kod kojih je došlo do gotovo potpune ablacije β -ćelija (Chung i sar., 2010; Thorel i sar., 2010). Nir i sar. (2007) su difterijom postigli ablaciju β -ćelija u meri od 70-80%, međutim nisu uspeli da dokažu konverziju α - u β -ćelije u tim uslovima. To bi mogao da bude indikator da je za konverziju α - u β -ćelije neophodna gotovo potpuna destrukcija β -ćelija.

1.2. AKRILAMID

1.1.2. Opšte karakteristike akrilamida

Akrilamid (2-propenamid, C_3H_5NO , CAS No. 79-06-1) je hidrofilni molekul molarne mase 71,08 g/mol (Sl. 5). Na sobnoj temperaturi, akrilamid je bela i čvrsta supstanca bez mirisa, rastvorljiva u vodi i u drugim polarnim rastvaračima kao što su aceton i acetonitril. Akrilamid se formira na temperaturi između 90 i 100°C hidratacijom akrilonitrila monohidratnom sumpornom kiselinom pri čemu nastaje sulfatni rastvor. Neutralizacijom rastvora sa amonijakom dolazi do izdvajanja akrilamida, koji se zatim hladi i izdvaja kao kristalni monomer. Drugi način dobijanja akrilamida je direktna katalitička konverzija koja se dešava kada se vodeni rastvor akrilonitrila prevuče preko vrelog uglja uz prisustvo katjona bakra kao katalizatora na temperaturi između 25 i 200°C (EPA, 2010).

Akrilamid je karbonilni derivat sa dve funkcionalne grupe: amidnom grupom i dvostrukim vezama na α i β C – atomu što ga čini veoma reaktivnim i sposobnim da učestvuje u nizu različitih hemijskih reakcija (LoPachin i Gavin, 2012). Zahvaljujući prisustvu dvostrukih veza, akrilamid ima elektrofilna svojstva i može da reaguje sa nukleofilnim grupama među kojima je, u biološkom smislu, posebno značajna reakcija oksidacije tiolnih grupa iz cisteinskog dela molekula proteina (Dearfield i sar., 1995; Calleman, 1996). Reakcije karakteristične za amidnu reziduu uključuju hidrolizu, dehidrataciju, alkoholizu i kondenzaciju sa aldehidima, dok dvostruke veze omogućavaju reakcije sa amonijakom, alifatičnim aminima, hloridima, bromidima i proteinima (Friedman, 2003; Girma i sar., 2005).



Sl. 5. Formula akrilamida (Preuzeto sa internet stranice: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=04814320>)

Zahvaljujući vinilnoj dvostrukoj vezi, akrilamid lako stupa u reakcije sa drugim akrilamidnim molekulima pri čemu nastaje poliakrilamid (LoPachin i sar., 2008). Reakcije akrilamida sa proteinima se zasnivaju na reakciji sa sulfhidrilnom grupom (-SH) koja je karakteristična za aminokiselinu cistein, i amino grupom (-NH₂) koja ulazi u sastav svih aminokiselina. Najbolji primer za to je reakcija akrilamida i N-terminalnog valinskog ostatka u hemoglobinu pri čemu nastaju hemoglobinski adukti, veoma značajni biomarkeri izloženosti ovoj toksičnoj supstanci (Bergmark i sar., 1991; Tareke i sar., 2000). Akrilamid je sve prisutniji u životnoj sredini iako je biodegradabilan i nije bioakumulativan (Smith i sar., 1997). Količina produkovanog akrilamidnog monomera je porasla sa 75 miliona kg u 1998. godini na 93 miliona kg u 2003. godini (Parzefall, 2008).

1.1.3. Primena akrilamida

Akrilamid je hemijska supstanca koja ima veoma raznovrsnu primenu u svakodnevnom životu, naročito u poljoprivredi i industriji. Pre svega, akrilamid je građivna jedinica veoma široko korišćenog polimera poliakrilamida, koji se smatra za netoksični aditiv. Ipak, poliakrilamid može biti kontaminiran svojim monomerom, akrilamidom budući da poliakrilamid može da se

delimično razgradi u akrilamid kada je izložen svetlosti i povišenoj temperaturi (Smith i sar., 1997; Kitahara i sar., 2012).

Poliakrilamid ima veoma široku primenu u mnogim sferama života. Poliakrilamidni gel se koristi u laboratorijama za genetiku i molekularnu biologiju kao podloga za razdvajanje molekula metodom gel elektroforeze. Pored primene u naučnim istraživanjima, jedna od najčešćih primena poliakrilamida je u prečišćavanju otpadne i pijaće vode gde se koristi kao flokulant. Iako je sam poliakrilamid netoksičan, određena količina rezidua monomera može da se nađe u pijaćoj vodi. U Evropskoj Uniji je minimalno dozvoljeno prisustvo akrilamida u pijaćoj vodi određeno zakonskom odredbom i iznosi 0,1 µg/l (Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption). Imajući ovaj podatak u vidu i uz pretpostavku da je dnevni unos vode 2 litre, osoba težine 70 kg dnevno unosi dozu akrilamida od 0,003 µg/kg telesne mase (µg/kg tm) (Hogervorst, 2009). Poliakrilamid se, takođe, koristi u procesu proizvodnje papira (Bologna i sar., 1999), u sintezi boja, u proizvodnji kontaktnih sočiva, kao i u graditeljstvu kao supstanca koja ulazi u sastav cementa (Weideborg i sar., 2001). Poliakrilamid je našao upotrebu i u vodi za navodnjavanje gde ima ulogu da poboljša teksturu zemljišta i umanjí njegovu eroziju (Bologna i sar., 1999). Osim ovih primena koje su najčešće, poliakrilamid se koristi i kao dodatak pesticidima da bi im se povećala viskoznost, kao i za povećavanje viskoznosti medijuma koji se koristi za hidroponično gajenje biljaka, a prisutan je i kao aditiv u kozmetičkim sredstvima (Van Landingham i sar., 2004).

Pokazano je da toplota, sunčeva svetlost, fotohemijske reakcije i uslovi otvorene spoljašnje sredine utiču na depolimerizaciju poliakrilamida (Smith i sar., 1996). Analiza prisustva rezidualnog akrilamida u pasulju, kukuruzu, krompiru i šecernoj repi, koji su rasli u zemlji tretiranoj sa poliakrilamidom da bi se sprečila erozija, pokazuju nivo akrilamida manji od 10 ppb (eng. *part per billion*) (Bologna i sar., 1999). Akrilamid koji je apsorbovan od strane biljaka je većim delom degradiran u toku sledećih 18 h, međutim, sam mehanizam kojim ga biljke razgrađuju je još nepoznat (Castle, 1993).

1.1.4. Prisustvo akrilamida u namirnicama

Do nedavno se smatralo da je sav akrilamid u životnoj sredini industrijskog porekla. Švedski naučnici su krajem devedesetih godina XX veka otkrili da akrilamid može da se formira kada se namirnice bogate skrobom termički obrade na visokim temperaturama bez prisustva vode (Tareke i sar., 2000). Od tada su istraživačke grupe širom sveta potvrdile prisustvo akrilamida i izvršile kvantifikaciju njegovog prisustva u različitim namirnicama (Tab.1).

Tabela 1. Sadržaj akrilamida (AA) u izabranim namirnicama (Office of Environmental Health Hazard Assessment - OEHHA, 2005)

Namirnica	Broj ispitivanih uzoraka	Srednja vrednost sadržaja AA (ppb = µg/kg)	Izmerene granične vrednosti AA (µg/kg)
Bademi (prženi ili pečeni)	4	320	236 – 457
Integralni hleb	43	39	ND – 130
Beli hleb	17	11	ND – 36
Žitarice za doručak	104	86	11 – 266
Kafa (kuvana)	20	7	3 – 13
Keks	82	188	29 – 647
Kukuruzni čips	16	199	111 – 240
Krekeri	52	167	13 – 620
Pomfrit	52	413	117 – 1325
Konzervirane masline	19	414	123 – 1925
Kokice	15	180	97 – 352
Čips od krompira	54	466	117 – 2510
Pšenična zamena za kafu	2	4573	3747 – 5399
Tost	3	213	59 – 364
Pica	12	20	19 – 20
Puter od kikirikija	17	88	64 – 125
Palačinke i vafli	12	15	13 – 17

Prisustvo akrilamida u svakodnevnim namirnicama, sa posebno visokim prisustvom u proizvodima od žitarica i krompira je stvorilo uznemirenost u javnosti budući da je akrilamid na listi potencijalnih humanih kancerogena Internacionalne agencije za proučavanje kancera (eng. *International Agency for Research on Cancer, IARC*) (IARC, 1994). Među proizvodima od žitarica, najveći sadržaj akrilamida imaju pšenična zamena za kafu, hleb, peciva, biskviti, krekeri, kao i prerađene žitarice namenjene za doručak (Tab. 1). Kafa, zeleni čaj i proizvodi od kaka su, takođe, među namirnicama koje imaju visok sadržaj akrilamida (OEHHA, 2005).

Dnevni unos akrilamida može da se izračuna pomoću koncentracije ovog toksičnog monomera koji je oformio adukte sa hemoglobinom. Nivo od 30 pmol/g hemoglobina odgovara dnevnom unosu od oko 1,2 µg/kg, što iznosi 85 µg dnevno za osobu od 70 kg (Törnqvist i sar., 1995; Bergmark, 1997). Izmereno je da se prosečan unos kreće u opsegu od 0,3-2,0 µg/kg telesne mase

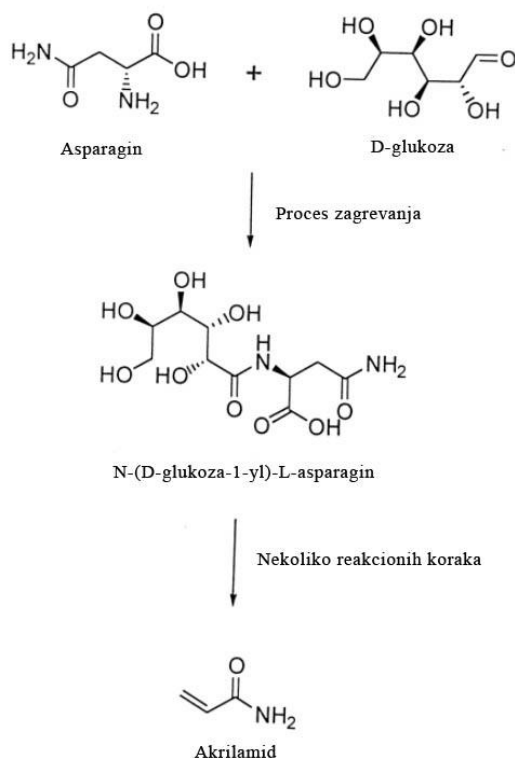
($\mu\text{g}/\text{kg tm}$), sa srednjom vrednosti od $1 \mu\text{g}/\text{kg tm}$, i od $0,6-5,5 \mu\text{g}/\text{kg tm}$, sa srednjom vrednosti od $4 \mu\text{g}/\text{kg tm}$, kod osoba sa visokim unosom namirnica bogatih akrilamidom (FAO/WHO, 2002). Veća izloženost akrilamidu se dobija kada se u obzir uzme i akrilamid iz duvanskog dima i kozmetičkih proizvoda. Tada se dobija vrednost i do $100 \mu\text{g}/\text{osobi na dan}$ (Tareke i sar., 2002). Smatra se da bi dugogodišnji unos ovim tempom mogao da dovede do različitih oboljenja (Törnqvist i sar., 1995). Unos akrilamida putem duvanskog dima je kod prosečnog pušača oko $3 \mu\text{g}/\text{kg tm}$ (Bergmark, 1997).

Akrilamid u hrani ne nastaje na prirodan način i spontano već ga najčešće možemo pronaći u hrani koja je pečena ili pržena na visokim temperaturama, gde nastaje kao produkt Milardove reakcije (Tareke i sar., 2000; Stadler i sar., 2002).

1.1.4.1. Nastanak akrilamida Milardovom reakcijom

Amino-karbonilne interakcije u hrani pri njenoj termičkoj obradi prženjem i pečenjem na temperaturi iznad 180°C se sastoje od niza reakcija između amina, amino kiselina, peptida i proteina sa jedne strane i redukujućih šećera sa druge strane i nose zajednički naziv Milardova reakcija (Friedman, 1996). Reakcija redukujućih šećera, najčešće glukoze i fruktoze, sa ostacima amino kiselina se odvija bez prisustva enzima i rezultuje formiranjem N-glikozida. Glavni put nastanka akrilamida u hrani podrazumeva Milardovu reakciju koja se odvija između redukovanih šećera i asparagina, aminokiseline koja je veoma zastupljena u krompiru i žitaricama (Sl. 6) (Stadler i sar., 2002; Yaylayan i sar., 2003). Reakcija je moguća i između metionina i različitih ugljenih hidrata. Svih 20 proteinogenih amino kiselina su individualno testirane kao potencijalni prekursori u nastanku akrilamida zagrevanjem na 180°C po 30 minuta, ali jedino metionin i asparagin dovode do stvaranja ove toksične supstance. Piroliza metionina, glutamina, cisteina i asparagina sa fruktozom, galaktozom, laktozom i saharozom takođe ima za rezultat stvaranje akrilamida (EPA, 2010). Milardova reakcija je veoma kompleksan sistem reakcija pa je za objašnjenje kinetike nastanka akrilamida potrebno pratiti više reaktanata istovremeno kao i izvršiti modelovanje prema *multi-response* modelima (Martins i sar., 2000).

Akrilamid u hrani nastaje na visokim temperaturama u uslovima kada se u njenoj pripremi ne koristi voda, kao što su pečenje, tostiranje, prženje ili grilovanje. Prilikom takve obrade hrane dolazi do pirolitičkih procesa kojima podležu ugljeni hidrati, proteini i masti. Da bi došlo do pirolize organskih molekula, neophodno je da se ostvari temperatura viša od 100°C jer do procesa pirolize neće doći dokle god ima slobodne vode budući da u prisustvu vode proteini i ugljeni hidrati podležu hidrolizi. Glukoza i aminokiseline asparagin, glutamin, metionin i cistein su odgovorni za nastanak akrilamida na temperaturama iznad 120°C (Stadler i sar., 2002), a dati poredak je u opadajućoj efikasnosti. Ipak, i pored toga što su određeni putevi nastanka akrilamida poznati, glavni intermedijeri nisu do kraja okarakterisani, pa u tom smislu i hemijske reakcije kojima detaljno opisujemo proces nastanka akrilamida ostaju jednim delom na nivou pretpostavke (Dybing i sar., 2005). Yasuhara i sar. (2003) smatraju da pod određenim okolnostima, akrilamid nastaje od amonijaka i akroleina, što objašnjava nastanak akrilamida u namirnicama bogatim lipidima. Biedermann i Grob (2003) su pokazali da je fruktoza efikasnija u procesu stvaranja akrilamida od glukoze i galaktoze zbog svoje niže tačke topljenja, a samim tim i postizanja veće reaktivnosti na nižim temperaturama. Na visokim temperaturama ($100-180^\circ\text{C}$), redukujući šećeri nisu neophodni za formiranje akrilamida, pošto dolazi do dekarboksilacije asparagina, nastanka 3-aminopropionamida, a onda i akrilamida (Granvolg i sar., 2004). Alternativni put nastanka je formiranje akrilamida iz glutena i alanina (Claus i sar., 2006).



Sl. 6. Formiranje akrilamida iz asparagina i glukoze (Friedman, 2003)

Koncentracija akrilamida u hrani je u direktnoj vezi sa nivoom asparagina u datim namirnicama, sa temperaturom na kojoj se hrana priprema i sa dužinom termičke obrade hrane (Friedman, 2003). Zbog toga mogu da postoje velika variranja u sadržaju akrilamida među namirnicama istog tipa, koje su odvojeno pripremane te nivo akrilamida u istoj namirnici može da varira od obroka do obroka. Ta pojava u mnogome stvara poteškoće u epidemiološkim studijama koje se baziraju na anketiranju ispitanika o njihovom unosu namirnica karakterističnih po prisustvu akrilamida pošto daje prostora za veliku grešku prilikom analize rezultata i izvođenja zaključka ispitivača. Postoji i nekoliko namirnica kod kojih akrilamid nastaje i onda kada je prisutna voda, kao što su sok od šljiva i konzervirane crne masline (Robin i Cianci, 2007).

1.1.4.2. Metode smanjenja prisustva akrilamida u namirnicama

Veliki broj istraživanja se danas bavi proučavanjem mogućnosti za izbegavanje ili smanjenje produkcije akrilamida u namirnicama (Amrein i sar., 2003; Zyzak i sar., 2003). Tehnike za smanjenje količine akrilamida u hrani se svode na smanjivanje količine slobodnog asparagina i redukujućih šećera, na promenu dužine termičke obrade namirnica, kao i na promene temperature na kojoj se namirnice pripremaju. U pomenute tehnike se ubraja i primena supstanci koje bi ometale produkciju akrilamida u hrani (aminokiseline, kalcijum, limunska kiselina). Treba naglasiti da nema univerzalne tehnike za redukciju akrilamida, već je svaka od tehnika povoljna za određeni tip namirnica. Tako na primer, još nije pronađena metoda kojom bi se redukovala koncentracija akrilamida u kafi, a da se to ne odrazi na njenu aromu (Dybing i sar., 2005). Budući da efikasnost određenog broja ovih tehnika nije dokazana u praksi, dalji rad na ovom polju je od velikog značaja. Za namirnice od krompira, limitirajući faktor za nastanak akrilamida je količina redukujućih šećera u sirovom krompiru, a za produkte od žitarica

limitirajući faktor je sadržaj asparagina (Hogervorst i sar., 2009). Pošto je sadržaj redukujućih šećera važan faktor za nastanak akrilamida u namirnicama od krompira, selekcija kultura koje su siromašnije u redukujućim šećerima predstavlja moguć metod umanjena sadržaja akrilamida (Amrein i sar., 2003). Vrlo je važno da se u procesu primene različitih metoda snižavanja prisustva akrilamida u namirnicama ne utiče na organoleptička svojstva produkta, što je najveći problem ovih metoda. Metod koji je u ovom pogledu najpogodniji je metod dodavanja asparaginaze, enzima koji razlaže asparagin i time u velikoj meri snižava produkciju akrilamida. Dodavanje asparaginaze redukuje sadržaj akrilamida u čipsu od krompira za 97% i u pomfritu za 80%, pri čemu ove namirnice zadržavaju svoju boju i odgovarajući ukus (Zyzak i sar., 2003). Limitirajući faktor nastanka akrilamida kod žitarica je sadržaj asparagina pa je od značaja biranje žitarica sa sniženom koncentracijom asparagina, kao i izbegavanje preteranog potamnjivanja namirnica tokom pečenja. Iako je primenom ovih metoda umanjen nastanak akrilamida u određenim namirnicama tokom industrijske proizvodnje, smanjena izloženost akrilamidu na nivou populacije je i dalje prepuštena slobodnom izboru pojedinca (Granath i Törnqvist, 2003).

1.1.5. Metabolizam akrilamida i enzim CYP2E1

Akrilamid je supstanca koja se lako i brzo apsorbuje iz vode i hrane oralnim putem, a lako se apsorbuje i prilikom kontakta sa kožom kao i prilikom inhalacije (Friedman, 2003). Zbog svoje hidrosolubilnosti, akrilamid se dobro rastvara u krvi i zahvaljujući tome se ravnomerno transportuje do svih sistema organa. Bioraspoloživost akrilamida nakon njegovog unosa preko hrane je 30-44%, dok se nakon unosa putem vode kreće od 60-98% (Doerge i sar., 2005). Izloženost akrilamidu počinje još tokom intrauterinog razvoja pošto je nizom istraživanja pokazano da 10-50% ishranom unetog akrilamida prolazi kroz placentalnu barijeru (Sörgel i sar., 2002, Schettgen i sar. 2004, von Stedingk i sar., 2011), a njegov unos se nastavlja i nakon gestacijskog perioda pošto akrilamid može da se nađe u humanom mleku (Fohgelberg i sar., 2005).

Akrilamid se u organizmu metaboliše na dva osnovna načina koja nisu podjednako zastupljena. Prvi je kod ljudi daleko češći i zasniva se na konjugaciji akrilamida sa glutathionom (GSH), a drugi način je oksidativna transformacija akrilamida sa citohromom P450 2E1 (CYP2E1; EC 1.14.13) do glicidamida (Sumner i sar., 1999; Parzefall, 2008). Inaktivacija akrilamida preko konjugacije sa GSH je reakcija koju katališe enzim glutathion *S*-transferaza (GST) (Settels i sar., 2008). Reakcija akrilamida sa GSH rezultuje nastankom cistein-*S*-konjugata koji pomoću enzima *N*-acetil-transferaze daju *N*-acetil-*L*-cistein-*S*-konjugate, tj. metabolite akrilamida i merkapturane kiseline (AAMA) koji se iz organizma izlučuju urinom (Hinchman i Ballatori, 1994).

Drugi način inaktivacije apsorbovanog akrilamida se odvija pomoću enzima CYP2E1, monooksigenaze koja predstavlja jedan od evolutivno najbolje očuvanih citohroma P450 (CYP enzima). CYP enzimi se najviše eksprimiraju u zrnastom endoplazmatičnom retikulumu hepatocita, ali su prisutni i u ćelijama većine drugih tkiva i odgovorni su za oko 75% reakcija metabolizma lekova (Guengerich, 2008). Enzim CYP2E1 je membranski protein za koji su karakteristične reakcije metabolisanja velikog broja toksičnih supstanci, prokarcinogena i karcinogena koji ulaze u organizam iz spoljašnje sredine (Rendic i Carlo, 1997). Najčešći supstrati za CYP2E1 enzim su polarni polutanti male molekulske mase među kojima je i akrilamid. Reakcija inaktivacije koju katališe enzim CYP2E1 ima za rezultat oksigenaciju

dvostruke veze u molekulu akrilamida, pri čemu nastaje glicidamid koji, kao i akrilamid, poseduje elektrofilnu reaktivnost (Calleman i sar., 1996; Settels i sar., 2008).

Koji od dva opisana metabolička puta eliminacije akrilamida iz organizma će preovladati, zavisi od vrste organizma koji je bio izložen ovom ksenobiotiku (Shipp i sar., 2006). Fennell i sar. (2005) su pokazali da u jetri glodara preovlađuje oksidacija akrilamida u glicidamid, dok je kod ljudi daleko češća konjugacija akrilamida sa GSH. Istraživanja su pokazala da je stepen oksidacije akrilamida u glicidamid viši kod miševa u odnosu na pacove, a najniži kod ljudi (Sumner i sar., 1997; Fennell i sar., 2005). Stepenu oksidacije akrilamida je intenzivniji prilikom unošenja nižih doza u odnosu na oksidaciju kod izloženosti visokim dozama ove toksične supstance (Calleman i sar., 1992).

Kao elektrofilni molekuli, akrilamid i glicidamid imaju sposobnost da reaguju sa celularnim nukleofilnim centrima kao što su sulfhidrilne (tiole, -SH) i amino (-NH₂) grupe. Produkti ove reakcije su akrilamidni i glicidamidni adukti. Akrilamid i glicidamid se međusobno razlikuju po afinitetu prema grupama sa kojima stvaraju adukate. U poređenju sa glicidamidom, akrilamid ima veći afinitet prema -SH grupi zbog čega lako reaguje sa proteinima, a manju reaktivnost pokazuje prema DNK (Solomon i sar., 1985; Bergmark i sar., 1993). Sa druge strane, glicidamid lakše formira adukate sa -NH₂ grupom u bazama nukleotida, što sugeriše da je glicidamid značajniji molekul kada se govori o procesu genotoksičnosti i karcinogeneze (Gamboa da Costa i sar., 2003). Zbog većeg afiniteta prema proteinima, akrilamid je značajniji u kontekstu neurotoksičnosti (Dybing i sar., 2005). U humanoj populaciji, adukti glicidamida sa DNK su ređi nego kod pacova i miševa (Fennell i sar., 2005; Parzefall, 2008). Eliminacija nastalog glicidamida iz organizma se odvija prvenstveno putem konjugacije sa GSH. Krajnji rezultat ove konjugacije je nastanak metabolita glicidamida i merkapturane kiseline i njihova eliminacija preko urina (Settels i sar., 2008). Jedan deo glicidamida može biti hidrolizovan pomoću enzima epoksid hidrolaze pri čemu nastaje gliceramid (Sumner i sar., 1999), ali se i jedan deo akrilamida i glicidamida u neizmenjenom obliku eliminiše urinom (Fennell i sar., 2005).

1.1.6. Biomarkeri izloženosti akrilamidu

Da bi se registrovala potencijalna izloženost mutagenima/kancerogenima, važno je da postoji mogućnost da se detektuju, identifikuju i izmere doze genotoksičnih supstanci, njihovih metabolita i produkata reakcija sa biomolekulima *in vivo*. Pokazalo se da su adukti akrilamida sa proteinima pogodniji za praćenje od adukata sa DNK, jer nisu podvrgnuti dejstvu ćelijskih reparacionih mehanizama (Skipper i Tannenbaum, 1990). Iako postoji mnogo različitih proteina koji formiraju adukate, odabran je hemoglobin (Hb) zbog svoje lake dostupnosti i značajnog prisustva u krvi (Törnqvist i sar., 2002). Životni vek hemoglobina je 120 dana, a adukti se akumuliraju usled hronične izloženosti zahvaljujući čemu može da se izračuna *in vivo* koncentracija akrilamida i glicidamida za četvoromesečni period pre uzimanja uzorka krvi (Törnqvist i sar., 2002).

Akrilamidni adukti sa Hb (karbamoil - etil - valin) se mere da bi se stekao orijentacioni uvid u unos akrilamida na dnevnom nivou. Najniži nivo ovih hemoglobinskih biomarkera je uočen kod ljudi koji nisu izloženi delovanju akrilamida na radnom mestu, niti su izloženi duvanskom dimu (12 - 70 pmol/g globina za akrilamidne adukate) (Bergmark i sar., 1993; Bergmark, 1997; Schettgen i sar., 2003). Ta vrednost prisutnih biomarkera je nazvana *background* izloženost. Prosečan nivo Hb adukata kod laboratorijskih radnika koji su u kontaktu sa akrilamidom je 54

pmol/g globina i 152 pmol/g globina kod pušača. Globalni *background* nivo je oko 31 pmol/g što se poklapa sa prosečnim dnevnim unosom od 0,8 µg/kg tm (Hagmar i sar., 2005). Ovi podaci pokazuju da je izloženost akrilamidu svakodnevna i opšta (Parzefall, 2008).

1.1.7. Negativni efekat akrilamida na biološke sisteme

Negativni efekat akrilamida na žive, biološke, sisteme je već poznat i dokazan. Negativni efekti mogu biti raznoliki, u zavisnosti od toga da li se radi o posledicama dejstva akrilamida, ili njegovog metabolita glicidamida, tj. da li je posmatrani efekat posledica delovanja na protein i njegovu fiziološku ulogu ili direktno na DNK (LoPachin i Decaprio, 2005). Takođe, može da se posmatra efekat akrilamida na različite žive sisteme, počevši od bakterija pa do sisarskih organizama. Akrilamid nema mutageni efekat na bakterije, čak i posle metaboličke aktivacije, dok glicidamid izaziva mutageni efekat kod sojeva *Salmonella* TA100 i TA1535 (Hashimoto i Tanii, 1985). Jedna studija je pokazala da akrilamid ima bifazični efekat na dužinu života nematoda (Hasegawa i sar., 2004). Vrlo niska doza akrilamida od 0,5 µg/l medijuma u kojem se gaje nematode značajno smanjuje njihov životni vek, dok se pri dozi od 5 mg/l životni vek nematoda vraća u normalu, da bi na dozi od 500 mg/l ponovo počeo da se skraćuje (Hasegawa i sar., 2004).

U skoro svim studijama o dejstvu akrilamida na laboratorijske životinje korišćen je čist akrilamid, a poznato je da tokom Milarдове reakcije u hrani koja se termički obrađuje pored akrilamida nastaju još neki produkti koji su potencijalno toksični. Zbog toga, uticaj akrilamida poreklom iz namirnica predstavlja rezultat izloženosti kombinovanoj grupi jedinjenja, u koje su ubraja i glicidamid, koji je i dalje nedovoljno poznat (Chaudry i sar., 2006). Jedan od načina da se posmatra izdvojeni efekat akrilamida u odnosu na glicidamid je da se u *in vivo* studiji životinje prvo izlažu pred-tretmanu sa 1-aminobenzotriazolom koji predstavlja nespecifični inhibitor enzima CYP2E1, usled čega dolazi do ukidanja ili umanjenog prelaska akrilamida u glicidamid (Adler i sar., 2000).

1.1.7.1. Neurotoksičnost akrilamida

Jedna od najočiglednijih i jedina dokazana i bogato dokumentovana posledica izloženosti ljudi akrilamidu je pojava neurotoksičnosti (LoPachin, 2004). Neurotoksičnost dovodi organizam u stanje koje se karakteriše simptomima kao što su ataksija, slabost distalnih skeletnih mišića, utrnulost stopala i šaka. Niz studija i eksperimenata su pokazali da je akrilamid neurotoksičan i za ljude i za laboratorijske životinje. LoPachin (2002) je pokazao da je neurotoksičnost akrilamida kumulativnog karaktera. Iako su prosečne doze dnevnog unosa akrilamida veoma niske i reda veličine ppb, kumulativna priroda toksičnosti akrilamida je izrazito značajna kada se govori o izloženosti ljudi ovoj supstanci, budući da se unosi na dnevnom nivou, celog života. U tom smislu je poželjno da buduće studije posvete pažnju hroničnom efektu niskih doza akrilamida na žive sisteme.

Pored toga što se značajan deo akrilamida u telu metaboliše u glicidamid, dokazano je da je baš akrilamid odgovoran za neurotoksične efekte (Barber i sar., 2001). Posle tretmana akrilamidom dolazi do remećenja neurotransmisije na krajevima aferentnih nerava iz kičmene moždine koji idu ka perifernim neuro-muskularnim vezama (Abelli i sar., 1991). Nervni završeci su primarno mesto dejstva akrilamida pri čemu dolazi do njihove degeneracije i sinaptičke disfunkcije

(LoPachin i sar., 2002). Zahvaljujući svojoj strukturi, akrilamid $\text{CH}_2=\text{CH}-$ krajem može da stupa u hidrofobne interakcije, dok njegov $-\text{CONH}_2$ kraj stupa u interakciju sa hidriranim ćelijskim komponentama. Na taj način akrilamid može da utiče na strukturu ćelijske membrane i ubrzava proces sopstvene difuzije u nervne završetke (Friedman, 2003). Najverovatniji mehanizam delovanja akrilamida na terminalne krajeve nerava je njegovo negativno dejstvo na procese fuzije membrana tokom sinaptičkog transporta (LoPachin i sar., 2004). Do toga dolazi tako što akrilamid ometa formiranje ili rastavljanje 7s kompleksa proteina koji omogućavaju sinaptički transport i fuziju membrana. Oštećenje terminalnih delova nerava u CNS i PNS izaziva senzornu, motornu i autonomnu disfunkciju koja karakteriše neurotoksični efekat akrilamida. Postoji jasna dozno-zavisna veza između nivoa hemoglobinskih adukata akrilamida i demijelinacije na aksonima i perifernim nervima kao i pojave neuroloških efekata (LoPachin i Gavin, 2012).

1.1.7.2. Efekat akrilamida na reprodukciju i razvoj

Akrilamid u dozi od nekoliko mg/kg tm utiče kod životinja negativno na rast embriona (Manson i sar., 2005). Analizama krvi majke i krvi iz pupčane vrpce, kao i merenjem hemoglobinskih adukata je dokazano da se akrilamid nalazi u krvi fetusa i dovodi do smanjene telesne težine ploda (Schettgen i sar., 2004; von Stedingk i sar., 2011). Tretman laboratorijskih životinja sa akrilamidom je doveo do smanjenja u količini masnog tkiva, do smanjenja veličine jetre i bubrega, zategnutosti mokraćne bešike, zadebljanja zida želuca i atrofije skeletne muskulature (NTP-ATSDR, 2012).

Izlaganje mužjaka i ženki pacova dozama akrilamida od 50 - 200 mg/l rastvorenog u vodi, pre parenja i tokom perioda gestacije i laktacije je imalo za posledicu smetnje u samom procesu parenja, smanjenje telesne težine i smanjeni unos hrane, kao i smanjene telesne težine mladunca i sporije napredovanje tokom perioda laktacije (Zenick i sar., 1986). Akrilamid negativno deluje i na reprodukciju umanjujući fertilitnost i broj mladunaca kod ženki, kao i kvalitet i broj spermatozoida kod mužjaka (Chapin i sar., 1995; Wise i sar., 1995). Molekularni mehanizam toksičnog efekta na reprodukciju može da bude rezultat nekoliko procesa, a to su alkilacija -SH grupa u nukleusu i repu spermatozoida, snižavanje nivoa gonado-stimulirajućeg hormona i oštećenje na DNK testisa (Dearfeld i sar., 1995). Oralni tretman akrilamidom, takođe, rezultuje testikularnom atrofijom, smanjenom koncentracijom serumskog testosterona, degeneracijom spermatogonija, spermatocita i spermatida, smanjenjem broja i pokretljivosti spermatozoida, kao i pojavom multijedarnih džinovskih ćelija u testisima miševa i pacova (Wang i sar., 2010; Hamdy i sar., 2012; Nixon i sar., 2012). Pošto akrilamid prolazi kroz placentalnu barijeru, jasno je da ima direktan efekat na plod koji se, osim kroz smanjenje telesne težine, manifestuje i kroz pojavu oksidativnog stresa i patološkog razvoja nervnog sistema, poremećaja u razvoju skeleta, kao i poremećaja u motorici i brzini reagovanja (Ferguson i sar., 2010; Allam i sar., 2011; El-Sayyad i sar., 2011; Ogawa i sar., 2011).

1.1.7.3. Karcinogeni efekat akrilamida

Kada se govori o negativnom efektu akrilamida, veoma značajno mesto zauzima njegova karcinogeneza, kako kod laboratorijskih životinja tako i kod ljudi. Akrilamid se prema Internacionalnoj agenciji za proučavanje kancera i Američkoj agenciji za zaštitu životne sredine

(eng. *US Environmental Protection Agency - EPA*) svrstava u moguće humane karcinogene. Akrilamid kod pacova izaziva povećanu pojavu tumora na mlečnim žlezdama, centralnom nervnom sistemu, folikularnom epitelu tireoidne žlezde, oralnom epitelu, uterusu, hipofizi, nadbubrežnoj žlezdi i skrotalnom mezotelijumu (Johnson i sar., 1986; Friedman i sar., 1995). Iako je karcinogeni efekat akrilamida kod glodara očigledan i dokazan, epidemiološke studije koje se bave problematikom veze između akrilamida i pojave karcinoma kod ljudi nisu dale konzistentne rezultate. Postoje studije koje ukazuju na pozitivnu vezu između profesionalne izloženosti akrilamidu i pojavi karcinoma (Sobel i sar., 1986; Schulz i sar., 2001), kao i da postoji izvesna pozitivna korelacija između izloženosti akrilamidu i pojavi karcinoma ovarijuma (Hogervorst i sar., 2007), endometrijuma (Hogervorst i sar., 2007), bubrega (Hogervorst i sar., 2008) i estrogen pozitivnog karcinoma dojke kod žena u postmenopauzi (Olesen i sar., 2008). Schulz i sar. (2001) posebno skreću pažnju na moguću vezu između profesionalne izloženosti akrilamidu i pojavi karcinoma pankreasa. Sa druge strane, pozitivna korelacija u izloženosti akrilamidu i pojavi karcinoma nije uočena na mokraćnoj bešici (Mucci i sar., 2003; Hogervorst i sar., 2008), prostati (Hogervorst i sar., 2008), debelom crevu (Mucci i sar., 2006), bubregu (Mucci i sar., 2004) i dojki (Hogervorst i sar., 2007). Istovremeno, niz eksperimenata urađenih *in vivo* i *in vitro* pokazuju da akrilamid dovodi do stvaranja tumora na mlečnim žlezdama, plućima, digestivnom i reproduktivnom traktu pacova (Johnson i sar., 1986; Friedman i sar., 1995; Park i sar., 2002). Akrilamid se spominje i kao ko-karcinogen, jer pojačava efekat drugog karcinogena (Raju i sar., 2013; Yener i sar., 2013).

Iako studije o profesionalnoj izloženosti akrilamidu (Marsh i sar., 1999; Schulz i sar., 2001) pokazuju da je u grupi radnika koja je najduže bila izložena ovoj supstanci došlo do dupliranje rizika za pojavu karcinoma pankreasa, pokazalo se da se kod proračuna o izloženosti ovoj toksičnoj supstanci nije vodilo računa o činjenici da se ona unosi i preko duvanskog dima. Kada je i taj faktor uzet u obzir, profesionalna izloženost akrilamidu nije imala statistički signifikantan uticaj na pojavu karcinoma pankreasa (Marsh i sar., 2007). Važno je uočiti da je do korekcije došlo samo u kontekstu izloženosti akrilamidu na radnom mestu i pojavi karcinoma pankreasa, a ne i generalnoj izloženosti akrilamidu, koja i dalje ostaje kao potencijalni rizik.

1.1.7.4. Genotoksični efekat akrilamida

Jedan od glavnih parametara prilikom procene potencijalne karcinogenosti neke supstance je sposobnost posmatranog jedinjenja da izazove oštećenja na genima. Najčešći put kojim akrilamid ostvaruje svoju genotoksičnost je putem njegovog epoksida, glicidamida, koji ima daleko veći afinitet prema DNK od akrilamida (Solomon i sar., 1985). U osnovi genotoksičnog efekta glicidamida stoji vezivanje ovog molekula u *in vitro* i *in vivo* uslovima za guanin (N7) i adenin (N1) pozicije na DNK, nakon čega dolazi do alkilovanja DNK (Friedman, 2003).

Akrilamid nema mutageni efekat na bakterija, dok glicidamid ima (Knaap i sar., 1988). Klastogeni efekat akrilamida u *in vitro* uslovima je uočen u humanim limfocitima i hepatocitima, u kojima je došlo do razmene između sestrinskih hromatida, do ometanja mitoze i pucanja pojedinačnih niti DNK (Baum i sar., 2005; Jiang i sar., 2007). Klastogeni efekat *in vivo* je pokazan u ćelijama koštane srži kod miša i u eritrocitima iz periferne cirkulacije (Adler i sar., 1988; Paulsson i sar., 2003).

Akrilamid i u *in vitro* i *in vivo* uslovima dovodi do formiranja mikronukleusa u spermatogonijama, spermatocitima i spermatidama (Sega i Generoso, 1990), a kod miševa i

pacova dovodi i do dominantnih letalnih mutacija (Shelby i sar., 1987). Međutim, i pored ovog nalaza da akrilamid može da dovede do pojave letalnih mutacija, njegov genotoksični efekat je prvenstveno klastogen. Genotoksični efekat je daleko karakterističniji za glicidamid nego sa akrilamid (Ghanayem i sar., 2005; Wang i sar., 2010). Uočeno je da je genotoksični potencijal akrilamida pojačan prisustvom etanola koji ima efekat pojačavanja dejstva enzima CYP2E1 (Đorđević i sar., 1998). To otkriće je značajno zbog činjenice da se hrana bogata akrilamidom neretko konzumira uz alkohol.

1.1.7.5. Efekat akrilamida na endokrini sistem

Rezultati mnogih studija su pokazali da akrilamid može da se svrsta u grupu supstanci koje remete rad endokrinog sistema, koje se još nazivaju i endokrini ometači. Izloženost akrilamidu remeti regulaciju određenih gena koji učestvuju u hormonskom metabolizmu (Mei i sar., 2008). Yang i sar. (2005a i 2005b) i Hamdy i sar. (2012) su ukazali na to da akrilamid može da poremeti normalnu funkciju testisa, što, kao što je već rečeno, ima značajan efekat na dalji razvoj i reprodukciju. Najveći broj studija koje su se bavile ometajućim potencijalom akrilamida na endokrini sistem, su posmatrale efekat ove supstance na tireoidnu žlezdu. Khan i sar. (1999) su pokazali da akrilamid kod tretiranih pacova redukuje nivo hormona trijodtironina (T3) i tiroksina (T4) u dozno-zavisnom maniru. Mannaa i sar. (2006) su rezultatima svoje studije potvrdili da akrilamid remeti aktivnost tireoidne žlezde. Naime, u njihovoj studiji je kratkotrajni tretman sa visokom dozom akrilamida značajno redukovao nivo T3 i T4 u serumu ženki pacova. U skladu sa tim su i rezultati studije Hamdy i sar. (2012) koji su ovu redukciju u nivou T3 i T4 pokazali i nakon tretmana sa nižim dozama akrilamida.

Osim na tireoideu, akrilamid deluje i na nadbubrežnu žlezdu. Rezultati studije Mannaa i sar. (2006) ukazuju na signifikantan pad u nivou serumskog kortikosterona kod ženki pacova nakon tretmana akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm. Hamdy i sar. (2012) su takođe pokazali da akrilamid izaziva pojavu oksidativnog stresa u nadbubrežnim žlezdama što značajno i dozno-zavisno snižava nivo kortikosterona u plazmi tretiranih pacova.

1.3. OKSIDATIVNI I NITROZATIVNI STRES

1.3.1. Pojam oksidativnog i nitrozativnog stresa

Aerobni metabolizam je nastao tokom evolucije kao tip metabolizma koji je aerobnim živim sistemima omogućio veću energetska produktivnost. Ipak, aerobni metabolizam je doneo i izvesne negativne posledice u vidu nastanka slobodnih radikala, koji su neizbežni produkti ovog metaboličkog puta (Dröge, 2002). Pojam oksidativni stres je prvi put upotrebio Helmut Sies koji ga je definisao kao “neravnotežu između oksidanata i antioksidanata, u korist oksidanata, što potencijalno vodi ka ćelijskom oštećenju” (Sies, 1985). Halliwell i Guttridge (2015) oksidativni stres, takođe, definišu kao narušenu ravnotežu u produkciji ROS sa jedne strane, i enzimskog i neenzimskog ćelijskog antioksidativnog sistema, sa druge strane. Paralelni proces oksidativnom stresu je nitrozativni stres koji nastaje u situaciji povišene produkcije RNS koja prevazilazi kapacitet antioksidativnog ćelijskog sistema (Klanrodf i Van Dyke, 2012).

Posledice oksidativnog i nitrozativnog stresa na žive sisteme su mnoge i u njihovoj osnovi se nalaze promene na gotovo svim makromolekulima. Povišen nivo ROS i RNS dovodi do toga da su procesi oksidacije i nitrozilacije u ćeliji intenzivniji od antioksidativnih procesa i procesa redukcije što ima za rezultat oštećenja na lipidima, proteinima ili na DNK, čime se remeti prirodan tok fizioloških procesa. Zbog toga se oksidativni i nitrozativni stres nalaze u osnovi velikog broja patofizioloških procesa kao što su dijabetes melitus (Subash-Babu i sar., 2014), arteroskleroza (Harrison i sar., 2003), autoimuna (Shah i Sinha, 2013) i neurodegenerativna oboljenja (Schulz i sar., 2000), ali i maligne (Pham-Huy i sar., 2008) i inflamatorne bolesti (Reuter i sar., 2010).

1.3.2. Slobodni radikali

Slobodni radikali su prvi put opisani pre više od jednog veka (Gomberg, 1900), i dugo nisu bili adekvatno registrovani u biološkim sistemima zbog njihove visoke reaktivnosti i, samim tim, kratkog poluživota (Lushchak, 2014). Gershman i sar. (1954) su prvi registrovali slobodne radikale u biološkim sistemima. Iako je polje istraživanja slobodnih radikala jedno od najdinamičnijih u današnjoj nauci, ono se i dalje suočava sa problemima. Kao što je već rečeno, slobodni radikali su zbog svoje visoke reaktivnosti veoma nestabilni i samim tim prisutni u veoma niskim koncentracijama. Uz to, veoma je teško pratiti metaboličku sudbinu slobodnih radikala zbog velikog broja različitih reakcionih puteva u kojima mogu da učestvuju, pa je njihova prostorna distribucija u ćeliji i van nje, komplikovana i nepredvidiva. Takođe, ne treba izgubiti iz vida činjenicu da koncentracija slobodnih radikala u velikoj meri zavisi od fiziološkog stanja organizma pa je i u tom smislu promenljiva (Lushchak, 2014).

Slobodni radikali su atomi, atomske grupe i molekuli koji sadrže nesparene elektrone u svom valentnom energetskom nivou i često nastaju kao jedan od produkata ćelijskih oksidacionih procesa (Hayyan i sar., 2016). Nespareni elektroni obezbeđuju slobodnim radikalima visoku elektrofilnu reaktivnost zbog čega su se kod svih aerobnih organizama razvili antioksidativni mehanizmi odbrane kao evolutivni odgovor na metabolizam u kojem je krajnji akceptor redukcionih ekvivalenata kiseonik (Dröge, 2002).

Slobodni radikali se kontinuirano produkuju u ćeliji i predstavljaju aktivne participante u raznolikim fiziološkim procesima (Pham-Huy i sar., 2008). Kada su prisutni u niskoj

koncentraciji, slobodni radikali imaju značajnu ulogu u procesu ćelijskog rasta i sazrevanja ćelijskih struktura. Pored toga, neutrofilni, makrofagi i monociti oslobađaju slobodne radikale u procesu tokom kojeg uništavaju patogene mikroorganizme (Dröge, 2002). Slobodni radikali igraju veoma važnu ulogu i u ćelijskoj signalnoj transdukciji, u modulaciji protoka krvi i nervnoj aktivnosti, ali i u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja i programiranoj ćelijskoj smrti – apoptozi (Pham-Huy i sar., 2008). Slobodni radikali, u niskim koncentracijama, spadaju u ključne molekulske vrste odgovorne za zdravlje i normalno funkcionisanje organizma.

Kao što je već napisano, slobodni radikali nastaju tokom normalnih, esencijalnih, metaboličkih enzimskih i neenzimskih procesa u organizmu, ali do njihove produkcije može da dođe i usled delovanja izvesnih egzogenih faktora kao što su izloženost X-zracima, dimu od cigareta, različitim zagađujućim supstancama iz vazduha, alkoholu i industrijskim hemikalijama (Lobo i sar., 2010; Halliwell i Gutteridge, 2015). Enzimske reakcije koje su izvor slobodnih radikala su, pre svega, reakcije koje su u vezi sa procesima na respiratornom lancu mitohondrija, ali i one koje su u vezi sa fagocitozom, sintezom prostaglandina i sa sistemom citohroma P-450 (Lobo i sar., 2010). Neenzimski procesi u kojima nastaju slobodni radikali su reakcije kiseonika sa organskim molekulima, kao i procesi koje inicira jonizujuće zračenje (Pham-Huy i sar., 2008). Takođe, neki od procesa na respiratornom lancu mogu da budu i neenzimski (Dröge, 2002).

Pored termina slobodni radikali, u literaturi se koriste i pojmovi reaktivne vrste kiseonika (ROS) i reaktivne vrste azota (RNS). Naime, termini ROS i RNS su širi pojam od slobodnih radikala, budući da u sebe uključuju kako slobodne radikale, tako i neradikalne molekule visoke reaktivnosti elektrofilnog karaktera (Lushchak, 2014). U reaktivna kiseonična jedinjenja se ubraja nekoliko slobodnih radikala: superoksidni anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal (OH^{\cdot}), hidroperoksid radikal (HO_2^{\cdot}), alkoksil radikal (RO^{\cdot}) i peroksid radikal (RO_2^{\cdot}), ali i nekoliko neradikalnih molekula kao što su singlet kiseonik (1O_2), vodonik peroksid (H_2O_2), hipohlorasta kiselina ($HOCl$), ozon (O_3) i organski peroksid ($ROOH$). Reaktivna jedinjenja azota su azotmonoksidni radikal (NO^{\cdot}) i peroksininitrit ($ONOO^{\cdot}$) koji nije radikalni molekul (Valko i sar., 2007).

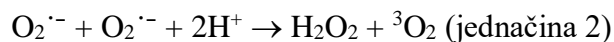
1.3.2.1. Superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$)

Superoksidni jon se smatra primarnim ROS koji prvenstveno nastaje u mitohondrijama, redukcijom kiseoničnog molekula sa jednim elektronom (jed. 1) (Ott i sar., 2007).



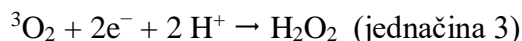
Iako ima veoma visok potencijal nastanka, $O_2^{\cdot-}$ je umereno reaktivan radikal sa poluživotom od 2-4 μs . Sa druge strane, dolazeći u dodir sa susednim stabilnim molekulima, lako stvara sekundarne ROS koji su reaktivniji (Valko i sar., 2007). Elektron-transportni lanac na unutrašnjoj membrani mitohondrija je odgovoran za stvaranje ATP-a i u tom smislu je esencijalan za sve metaboličke procese. Određeni broj elektrona uspeva da “siđe” sa transportnog lanca i da sa molekulom kiseonika formira $O_2^{\cdot-}$ (Dröge, 2002). Naročito kritično mesto na kojem elektroni silaze sa elektron-transportnog lanca je spoj kompleksa I (NADH – koenzim Q reduktaza) i kompleksa III (koenzim Q - citohrom *c* reduktaza). Oko 1-3% svih elektrona u transportnom lancu dovodi do stvaranja $O_2^{\cdot-}$ radikala (Valko i sar., 2007).

Dismutacija $O_2^{\cdot-}$ može da se odigra spontano, sa drugim molekulima $O_2^{\cdot-}$, ili katalisano od strane enzima SOD, pri čemu nastaje H_2O_2 (jed. 2) (Valko i sar., 2007).



1.3.2.2. Vodonik peroksid (H_2O_2)

Vodonik peroksid spada u reaktivne kiseonične vrste, ali nije slobodni radikal. Vodonik peroksid nastaje nepotpunom redukcijom O_2 sa dva elektrona (jed. 3) (Halliwell i Gutteridge, 2015).



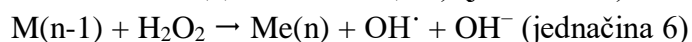
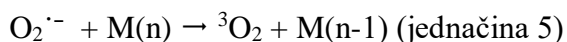
U biološkim sistemima, H_2O_2 nastaje u katalitičkom procesu dismutacije $O_2^{\cdot-}$ delovanjem enzima SOD (jed. 2), ali može da nastane i u enzimskim reakcijama koje katališu ksantin oksidaza, urat oksidaza, mono-amin oksidaze, glukozo oksidaze i oksidaze D-aminokiselina (Halliwell i Gutteridge, 2015). Vodonik peroksid nastaje pre svega u peroksizomima, mada može da nastane i u mitohondrijama, endoplazmatičnom retikulumu i ćelijskim membranama. Vodonik peroksid ima citotoksični kapacitet jer može da oksiduje $-SH$ grupe proteina, čime ih inaktivira (Halliwell i Gutteridge, 2015). Vodonik peroksid je jedan od inicijatora procesa lipidne peroksidacije (Valko i sar., 2007).

1.3.2.3. Hidroksil radikal (OH^{\cdot})

Nastanak OH^{\cdot} radikala je, najčešće, iz H_2O_2 Haber-Weiss-ovom reakcijom (jed. 4):



Prvi korak nastanka OH^{\cdot} radikala u *in vivo* uslovima je redukcija jona prelaznih metala kao katalizatora u Fentonovoj reakciji od strane $O_2^{\cdot-}$ radikala (jed. 5 i 6) (Lipinski, 2011):



Katjon gvožđa je zahvaljujući svojoj sposobnosti da bude oksidovan i redukovan, esencijalni konstituent niza proteina koji su uključeni u oksido-redukционе procese. Pored katjona gvožđa, katjoni mangana i bakra su, takođe, deo oksido-redukcionih procesa u biološkim sistemima (Winterbourn, 1995).

Hidroksil radikal je veoma reaktivan molekul sa poluživotom od 10^{-9} s koji zbog ovako kratkog poluživota reaguje sa najbližim stabilnim molekulom koji se u tom momentu nalazi na mestu njegovog nastanka. Zbog visoke reaktivnosti, OH^{\cdot} , uz $O_2^{\cdot-}$, predstavlja najreaktivniji slobodni kiseonični radikal (Lipinski, 2011).

1.3.2.4. Azot oksid radikal (NO[•])

Najčešće reaktivno jedinjenje azota u organizmu je NO[•] radikal koji sadrži jedan nespareni elektron. Azot oksid (NO[•]) spada u osnovne unutarćelijske signalne molekule sa celim spektrom različitih fizioloških i patofizioloških odgovora koje može da izazove u različitim tkivima, pre svega kardiovaskularnom i nervnom tkivu, kao i u imunom sistemu. Azot oksid je gasoviti molekul, kratkog poluživota, koji veoma lako i brzo procesima difuzije prelazi sa mesta svoje sinteze do mesta dejstva, i može da ima oprečno dejstvo u ćelijama (Aktan, 2004). Sa jedne strane, NO[•] je ključni signalni molekul u velikom broju fizioloških procesa, međutim, kao slobodni radikal NO[•] može da deluje kao citotoksični agens u patofiziološkim procesima, naročito u upalnim procesima (Aktan, 2004). Azot oksid brzo reaguje sa kiseonikom pri čemu se oksiduje do nitrita i nitrata. Azot oksidnom radikal se često pripisuju citotoksična svojstva, međutim, sve je veći broj dokaza da je citotoksični efekat NO[•] radikala posledica delovanja peroksinitrita koji nastaje u reakciji između NO[•] i O₂^{•-} (Pacher i sar., 2007).

1.3.2.4.1. Inducibilna azot oksid sintetaza (iNOS)

Azot oksid nastaje u gotovo svim ćelijama pod dejstvom specifičnih azot oksid sintetaza koje metabolišu arginin u citrulin, pri čemu nastaje NO[•] (Valko i sar., 2007). Postoje četiri glavne izoforme azot oksid sintetaza (NOS): neuralna NOS (nNOS), endotelijalna NOS (eNOS), inducibilna NOS (iNOS) i mitohondrijalna NOS (mtNOS). Neuralna i inducibilna NOS su solubilne forme ovog enzima, dok je eNOS membranski vezani protein (Liu i sar., 1995). Neuralna, endotelijalna i mitohondrijalna NOS su Ca²⁺/kalmodulin zavisne izoforme koje konstitutivno sintetišu niske koncentracije NO[•] i konstatno su prisutne u zdravim ćelijama (Aktan, 2004). Sa druge strane, inducibilna azot oksid sintetaza je Ca²⁺/kalmodulin nezavisna izoforma NOS koja je odgovorna za pojačanu sintezu NO[•] i aktivna je, uglavnom, u patološkim stanjima (Soskic i sar., 2011). Signal za sintezu iNOS su citokini, ali i bakterijski metaboliti ili infekcije (Aktan, 2004). Različiti tipovi ćelija mogu da sintetišu iNOS kao odgovor na prisustvo patogena jer NO[•] radikal ima zaštitnu, antimikrobnu, antiviralnu, antiparazitsku i antitumorsku ulogu (Bogdan, 2001). Pokazano je da NO[•] nastao dejstvom iNOS može da bude uključen u patološka stanja kao što su astma, arteroskleroza, reumatoidni artritis, artritis, multipleks skleroza, odbijanje transplantata, septični šok i dijabetes, i da vodi ka uništenju ćelije u kojoj je sintetisan (Kröncke i sar., 1998). Beta-ćelije pankreasa su posebno osetljive na dejstvo NO[•] budući da je za njih karakterističan nizak nivo enzima koji uklanjaju slobodne radikale (Spinass, 1999). Povećana aktivnost iNOS u β-ćelijama je pokazana kod dijabetesa tipa 1 i tipa 2 (Muhammed i sar., 2012), kao i kod akutnog pankreatitisa (Quader i sar., 2003). Važno je naglasiti da samo NO[•] poreklom od iNOS ima negativan efekat na β-ćelije i izaziva pojavu dijabetesa, dok nNOS i eNOS imaju fiziološku i regulatornu ulogu u sekreciji insulina (Eckersten i Henningson, 2012; Keklikoglu i Akinci, 2013).

1.3.2.5. Peroksinitritni jon (ONOO⁻)

Ćelije imunog sistema stvaraju i superoksidni i azot oksidni radikal tokom procesa inflamacije, što stvara uslove da dođe do reakcije ova dva slobodna radikala (jed. 7) (Lipinski, 2011):



Produkt ove reakcije je ONOO^- anjon koji izaziva lipidnu peroksidaciju i oštećenje ćelijskih membranoznih struktura, kao i fragmentaciju DNK (Pacher i sar., 2007). Reakcija nastanka ONOO^- , pored toga što dovodi do stvaranja agresivnog peroksinitritnog anjona, istovremeno smanjuje koncentraciju raspoloživog NO^\cdot u ćeliji. Pošto se reakcija produkcije ONOO^- odvija tri puta brže od reakcije kojom SOD katališe dismutaciju $\text{O}_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 , funkcija NO^\cdot u fiziološkim procesima bioloških sistema se značajno umanjuje (Pacher i sar., 2007).

1.3.3. Oksidativna oštećenja biomolekula

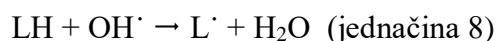
Kao što je već napomenuto, slobodni radikali i drugi reaktivni kiseonični i azotni molekuli nastaju u fiziološkim uslovima i imaju mnoge važne uloge u normalnom ćelijskom metabolizmu. Kada su deo fizioloških procesa, ROS i RNS se nalaze i deluju u niskim koncentracijama, a njihova produkcija se nalazi pod kontrolom ćelijskih antioksidativnih mehanizama (Dröge, 2002). U uslovima kada se ova ravnoteža naruši, dolazi do pojačanog nastanka ROS i RNS čije reaktivno dejstvo na biomolekule uvodi ćeliju u stanje oksidativnog ili nitrozativnog stresa (Valko i sar., 2007).

Proteini su zbog uloge koju imaju u svim metaboličkim putevima visoko prisutni u svim ćelijama, i zbog toga su među prvim biomolekulima sa kojima ROS i RNS dolaze u kontakt. Reaktivne kiseonične i azotne vrste mogu da promene strukturu proteinima na svim nivoima, od primarnog do kvarternog (kod proteina sa više subjedinica) (Dalle-Donne i sar., 2006). Oksidativna oštećenja na proteinima nastaju ili direktnim delovanjem ROS i RNS na proteine, ili indirektno, reakcijom proteina sa sekundarnim produktima oksidativnog i nitrozativnog stresa. Oksidacija proteina se odvija na tri moguća načina: oksidativnom modifikacijom bočnih nizova na gotovo svim aminokiselinama, cepanjem peptidne veze i formiranjem različitih proteinskih spojeva (Stadtman i Berlett, 1997; Davies i sar., 2005). Oksidativni i nitrozativni stres mogu da dovedu do reverzibilnih i ireverzibilnih modifikacija na proteinskim molekulima (Dalle-Donne i sar., 2006). Aminokiseline koje su najosetljivije na delovanje ROS i RNS su, pre svega cistein, ali i metionin, arginin i histidin, što proteine u čiji sastav ulaze ove aminokiseline čini najpodložnijim oksidaciji (Stadtman, 2004). Oksidacija $-\text{SH}$ grupe cisteina može da rezultira reverzibilnim formiranjem disulfidnih mostova između proteina i tiola male molekulske mase, kao što je glutation (GSH), ali i do stvaranja novih intra- i inter-molekulskih veza zbog čega dolazi do promene u konformaciji i funkciji proteina (Dalle-Donne i sar., 2006). U oksidativne promene na proteinima spada i proces karbonilacije. Karbonilacija proteina je ireverzibilni proces zbog čega su karbonilne grupe veoma pogodan biomarker oksidativnih promena na proteinima. Karbonilovani proteini ne mogu da povrate svoju strukturu i funkciju pa se ili uklanjaju procesom proteolitičke degradacije, ili se, što je daleko češće, akumuliraju u ćeliji i van nje (Davies, 2005). Zbog smanjenog kapaciteta da ukloni oksidovane proteine, akumulacija nefunkcionalnih proteina je sve veća i teče do momenta kada ovi proteinski agregati ne izazovu metaboličku disfunkciju i inicijaciju apoptotoze ili nekoze (Dalle-Donne i sar., 2006). Kao posledica povećane koncentracije RNS dolazi do nitrozativne modifikacije proteina, najčešće na cisteinskim ostacima. Metaboliti NO^\cdot radikala (N_2O_3 i ONOO^-) mogu da formiraju adukte sa $-\text{SH}$ grupama, kada nastaju *S*-nitrozotioli (Dalle-Donne i sar., 2006).

Najveći broj oksidativnih oštećenja koja se dešavaju na proteinima su ireverzibilna što ima velike posledice u ćelijskoj funkciji jer dolazi do inhibicije enzimske i receptorne aktivnosti,

pojačane podložnosti ka agregaciji proteina kao i proteolizi, ali i promenjenom status imunog sistema (Grune i sar., 2003; Requena i sar., 2003; Dalle-Donne i sar., 2006). Reaktivna vrsta koja najčešće dovodi do oksidativnih oštećenja na proteinima je ONOO⁻ (Lobo i sar., 2010).

Nezasićeni fosfolipidi su posebno osetljivi na oksidacione procese u ćeliji (Siems i sar., 1995). Lipidna peroksidacija je lančana radikalska reakcija koja igra važnu ulogu u oštećenju strukture ćelijske membrane i time menja njenu fiziološku funkciju. Najčešći inicijator lipidne peroksidacije je OH[·] radikal koji reaguje sa nezasićenom masnom kiselinom na mestu dvostruke veze. Kao rezultat reakcije, molekul lipida daje veoma reaktivni lipidni-radikal (L[·]) koji vrlo brzo reaguje sa kiseonikom dajući lipidni peroksil radikal (LOO[·]) koji sa susednom nezasićenom masnom kiselinom daje lipidni peroksid (LOOH) i novi L[·] čime se reakcija širi dalje (jed. 8-10).



Na ovaj način teče lančani proces lipidne peroksidacije čiji krajnji produkt su malonaldehidi (MDA), koji se koriste kao biomarkeri oksidativnog oštećenja fosfolipida (Valko i sar., 2007).

Oksidovane masne kiseline u fosfolipidima membrane nakon peroksidacije postaju polarnije, pa se skraćuju zbog prisustva aldehidne ili hidrosiperoksidne grupe (Porter i sar., 1995). Na taj način lipidna peroksidacija dovodi do fizičkih oštećenja na lipidnom dvosloju membrane što za posledicu ima promenu u permeabilnosti membrane zbog povišenog mikroviskoziteta u delovima membrane gde se dodiruju lipidni radikali (Stark, 1991). Lipidna peroksidacija bioloških membrana rezultuje gubitkom fluidnosti membrane, promenom u membranskom potencijalu i povećanoj propustljivosti membrane (Ghorbel i sar., 2017). Lipidna peroksidacija se dovodi u vezu sa različitim bolestima kao što su Parkinsonova i Alchajmerova bolest (Butterfield i Sultana, 2001), arteroskleroza (Diaz i sar., 1997) i različiti upalni procesi (Wood i sar., 2003).

Sve ćelije bioloških sistema su konstantno izložene egzogenim i endogenim agensima koji mogu da nanesu štetu nukleinskim kiselinama. Poznato je da su DNK i RNK osetljivi na oksidativna oštećenja (Lobo i sar., 2010). Jedna od najopasnijih lezija koja može da je javi na DNK kao rezultat delovanja ROS i RNS je prekid na oba lanca, međutim, pored toga mogu da se dese i prekidi na jednom lancu, unakrsno povezivanje DNK-DNK, unakrsno povezivanje DNK-protein, kao i modifikacija baza i šećernih komponenti nukleotida (Simić i Jovanović, 1986). Obično se 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OH-G) uzima kao biomarker oksidativnog stresa na nukleinskim kiselinama (Griffiths i sar., 2002). Molekul DNK mogu da oštete i RNS koje dovode do nitracije i deaminacije purina (Dalle-Donne i sar., 2006). Puno je dokaza koju ukazuju na to da oksidativno oštećenje molekula DNK predstavlja prvi korak u procesima karcinogeneze i starenja (Valko i sar., 2006).

Oksidativni stres može da aktivira ili da blokira efekotne kaspaze, u zavisnosti od toga koji metabolički put se aktivira (Chandra i sar., 2000). Vodonik peroksid može da blokira aktivaciju kaspaza direktnom oksidacijom cisteinskih grupa (Hampton i sar., 1997; Chandra i sar., 2000), ali može i da indukuje apoptozu oslobađanjem citohroma c iz mitohondrija, aktivacijom kaspaze-9 i aktivacijom efekotnih kaspaza (Chandra i sar., 2000).

1.3.4. Antioksidativni mehanizmi zaštite

Ravnoteža između fiziološke i patofiziološke funkcije slobodnih radikala je veoma delikatna i postiže se pomoću mehanizama antioksidativne zaštite koji održavaju redoks homeostazu u ćeliji (Dröge, 2002). Mehanizmi antioksidativne zaštite mogu da budu enzimski katalisani, ali mogu i da se odvijaju bez prisustva enzima, međutim, i pored razlike u načinu na koji uklanjaju ROS i RNS, antioksidativni mehanizmi uvek funkcionišu zajedno.

1.3.4.1. Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

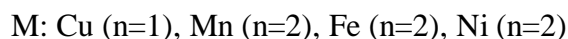
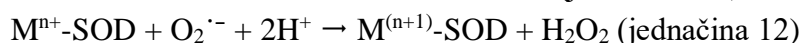
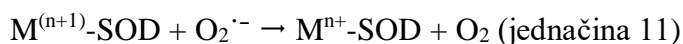
Ćelijski mehanizmi za odbranu od dejstva ROS i RNS enzimski katalisanim procesima uključuju katalitičko delovanje enzima kao što su CAT, SOD, GPx, glutation-S-transferaza (GST) i glutation reduktaza (GR). Antioksidativni enzimi su prisutni u, gotovo, svim kompartmentima ćelije, ali zbog velike verovatnoće nastanka slobodnih radikala u mitohondrijama, za ovu organelu je karakteristično i visoko prisustvo antioksidativnih enzima.

1.3.4.1.1. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza, SOD (EC 1.15.1.1) je enzim koji katališe reakciju dismutacije $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 što je prva reakcija u ćelijskoj odbrani od $O_2^{\cdot-}$ radikala i $ONOO^-$ (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Prema hemijskoj prirodi, SOD su metaloproteini koji pri pH 7 imaju najveći poznati enzimski prometni broj ($\sim 10^5 M^{-1} s^{-1}$). Visok prometni broj SOD enzima je od velikog značaja za održavanje što niže koncentracije $O_2^{\cdot-}$ (oko 10^{-10} mol/l) u živim sistemima.

Enzim SOD se javlja u četiri poznate izoforme koje se razlikuju po katjonu prelaznog metala koji ima ulogu kofaktora u aktivnom centru: Cu,ZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2) i FeSOD i NiSOD. Iako se svaka izoforma eksprimira sa posebnog gena i ima specifičnu subcelularnu lokaciju, sve izoforme SOD katališu istu reakciju, ali sa različitom efikasnošću. Mehanizam dismutacije $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 pomoću SOD uključuje redukciju i reoksidaciju katjona metala koji je sastavni deo aktivnog mesta enzima (jed. 11 i 12) (Fukai i Ushio-Fukai, 2011).

Mehanizam dismutacije $O_2^{\cdot-}$ teče u dve reakcije:



Superoksid dismutaza ima centralnu ulogu u antioksidativnoj odbrani pa je zato aktivnost ovog enzima u uslovima oksidativnog stresa povišena (Hazneci i sar., 2005).

Cu,ZnSOD je enzim koji se javlja u vidu intracelularne i ekstracelularne SOD. Superoksid dismutaza koja je locirana u unutrašnjosti ćelije (SOD1) se nalazi u nukleusu, citosolu, peroksizomima i u unutrašnjoj membrani mitohondrija (Qin i sar., 2007). SOD1 je homodimer kojem se u aktivnom centru svake subjedinice nalazi katjon bakra koji menja oksidaciono stanje između +1 i +2 i time omogućava reakciju dismutacije. Katjon cinka je značajan u kontekstu stabilizacije same enzimске strukture i nema katalitičku ulogu. Povišen nivo aktivnosti SOD1 izaziva porast u nivou H_2O_2 (Elroy-Stein, 1986), a povišeni nivo H_2O_2 ima inhibitorni efekat na

ovaj enzim (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Ekstracelularna SOD (SOD3) je glikozilovani homotetramer kod kojeg se i bakar i cink nalaze u aktivnom centru kao kofaktori (Frodovich, 1995). Poluživot SOD1 iznosi 6-10 minuta (Gorecki i sar., 1991).

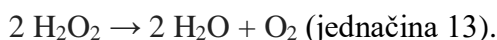
MnSOD (SOD2) je u obliku homotetramera, lociranog u matriksu mitohondrija. Ova izoforma enzima SOD je prva zadužena za dismutaciju $O_2^{\cdot -}$ nastalog na respiratornom lancu (Qin i sar., 2007). MnSOD izoforma se sintetise u citoplazmi da bi se, zatim, transportovala u matriks mitohondrija. Za razliku od Cu,ZnSOD, povišen nivo H_2O_2 ne izaziva inhibiciju aktivnosti MnSOD (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Poluživot SOD2 iznosi 5-6 sati (Gorecki i sar., 1991).

FeSOD i NiSOD su izoforme koje su prisutne samo kod prokariota, dok je FeSOD prisutan i u hloroplastima biljaka. FeSOD je dimerni protein, dok je NiSOD homoheksamer sa katjonom nikla u aktivnom centru svake subjedinice (Yost i Frodovich, 1973).

1.3.4.1.2. Katalaza

Katalaza (EC 1.11.1.6) je antioksidativni enzim koji zajedno sa SOD, GPx, GR i GST predstavlja prvu liniju intracelularne antioksidativne odbrane (Dröge, 2002). Katalaza je homotetramer sa feriprotoporfinom kao kofaktorom u aktivnom centru svake subjedinice (Matés, i sar., 1999).

Katalaza se kod sisara nalazi u mitohondrijama i peroksidomima svih tkiva, ali je najviše ima u ćelijama jetre i u eritrocitima (Limon-Pacheco i Gonsebatt, 2009). Osnovna uloga katalaze u antioksidativnom odgovoru je kataliza reakcije uklanjanja H_2O_2 pri čemu se H_2O_2 razlaže na vodu i molekularni kiseonik (jed. 13) (Chelikani i sar., 2004).



Katalaza je enzim koji karakteriše vrlo visok prometni broj, te ovaj enzim nije saturisan ni pri jednoj koncentraciji H_2O_2 (Lledías i sar., 1998). Za održavanje fizioloških uslova neophodno da jedan molekul katalaze bude u stanju da dismutuje milione H_2O_2 molekula u sekundi (Chelikani i sar., 2004). Kada se H_2O_2 ne uklanja sa dovoljnom efikasnošću zbog niske koncentracije enzima koji inaktivira perokside, on može da inaktivira SOD1 izoenzim i time doprinese još jačem efektu oksidativnog stresa (Bray i sar., 1974).

1.3.4.1.3. Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza (EC 1.11.1.19) je antioksidativni enzim koji katalizuje reakciju u kojoj dolazi do redukcije peroksida uz paralelnu oksidaciju GSH, ili nekih drugih tiola (jed. 14) (Pamplona i Costantini, 2011).



Glutation peroksidaza je jedini antioksidativni enzim koji ne sadrži jon metala u katalitičkom centru, već neke od izoformi efikasnost povećavaju delovanjem selena (Pamplona i Costantini, 2011). Ovaj enzim se kod eukariota nalazi u citosolu, mitohondrijama, peroksidomima, ali i u međućelijskom prostoru gotovo svih ćelija.

Glutation peroksidaza je funkcionalno komplementarna sa CAT, jer je osnovna uloga ovog enzima da uklanja perokside. Ipak, GPx i CAT imaju različit afinitet prema peroksidima, pa je

GPx koja ima viši afinitet prema supstratu funkcionalna kada je koncentracija peroksida u ćeliji niska. Katalaza preuzima katalitičku aktivnost kada koncentracija peroksida poraste, budući da CAT ima nizak afinitet prema supstratu (Pamplona i Costantini, 2011). Do sada je otkriveno najmanje pet GPx izoformi, međutim, pokazalo se da im je ekspresija tkivno-specifična (Hoffman i sar., 2007).

1.3.4.1.4. Glutation-S-transferaza

Glutation-S-transferaza (EC 2.5.1.18) je veoma važan enzim u procesu detoksikacije i odbrane organizma pri oksidativnom stresu i u uslovima pojačane izloženosti ksenobiotcima. Glutation-S-transferaza katališe reakciju konjugacije redukovanog GSH sa elektrofilnim centrima ksenobiotika, endogenih elektrofila i produkata oksidativnih oštećenja. Značaj ove reakcije je veliki, jer su nastali konjugati hidrofilni i mogu se lako izlučiti iz organizma (Beutler i Eaton, 1992).

1.3.4.1.5. Glutation reduktaza

Glutation reduktaza (EC 6.1.4.2) je enzim koji katališe reakciju u kojoj se redukuje disulfidna veza kod oksidovanog GSH (GSSG) i disulfida nastalih kao rezultat reakcije GSH sa molekulima koji sadrže –SH grupe (jed. 15). Cilj ove reakcije je održavanje visoke koncentracije redukovanog GSH u ćeliji prevođenjem GSH iz oksidovanog u redukovan oblik (Uhlig i Wendel, 1992).



Glutation reduktaza funkcioniše uz učeće NADPH kao koenzima (Uhlig i Wendel, 1992). NADPH + H⁺ nastaje u procesu katabolizma glukoze u pentozofosfatnom putu, pa je u tom smislu i aktivnost GR usko povezana sa intenzitetom pomenutog metaboličkog puta. U sisarskim ćelijama je najveći deo GR aktivnosti lokalizovan u citosolu, dok se manji deo odvija u mitohondrijama (Chance i sar., 1979).

1.3.4.2. Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

Pored antioksidativnih enzima, u ćeliji postoji niz endogenih neenzimskih antioksidanata. Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite vrše redukciju slobodnih radikala pomoću donora elektrona male molekulske mase kao što su glutation (GSH), vitamin E, vitamin C, urat i karotenoidi (Birben i sar., 2012). Kao posledica reakcije uklanjanja ROS, koja je najčešće direktna, neenzimski antioksidansi prelaze u oksidovani oblik iz kojeg se ubrzo vraćaju u redukovanost stanje (Pamplona i Costantini, 2011). Mala molekulska masa ovih antioksidanata je prednost, jer im omogućava eliminaciju ROS i RNS na mestima koja nisu pristupačna krupnim antioksidativnim enzimima. Takođe, neenzimski antioksidansi zbog raznolikosti hemijskog porekla mogu da funkcionišu i u hidrofilnoj i u lipofilnoj ćelijskoj sredini (Pamplona i Costantini, 2011).

1.3.4.2.1. Glutation (GSH) i redukovane -SH grupe (tiol grupe)

Tioli su jedinjenja koja imaju –SH grupu kao funkcionalnu grupu, zahvaljujući cisteinskoj rezidui koju poseduju. Sulfhidrilne grupe su izrazito važne u velikom broju intracelularnih reakcija jer redoks status cisteinskih rezidua učestvuje u regulaciji strukture i funkcije mnogih enzima, receptora i transkripcionih faktora (Grant i sar., 1999). Oksidacija –SH grupe je jedna od prvih reakcija koja može da se uoči u nizu procesa koji počinju da se odvijaju kao odgovor tokom oksidativnog stresa pošto se u poređenju sa svim drugim proteinskim reziduama, cisteinske residue najlakše oksiduju (Dean i sar., 1997).

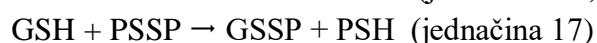
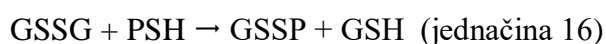
Oksidacija –SH grupa može da teče u dva pravca. Jedan od njih je formiranje proteinskih disulfida (S-S), preko dva cisteina. Sa druge strane, -SH grupa može da dođe u kontakt i sa različitim tiolima niske molekulske mase (protein S-tiolacija). Protein S-tiolacija ima antioksidativnu funkciju jer sprečava ireverzibilnu oksidaciju cisteinskih rezidua u više oksidativno stanje nakon izloženosti slobodnim kiseoničnim radikalima (Thomas i sar., 1994). Modifikacija S-tiolacijom nije enzimski katalisani proces i odvija se u vidu reakcije između delimično oksidovanog protein-sulfhidrila sa tiolima kao što su cistein ili GSH, ili u vidu reakcije disulfidne razmene sa oksidovanim disulfidnim oblikom glutaciona, GSSG (Thomas i sar., 1994). Ove reakcije su reverzibilne i služe kao efikasna zaštita u uslovima oksidativnog stresa.

Glutation je veoma zastupljen intracelularni tiol male molekulske mase sa antioksidativnom ulogom (Birben i sar., 2012). U hemijskom smislu, GSH je tripeptid (γ -glutamilcisteinilglicin) koji se sintetiše od glicina, cisteina i glutamata u ćelijama jetre i ima značajnu ulogu u zaštiti ćelije od slobodnih radikala i detoksikaciji ksenobiotika (Cheng i sar., 2017). Najveći procenat intracelularnog GSH (85-90%) se nalazi u citosolu, dok je ostatak prisutan u mitohondrijama, matriksu jedra i peroksizomima (Lu, 2000).

Glutation je molekul koji ima veliki broj funkcija i koji učestvuje u mnogim ćelijskim reaktivnim procesima. Glutation reaguje sa različitim elektrofilnim molekulima, metabolitima i ksenobioticima pri čemu nastaju konjugati koji se eliminišu iz ćelije, i od kojih dalje nastaje merkaptorna kiselina koja se lako eliminiše iz organizma jer je hidrosolubilna (Wu i sar., 2004). Zahvaljujući visokoj, milimolarnoj, koncentraciji GSH unutar ćelije (1-11 mM u citoplazmi), intracelularna oksido-redukciona ravnoteža je pomerena ka redukciji (Valko i sar., 2007). Glutation uklanja ROS i RNS sa velikom efikasnošću kako direktno, tako i indirektno, kroz enzimski katalisane procese. Iako primarno predstavlja molekul koji pripada neenzimskoj antioksidativnoj zaštiti, GSH učestvuje i u nekim enzimskim antioksidativnim procesim kao deo GSH-zavisnog antioksidativnog sistema koji se sastoji od GSH i funkcionalno zavisnih enzima kao što su GST, GPx i GR (Fang i sar., 2002). Zbog cisteinske rezidue koju poseduje, GSH se delovanjem elektrofilnih supstanci lako oksiduje do GSSG, kako direktno, tako i uz pomoć enzima GPx (Wu i sar., 2004). Da bi se održala intracelularna redukovana sredina, neophodno je da se glutacion vrati iz oksidovanog stanja (GSSG) u redukovani oblik (GSH), što se postiže delovanjem enzima GR (Uhlir i Wendel, 1992). Odnos redukovanog i oksidovanog oblika glutaciona (GSH/GSSG) je značajni marker za karakterizaciju oksidativnog stresa budući da je u ćeliji prisutan u velikoj količini i da ima ulogu u zaštiti ćelije (Wu i sar., 2004). Pad u koncentraciji intracelularnog GSH usled intenzivnih procesa konjugacije ili oksidacije se uzima kao kriterijum za dokaz potencijalnog oksidativnog stresa i niza negativnih posledica do kojih on dovodi. GSH/GSSG redoks par je u uskoj vezi sa promenama u intracelularom redoks potencijalu. Visoka vrednost GSH/GSSG odnosa je važna zbog adekvatne oksidativne zaštite.

Narušavanje ovog odnosa izaziva aktivaciju transkripcionih faktora koji su osetljivi na promenu redoks potencijala u ćeliji kao što su NF- κ B, AP-1, nuklearni faktor aktiviranih T-ćelija i hipoksija-inducibilni faktor 1 koji učestvuju u inflamaciji (Birben i sar., 2012). Glutation ima ulogu u vraćanja vitamina C i E u njihove aktivne forme (Birben i sar., 2012). Glutation interaguje i sa proapoptotskim i antiapoptotskim signalnim molekulima čime štiti ćeliju od apoptoze (Masella i sar., 2005).

Redoks stanje ćelijskih tiola je ključni mediator niza metaboličkih, signalnih i transkripcionih procesa pa je ravnoteža između oksidacionog i redukovano stanja tiolskih molekula neophodna za normalnu funkciju svake ćelije (Bulteau i sar., 2012). Opis statusa tiola u organizmu se postiže kvantitativnim opisom distribucije –SH grupa u dva tipa tiolnih jedinjenja: tiolima niske molekulske mase (redukovani i oksidovani glutacion, cistein i cistin), i tiolima visoke molekulske mase gde spadaju protein tioli. Kako se redukovani glutacion, GSH, kao glavni unutarćelijski neproteinski sulfhidrilni molekul u fiziološkim uslovima nalazi u 10-100 puta većoj koncentraciji od svog oksidovanog oblika (GSSG), tako su i proteini sa sulfhidrilnom grupom (P-SH) prisutniji od mešoviti disulfidnih molekulskih kompleksa, kao što je glutacion-proteinski kompleks (GSSP) (Rossi i sar., 1995). Mešoviti disulfidni proteinski kompleksi nastaju u reakcijama gde dolazi do tiol-disulfidne razmene između GSH sa protein disulfidima (PSSP), ili između GSSG i P-SH, a obe reakcije katališe enzim tioltransferaza (jed. 16 i 17) (Mannervik i Axelsson, 1980):



Različite reakcije kao što su nitrozilacija (S-NO), hidroksilacija (S-OH), glutationilacija (S-SG) i formiranje proteinskih disulfida (S-S) mogu da dovedu do redoks modifikacije –SH grupa u proteinima. Za mnoge proteine je karakteristično da su aktivni onda kada su im –SH grupe u tiolnoj, redukovanoj formi, dok je za druge proteine neophodno da –SH grupe budu u oksidovanoj, disulfidnoj formi. Budući da su ove reakcije tiol-disulfidne promene povratne, predstavljaju važan fiziološki mehanizam regulacije oksido-redukcionog statusa ćelije (Schafer i Buettner, 2001).

1.3.4.2.2. Askorbinska kiselina (vitamin C)

Askorbinska kiselina je visoko hidrosolubilni antioksidativni molekul, koji uklanja molekule ROS i RNS iz intracelularne i ekstracelularne vodene faze (Birben i sar., 2012). Askorbinska kiselina je redukovani oblik vitamina C koja ima ulogu kofaktora mnogim enzimima (Tamari i sar., 2013). Budući da je veoma jak antioksidant, askorbinska kiselina zajedno sa GSH zauzima značajno mesto u antioksidativnom sistemu koji održava intracelularno redoks stanje (Birben i sar., 2012).

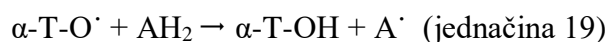
Nakon reakcije sa ROS, askorbat prelazi u svoj oksidovani oblik, koji može ponovo da se redukuje delovanjem NADPH-zavisne (Rose i Bode, 1993) ili GSH-zavisne (Wells i Xu, 1994) dehidroaskorbat reduktaze. Pored toga, askorbat ima veoma važnu ulogu u regeneraciji molekula α -tokoferola iz α -tokoferol radikala (Birben i sar., 2012).

1.3.4.2.3. Vitamin E (α -tokoferol)

Vitamin E, α -tokoferol (α -T-OH), je liposolubilni antioksidans koji je naročito važan u procesu uklanjanja peroksil radikala. Peroksil jon je ključni molekul u inicijaciji lipidne peroksidacije, pa u tom smislu vitaminu E pripada uloga antioksidansa koji sprečava sukcesivne reakcije stvaranja slobodnih radikala u ćelijskoj membrani, a time i sam proces lipidne peroksidacije (Traber i Atkinson, 2007). Brzina reakcije peroksilnih jona sa vitaminom E je oko 1000 puta brža od reakcije peroksilnog jona sa nezasićenom masnom kiselinom (Traber i Stevens, 2011). Tokom ove reakcije hidroksilna grupa tokoferola reaguje sa peroksil radikalima (jed. 18).



Tokoferil radikal (α -T-O \cdot) koji nastaje kao produkt reakcije je slabije reaktivan od peroksil radikala zbog čega ne stupa u dalju reakciju sa lipidima membrane i time se lančana reakcija lipidne peroksidacije završava. Tokoferil radikal se regeneriše u α -tokoferol zahvaljujući reakciji sa askorbinskom kiselinom (jed. 19) (Buettner, 1993).



Iako u reakciji nastaje askorbil radikal (A \cdot), on se redukuje enzimskim putem uz NADPH ili GSH kao kofaktorima (Rose i Bode, 1993, Wells i Xu, 1994).

1.3.4.2.4. Karotenoidi

Karotenoidi su liposolubilna jedinjenja koja se u prirodi javljaju kao pigmenti biljnog porekla (Birben i sar., 2012). Za β -karoten, kao najzastupljenijeg predstavnika karotenoida, je karakteristično da može da reaguje sa ROO \cdot radikalom, OH \cdot radikalom i O $_2^{\cdot-}$ radikalom (El-Agamey i sar., 2004). Karotenoidi, takođe, odlično uklanjaju singlet kiseonik.

Aktivacija adekvatnog zaštitnog mehanizma, bilo enzimske ili neenzimske prirode, je inicijalni odgovor svake ćelije na stresni stimulus koji bi doveo do oksidativnog ili nitrozativnog stresa. Međutim, kada jačina stimulusa prevazilazi kapacitet zaštitnog mehanizma, dolazi do aktivacije mehanizma koji vodi ka ćelijskoj smrti, a koji tip ćelijske smrti će se aktivirati, zavisi od jačine i tipa stresnog stimulusa.

1.3.5. Uticaj akrilamida na pojavu oksidativnog stresa

Oksidativni stres i uloga reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *Reactive oxygen species* - ROS) u patološkim stanjima i toksičnosti su dve veoma važne teme u biomedicinskim naukama (Omurtag i sar., 2008; Alturfan i sar., 2012). Ima puno dokaza koji ukazuju na to da akrilamid ima citotoksični efekat koji se manifestuje kroz uticaj na redoks-status ćelija koji se pomera u smeru oksidativnog stresa usled intenzivne produkcije ROS (Yousef i El-Demerdash, 2006; Parzefal i sar., 2008; Cao i sar., 2008; Oliveira i sar., 2009; Zhang i sar., 2009; Park i sar., 2010; Venkatasubbaiah i sar., 2014). Akrilamid dovodi do promena u vrednostima parametara oksidativnog stresa kako pri visokim, tako i pri niskim dozama (Yousef i El-Demerdash, 2006). Studije pokazuju da su mitohondrijalna disfunkcija i oksidativni stres glavni mehanizmi koji su uključeni u citotoksičnost i genotoksičnost akrilamida (Halliwell, 2006; Zhang i sar., 2017).

Akrilamidom izazvani oksidativni stres se karakteriše intenzivnim procesom lipidne peroksidacije, povišenim nivoom protein-karbonila kao i smanjenim intenzitetom enzimskih i neenzimskih antioksidativnih procesa (Shinomol i sar., 2013).

Eksperimentalno je pokazano da akrilamid ima efekat na funkciju antioksidativnih enzima (Yousef i El-Demerdash, 2006; Ghorbel i sar., 2015). Poznato je da u enzimskoj antioksidativnoj zaštiti superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx) predstavljaju prvu liniju odbrane od oksidativne povrede. Superoksid dismutaza katališe dismutaciju superoksidnih radikala ($O_2^{\cdot-}$) u molekulski kiseonik (O_2) i vodonik peroksid (H_2O_2) što predstavlja prvi korak kod odbrambenog mehanizma od oksidativnog stresa (McCord i sar., 1978). Nastali H_2O_2 , kod kičmenjaka, prvenstveno neutrališu CAT i GPx (Fukai i Ushio-Fukai, 2011). Ovi procesi funkcionišu koordinisano i ukoliko dođe do promene u nivou bilo kojeg od ovih enzima, ćelija će ući u stanje oksidativnog stresa. Citotoksični efekat akrilamida se upravo objašnjava neadekvatnim dejstvom antioksidativnih enzima usled poremećaja u intenzitetu njihove aktivnosti (Ghorbel i sar., 2015). U studiji koju su sprovedi Ghorbel i sar. (2015), pokazano je da tretman akrilamidom izaziva pad u nivou CAT i GPx, ali i značajan porast u nivou ekspresije SOD, što je jasan znak da je akrilamid doveo do produkcije slobodnih radikala koja je prevazišla kapacitet mehanizama za detoksikaciju. Porast aktivnosti SOD je kompenzatorna reakcija organizma koja dolazi kao odgovor na povišenu produkciju slobodnih radikala (Ghorbel i sar., 2015).

Akrilamid može da reaguje sa svim molekulima koji sadrže -SH, -NH₂ i -OH grupe zbog čega lako reaguje sa GSH i formira glutation S-konjugate što je prvi korak u biotransformaciji elektrofila u merkapturnu kiselinu (Settels i sar., 2008). Konjugacija sa GSH je jedan od osnovnih puteva metabolizma akrilamida u biološkim sistemima (Parzefall, 2008). Konjugacija akrilamida i GSH smanjuje koncentraciju raspoloživog GSH što najčešće rezultuje pojačanom lipidnom peroksidacijom (Lash, 2006; Yousef i El-Demerdash, 2006). I eksperimentalno je potvrđeno da delovanje akrilamida izaziva porast u koncentraciji biomarkera lipidne peroksidacije u jetri, testisima, mozgu, bubrezima i plućima (Yousef i El-Demerdash, 2006). Takođe, smanjeni nivo raspoloživog intracelularnog GSH usled delovanja akrilamida favorizuje procese oksidativnog stresa (Mytilineou i sar., 2002) i apoptoze u ćelijama gastrointestinalnog trakta (Rodriguez-Ramiro i sar., 2011).

Do danas, kao što je već pomenuto, postoji niz nedvosmislenih dokaza da akrilamid ima neurotoksični efekat (Brat i Brimijon, 1993; Costa i sar., 1995; Barber i sar., 2001; LoPachin, 2002a; LoPachin, 2002b; Friedman, 2003; LoPachin, 2004; Dybing i sar., 2005; LoPachin i Gavin, 2012; Pennisi i sar., 2013). Oksidativni stres stoji u osnovi patologije velikog broja hemijski izazvanih neuroloških poremećaja (Selvakumar i sar., 2013), a uloga oksidativnog stresa i akrilamidom indukovane neuropatije je dokazana više puta (Prasad i Muralidhara, 2013; Prasad i Muralidhara, 2014; Pan i sar., 2015). Pad u koncentraciji GSH je ključni momenat u procesu nastanka neurodegenerativnih oboljenja (Schulz i sar., 2000). Smanjenje nivoa GSH utiče na konformaciju i katalitičku aktivnost proteina koji sadrže -SH grupu, što je pogubno za mitohondrijalnu funkciju moždanih neurona (Aydin, 2017). Poremećaj u regulaciji glijalne aktivnosti tokom toksičnog efekta ometa funkcionalnost neurona i izaziva neurološku disfunkciju (Mrak i Griffin, 2005). Aktivirane mikroglije i reaktivni astrociti pojačavaju neurološku povredu oslobađajući proinflamatorne citokine kao što su faktor nekroze tumora- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), pojačavaju transkripciju gena za inducibilnu azot oksid sintetazu (iNOS) i produkciju ROS što može da dovede do oboljenja kao što su Alchajmerova i

Parkinsonova bolest (Frank–Cannon i sar., 2009; Ghosh i sar., 2012). Do slične biohemijske slike dovodi i dejstvo akrilamida jer je poznato da akrilamid izaziva pojačanu transkripciju gena iNOS (Liu i sar., 2015), kao i pojačanu sintezu proinflamatornih citokina (Alturfan i sar., 2012). Mozak je organ naročito osetljiv na delovanje ROS i reaktivne azotne vrste (eng. *Reactive nitrogen species* – **RNS**) zbog niske antioksidativne zaštite i većeg potencijala lipidne peroksidacije usled visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina (Aydin, 2017).

Pad u produkciji energije zbog mitohondrijalne disfunkcije nastale usled oksidativnog stresa predstavlja razlog nastanka mnogih neurodegenerativnih oboljenja (Lin i Beal, 2006). Oksidativni stres može da utiče na inhibiciju Krevsovog ciklusa i procesa na elektron-transportnom lancu, što rezultuje padom u produkciji ATP-a i ćelijskom disfunkcijom (Calabrese i sar., 2001). Mitohondrijalne oksidativne fosforilaze (kompleksi I, III i IV) u mozgu pacova su značajno inhibirane nakon tretmana akrilamidom (Aydin, 2017). Tretman akrilamidom inhibira ključne enzime Krevsovog ciklusa u ćelijama mozga tretiranih pacova usled intenzivne produkcije H₂O₂ koji inhibira pomenute enzime (Valko i sar., 2007).

Akrilamid izaziva pojavu oksidativnog stresa i u testisima (Hasanin i sar., 2017) i ima negativan efekat na reprodukciju umanjujući fertilitnost, kako kod ženki, tako i kod mužjaka (Chapin i sar., 1995; Dearfield i sar., 1995). Akrilamid uzrokuje različit stepen degeneracije spermatogonija u seminiferim tubulima, uz prisustvo apoptotičkih ćelija (Hasanin i sar., 2017). Yang i sar. (2005b) su pokazali pad u broju spermatogenih ćelija, kao i smanjenje visine epitela seminiferih tubula i smatraju da je oksidativni stres najverovatniji uzrok ovih promena na testisima. Akrilamid dovodi do porasta u nivou MDA u homogenatu uzorka testisa pacova i apoptoze germinativnih ćelija (Yilmaz i sar., 2017; Hasanin i sar., 2017). Pojačana lipidna peroksidacija usled delovanja akrilamida ima za posledicu pojavu abnormalne morfologije spermatozoida (Venkatesh i sar., 2009).

1.4. ĆELIJSKA SMRT

1.4.1. Oksidativni stres i ćelijska smrt

Veliki broj oboljenja nastaje kao posledica oštećenja tkiva usled pojave oksidativnog stresa u ćelijama koje ga izgrađuju. Mehanizam ove oksidativnim stresom izazvane povrede tkiva uključuje oksidativno oštećenje proteina, lipida i DNK, što uzrokuje ćelijsku disfunkciju i kasniju ćelijsku smrt u vidu apoptoze ili nekroze, što zavisi od intenziteta oksidativnog stimulusa (Hegedűs i sar., 2013). Dok apoptozu indukuju oksidativni stimulusi umerenog intenziteta, nekrozu indukuju jaki oksidativni efekti.

Sve je veći broj istraživanja koja se bave uslovima pod kojima se dešava ćelijska smrt. Zbog toga je 2005. godine Komitet za nomenklaturu ćelijske smrti (eng. *The Nomenclature Committee on Cell Death - NCCD*) predložio da se ćelija može smatrati mrtvom u slučaju da ispunjava neki od sledećih morfoloških ili biohemijskih kriterijuma: (1) narušenu celovitost plazma membrane, (2) fragmentaciju jedra i formiranje apoptotskih telašaca i (3) pojavu da su ćelija ili delovi ćelije obuhvaćeni susednom ćelijom (Duprez i sar., 2009). Do sada je opisano nekoliko tipova ćelijske smrti: apoptoza, nekroza, piroptoza i nekroptoza (Creagh, 2014). Za razliku od nekroze, nekroptoze i piroptoze kod kojih dolazi do oštećenja ćelijske membrane, apoptoza je ćelijska smrt kod koje dolazi do fragmentacije apoptotske ćelije, bez oštećenja ćelijske membrane, a time i bez iniciranja inflamacionog odgovora (Platt i sar., 1998). Pored toga što neoštećena ćelijska membrana čuva integritet apoptotičkih tela koja nastaju kao rezultat fragmentacije ćelije koja podleže apoptozi, izostanku inflamatornog odgovora doprinose i činjenice da su apoptotske ćelije brzo uklonjene procesom fagocitoze, i da fagociti ne produkuju inflamatorne citokine (Kurosaka i sar., 2003). Apoptoza je tip ćelijske smrti koju odlikuju sledeće morfološke karakteristike: smanjenje ćelije, bubrenje membrane, kondenzacija hromatina, i fragmentacija jedra i citoplazme na apoptotička tela koja će biti fagocitovana od strane makrofaga. Sa druge strane, nekroza je tip ćelijske smrti prilikom koje dolazi do oštećenja ćelijske membrane i izlivanja ćelijskog sadržaja u ekstracelularni prostor, što prouzrokuje lokalnu inflamaciju i oštećenje okolnog tkiva (Ryter i sar., 2007). Često se termin apoptoza vezuje za programiranu ćelijsku smrt, dok se termin nekroza vezuje za nekontrolisani vid ćelijske smrti. Međutim, pokazalo se da i prilikom nekroze postoji sled karakterističnih signala i mehanizama koji je regulišu (Dunai i sar., 2011).

Apoptoza izazvana oksidativnim stresom se dovodi u vezu sa inicijacijom apoptoze na nivou mitohondrija (Franco i sar., 2009). Mitohondrije su najčešće mesto nastanka ROS, a jedan od ciljnih molekula za ROS je mitohondrijalna DNK (mtDNK) budući da se nalazi blizu elektron transportnog lanca i ne poseduje histone koji bi joj predstavljali zaštitu. Oštećenje mtDNK nastalo delovanjem ROS rezultuje letalnim oštećenjem ćelije, jer promena na mtDNK ima za posledicu disrupciju elektrontransportnog lanca, procesa respiracije i sinteze ATP-a, kao i membranskog potencijala mitohondrijalne membrane. Pored delovanja na DNK, delovanje ROS u mitohondrijama može da bude na nivou proteina i lipida (Franco i sar., 2009). Oksidacija i inaktivacija nekih mitohondrijalnih proteina od strane ROS često stvara uslove u kojima se produkcija novih ROS još više intenzivira. Lipidna peroksidacija na nivou mitohondrija ometa mitohondrijalni metabolizam i dovodi do nastanka pukotina na mitohondrijalnoj membrani što je jedan od signala za početak apoptoze sa unutrašnjim putem inicijacije procesa.

Oksidacija na molekulu DNK i stres na endoplazmatskom retikulumu izazvani delovanjem ROS predstavljaju važne apoptotičke signale izazvane oksidativnim stresom. Oksidativno oštećenje na DNK izaziva stvaranje lezija u vidu 8-okso-deoksiguanozina, 8-okso-deoksiadenozina i deoksitimidin glikola koje selektivno iseca enzim DNK glikozilaza. Ukoliko oštećenja na DNK od strane ROS prevaziđu mogućnost ćelijskih mehanizama da izvrše reparaciju, dolazi do apoptoze (Franco i sar., 2009).

1.4.2. Apoptoza

Centralnu ulogu u procesu apoptoze imaju cistein-zavisni aspartat-specifični proteolitički enzimi kaspaze. Zbog njihove osobine da u aktivnoj formi pokreću i katališu kaskadu reakcija koje za cilj imaju programiranu ćelijsku smrt, kaspaze se u ćeliji nalaze u zimogenom obliku. Kaspaze koje učestvuju u apoptozi su podeljene na dve osnovne grupe: inicijatorske (kaspaze-2, -8, -9, -10) i efektorne (izvršne) kaspaze (kaspaze-3, -6 i -7) (Elmore, 2007). Inicijatorske kaspaze imaju sposobnost homoaktivacije, dok se efektorne kaspaze aktiviraju katalitičkim delovanjem inicijatorskih kaspaza (Slee i sar., 1999). Efektorne kaspaze su glavni medijatori apoptoze i odgovorne su za morfološke i biohemijske promene koje su karakteristične za programiranu ćelijsku smrt. Njihov zadatak je da inaktiviraju proteine koji su važni za održavanje vitalnih ćelijskih procesa, da preseku međućelijske kontakte okolnih ćelija sa ćelijom koja je ušla u proces apoptoze, da naruše citoskelet, prekinu replikaciju i reparaciju DNK, naruše strukturu jedra, iniciraju biohemijske promene na površini ćelije koje će omogućiti lako prepoznavanje apoptotske ćelije od strane fagocita, i da dezintegrišu ćeliju do vezikularnih tela (Hampton i sar., 1998; Hengartner, 2000). Kaspaza-3 se smatra za najvažniju efektornu kaspazu (McIlwain i sar., 2013).

1.4.2.1. Inicijacija apoptoze

Mehanizam apoptoze je veoma kompleksan, energetski zavistan i visoko konzervativan proces koji se sastoji iz dve faze: faze inicijacije i efektorne (izvršne) faze. Iako postoje različiti signali za inicijaciju apoptoze, morfološke i biohemijske karakteristike efektorne faze programirane ćelijske smrti su vrlo uniformne i ne zavise od signala koji je doveo do inicijacije procesa (Kannan i Jain, 2000). Poznata su tri moguća puta za započinjanje apoptoze: spoljašnji put, unutrašnji put i perforin/granzimski put koji može da se odvija preko granzima B ili granzima A (Brunner i sar., 2003; Elmore, 2007). Spoljašnji, unutrašnji i granzim B put se spajaju na istom efektornom putu u čijoj osnovi stoji aktivacija kaspaze-3 (Zimmermann i Green, 2001). Granzim A put je kaspaza-nezavistan (Martinvalet i sar., 2005).

1.4.2.1.1. Spoljašnji put

Spoljašnji put inicijacije apoptoze se odvija preko vezivanja ekstracelularnih signalnih molekula za transmembranske receptore smrti (Elmore, 2007). Receptori smrti su članovi superfamilije receptora za faktor nekroze tumora (TNF) koji poseduju intracelularni domen od oko 80 aminokiselinskih ostataka koji se naziva "domen smrti" (eng. *Death Domain* - **DD**). Domen smrti ima glavnu ulogu u prenošenju signala smrti na intracelularne signalne puteve (Ashkenazi, 2002). Najznačajniji receptori smrti i njihovi ligandi su FasR/FasL, TNF α /TNFR1, Apo2L/DR4 i Apo2L/DR5 (Nair i sar., 2014). Vezivanje liganda za ekstracelularni deo odgovarajućeg

receptora aktivira adapterske proteine sa citoplazmatske strane receptora usled čega nastaje DISC (eng. *Death Inducing Signaling Complex - DICS*). U sastavu DISC se nalazi prokaspaza 8 koja tada autokatalizom prelazi u svoj aktivan oblik, kaspazu 8 (Medema i sar., 1997). Nakon aktivacije, kaspaza 8 prevodi prokaspazu-3 u kaspazu-3 čime počinje prenošenje signala izvršne faze apoptoze (Stennicke i sar., 1998).

1.4.2.1.2. Unutrašnji put

Za unutrašnji put inicijacije apoptoze je karakteristično da je izazivan delovanjem nekog nespecifičnog stimulusa koji deluje direktno na unutarćelijsku strukturu bez prethodnog vezivanja za odgovarajući receptor (Elmore, 2007). U nespecifične stimulse spadaju virusna infekcija, odsustvo određenih faktora rasta, hormona i citokina, hipoksija, hipotermija, radijacija, oksidativni stres, oštećenje na DNK i mnogi drugi (Watters, 1999). Iako su po svojoj prirodi različiti, svi ovi stimulusi stvaraju promene na unutrašnjoj membrani mitohondrija, i otvaraju pore na mitohondrijama – MPT (eng. *Mitochondrial Permeability Transition - MPT*) zbog čega se gubi transmembranski potencijal mitohondrijalne membrane (Green i Kroemer, 2004). Ova serija sukcesivnih događaja dovodi do oslobađanja citohroma c i drugih proapoptotskih proteina iz intermembranskog prostora mitohondrija u citosol. Jedan deo oslobođenih proteina čine specifične endonukleaze koje izazivaju fragmentaciju DNK koja je karakteristična za apoptozu. Drugi deo proteina oslobođenih iz mitohondrija formiraju kompleksnu proteinsku strukturu koja se naziva apoptozom (Hill i sar., 2004). Citohrom c u apoptozomu aktivira prokaspazu-9 koja prešavši u svoj aktivan oblik, kaspazu-9, katališe reakciju aktivacije kaspaze-3 koja započinje kaskadu sukcesivnih reakcija efektorne faze apoptoze (Slee i sar., 1999).

1.4.2.1.3. Perforin/granzimski put

Perforin/granzimski put inicijacije je karakterističan za citotoksičnost posredovanu T-ćelijama (Elmore, 2007). Citotoksični T limfociti luče perforin kada dođu u kontakt sa ciljnom ćelijom. Perforin stvara oštećenja na membrani ciljne ćelije kroz koja ulaze citotoksične granule koje oslobađaju T limfociti. Bitan konstituent ovih granula su granzim A i granzim B (Elmore, 2007). Granzim A indukuje apoptozu u ciljnoj ćeliji aktivacijom puteva koji su nezavisni od kaspaze i koji rezultiraju fragmentacijom DNK (Elmore, 2007).

1.4.2.2. Izvršna faza apoptoze

Kada se nakon faze inicijacije apoptoze aktivira kaspaza-3, nastupa serija morfoloških i biohemijskih promena koje dovode do ćelijske smrti (Elmore, 2007). Kaspaza-3 je odgovorna za aktivaciju niza proteaza koji izvršavaju efektornu fazu apoptoze.

Prva morfološka promena na ćeliji u kojoj je započet proces apoptoze je zaobljavanje ćelije koje nastaje kao posledica razaranja citoskeleta od strane kaspaze-3 (Taylor i sar., 2008). Usled nedostatka citoskeleta dolazi i do redukcije ćelijske zapremine što se uočava kao smanjenje dimenzija ćelije. Citoplazma postaje gušća, a organele bliže postavljene jedna drugoj (Bortner i Cidlowski, 1998). U jedru dolazi do kondenzacije hromatina (Kerr i sar., 1972). Sledeći stupanj morfoloških promena je stvaranje membranskih protruzija, kondenzacija, a zatim i fragmentacija jedra (Ziegler i Groscurth, 2004). U završnoj fazi apoptoze, dolazi do fragmentacije ćelije na apoptotsaka tela koja se sastoje od delova citoplazme sa organelama i delovima jedra. Na kraju

apoptotskog procesa ova tela bivaju fagocitirana od strane makrofaga. Na ovaj način se ćelija koja je prošla proces programirane ćelijske smrti uklanja u potpunosti i bez narušavanja njenog integriteta (Platt i sar., 1998).

Biohemijske promene koje su karakteristične za ćeliju koja podleže apoptozi su: eksternalizacija fosfatidil serina na spoljašnju stranu plazma membrane čime se postiže lakše prepoznavanje apoptotske ćelije od strane fagocita (Fadok i sar., 1992), kao i degradacija nuklearne DNK na male fragmente dvolančane DNK podjednake dužine od oko 180 baznih parova (Wyllie i sar., 1984).

1.4.3. Bcl-2 familija proteina

Bcl-2 familija proteina se sastoji od proapoptotskih (Bax, Bak, Bad, Bim, itd.) i antiapoptotskih (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w) proteina koji, imaju ulogu u aktivaciji i inhibiciji apoptoze (Ryder i sar., 2007). Odnos između proapoptotskih i antiapoptotskih članova ove familije, na primer između Bax i Bcl-2, ukazuje na to u kojoj meri je ćelija osetljiva na apoptozu (Oltvai i sar., 1993).

Bax je protein sa jednom od centralnih uloga u mehanizmu ćelije da oseti oštećenje i inicira apoptozu. Bax inicira ćelijsku smrt povećavanjem permeabilnosti spoljašnje mitohondrijalne membrane stvaranjem pora kroz koje se mitohondrijalni faktori, kao na primer citohrom c, oslobađaju u citosol. Mitohondrijalni faktori utiču na stvaranje apoptozoma koji aktivira kaspaze što dalje vodi u ćelijsku smrt. U zdravim ćelijama, Bax se nalazi u citosolu kao samo-inhibirajući monomer (Suzuki i sar., 2000). Da bi inicirao apoptozu, Bax protein prvo prolazi kroz konformacione promene, premešta se iz citosola u mitohondrije, ulazi u spoljnu membranu gde dolazi do homo-oligomerizacije ovog proteina (Reed, 2006). Ovaj niz faza kroz koje Bax protein treba da prođe pre nego što inicira apoptozu ukazuje na to da njegova aktivacija zahteva precizan mehanizam koji je koordinisan od strane drugih proteina iz Bcl-2 familije.

Članovi porodice Bcl-2 su definisani njihovim efektom na preživljavanje i prisustvom odgovarajućeg domena Bcl-2 homologije (BH) koji su ključni za definisanje interakcije članova porodice Bcl-2. Proapoptotski članovi su podeljeni u dve grupe: efektorski molekuli, koji sadrže BH1-BH3 domene, među koje se ubraja i Bax, i molekuli aktivatori koji sadrže samo BH3 domen. Antiapoptotski članovi sadrže BH1-BH4 domene i inhibiraju apoptozu vezujući se za obe grupe proapoptotskih molekula (Willis i sar., 2007). Za ćeliju u kojoj započinje proces apoptoze je karakteristično da ekspresija gena za Bax počinje da raste, dok se, istovremeno, beleži pad ekspresije gena za Bcl-2 (Kikuchi i sar., 2002).

2. CILJEVI

Akrilamid je toksična supstanca koja je prisutna u brojnim prehranbenim namirnicama, duvanskom dimu i velikom broju industrijskih produkata koji su u svakodnevnoj upotrebi (Bergmark, 1997; Tareke i sar., 2002, FAO/WHO, 2002). Zbog činjenice da je kod laboratorijskih životinja akrilamid dokazani neurotoksikant (Lehning i sar., 2002; LoPachin i sar., 2002; Friedman, 2003; LoPachin, 2004; Dybing i sar., 2005), karcinogen (Friedman i sar., 1995) i ko-karcinogen (Yener i sar., 2013), kao i supstanca sa negativnim efektom na reprodukciju i razvoj (Wise i sar., 1995; Wang i sar., 2010), veoma je značajno utvrditi na koja sve ciljna tkiva deluje ova toksična supstanca. Zbog prisustva akrilamida u brojnim prehrambenim proizvodima, najčešći put ulaska akrilamida u organizam je oralni put što omogućava akrilamidu da stigne u sva tkiva. S obzirom na to da prolazi kroz placentalnu barijeru (Schettgen i sar. 2004, von Stedingk i sar., 2011), izloženost akrilamidu počinje još od intrauterinog života.

Za sada nije poznato da li je mlad organizam osetljiviji na toksično dejstvo akrilamida jer je veći broj do sada urađenih studija o efektu akrilamida na žive sisteme za objekat istraživanja imao adultne organizme (Raju i sar., 2013; Lebda i sar., 2015). To dodatno ističe važnost istraživanja potencijalnog efekta peroralno unetog akrilamida na juvenilne organizme.

Podaci o efektima akrilamida na pankreas su retki i pretežno se odnose na farmakokinetiku akrilamida (Kadry i sar., 1999), toksični efekat (Shipp i sar., 2006) i potencijalni kancerogeni efekat ove supstance na egzokrini pankreas (Rice, 2004; Pelucchi i sar., 2011; Yener i sar., 2013), kako na humanoj populaciji, tako i na animalnim modelima. Uticaj akrilamida na endokrini pankreas je do sada ostao nedovoljno istražen.

Do danas je prikupljeno mnoštvo dokaza koji ukazuju na to da u osnovi citotoksičnog efekta akrilamida stoji uticaj na redoks-status ćelije koji se pomera u smeru oksidativnog i nitrozativnog stresa usled intenzivne produkcije ROS i RNS (Yousef i El-Demerdash, 2006; Cao i sar., 2008; Parzefal i sar., 2008; Oliveira i sar., 2009; Zhang i sar., 2009; Park i sar., 2010). Za β -ćelije pankreasa, najbrojnije ćelije Langerhansovih ostrvaca, je karakteristična relativno niska ekspresija antioksidativnih enzima, kada se uporede sa ćelijama ostalih tkiva (Kaneto i sar., 2005), što ih čini posebno osetljivim na dejstvo ROS i RNS (Tiedge i sar., 1997; Kajimoto i Kaneto, 2004).

Na osnovu napred navedenog postavljeni su sledeći ciljevi dokorske teze:

I U eksperimentalnom modelu mužjaka pacova soja Wistar, tretiranih akrilamidom u dozama od 25 i 50 mg/kg tm tokom juvenilnog perioda:

1. Utvrditi da li tretman akrilamidom utiče na strukturu, broj i dijametar Langerhansovih ostrvaca pankreasa;
2. Ispitati potencijalni efekat tretmana akrilamidom na stereološke karakteristike α - i β -ćelija Langerhansovih ostrvaca pankreasa;
3. Utvrditi da li tretman akrilamidom utiče na ekspresiju insulina, glukagona, inducibilne azot-oksida sintetaze (iNOS), superoksid dismutaze 1 i 2 (SOD1 i SOD2), katalaze (CAT) i citohroma P450 2E1 (CYP2E1) u Langerhansovim ostrvcima pankreasa;
4. Ispitati da li tretman akrilamidom utiče na koncentraciju glukoze u serumu.

II U eksperimentalnom modelu ćelijske linije, insulinoma beta ćelija pacova, Rin-5F, tretirane akrilamidom:

5. Odrediti da li je akrilamid, apliciran u rastućim koncentracijama, toksičan za β -ćelije pankreasa;
6. Utvrditi da li tretman akrilamidom izaziva oksidativni stres u β -ćelijama pankreasa određivanjem nivoa biomarkera oksidativnog stresa: sadržaj redukovanog glutationa (GSH) i slobodnih proteinskih tiolnih grupa ($-SH$), nivo malondialdehida (MDA), nivo prisutnog NO, aktivnosti ukupne SOD i CAT;
7. Ispitati da li tretman akrilamidom utiče na transkripciju gena za insulin, CAT, SOD1, SOD2, iNOS, CYP2E1, Bax i Bcl-2, kao i na Bax/Bcl-2 odnos u β -ćelijama pankreasa.

Rezultati teze treba da pokažu da li akrilamid ima negativni efekat na endokrini pankreas i u skladu sa tim daju doprinos bližem razumevanju molekulskih i biohemijskih mehanizama kojima akrilamid deluje na ćelije endokrinog pankreasa. Dobijeni nalazi će dopuniti već postojeća saznanja o dejstvu ove toksične supstance na zdravlje i doprineće u rasvetljavanju pitanja gde sve leže potencijalni rizici za pojavu patoloških stanja na endokrinom pankreasu.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U studiji je korišćeno 30 mužjaka laboratorijskih pacova soja Wistar, tretiranih akrilamidom u juvenilnom periodu, koji su uzgajani u vivarijumu Departmana za biologiju i ekologiju, Univerziteta u Novom Sadu. Starost životinja u momentu početka eksperimenta je bila 23 dana. Životinje su odvajane od majki 22. PND, izmerene i podeljene u tri grupe od po deset životinja. Tokom eksperimenta, pet ili šest životinja je bilo smešteno u jednom kavezu. Sve tri grupe su bile podvrgnute kontrolisanom dnevno - noćnom ritmu svetlosti (12 h svetlosti, 12 h tame) i temperaturi vazduha od $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Hranjene su standardnom paletiranom hranom za laboratorijske životinje, a vodu su uzimale po potrebi.

Naš eksperiment je izveden uz odobrenje Etičkog komiteta za eksperimentalne životinje Univerziteta u Novom Sadu (Saglasnost br. I-2011-03, od 31. marta 2011) i u skladu sa «Uputsvom za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja» publikovanom od strane *National Research Council (NRC): Guide for the Use of Laboratory Animals (copyright 1996)*, *National Academy of Sciences, Washington D.C.* i *National Institutes of Health (NIH): Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 8023, revised 1996, 7th edition)*.

3.1.1. Tretman i plan eksperimenta

Dve od tri grupe eksperimentalnih životinja tretane su putem gavaže, *per os*, rastvorom akrilamida (99.5%, akrilamid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) u destilovanoj vodi. Prvoj grupi životinja je apliciran akrilamid u dozi od 25 mg po kg telesne mase životinja (mg/kg tm), a drugoj u dozi od 50 mg/kg tm. Treća grupa životinja je bila kontrolna grupa i ovim životinjama a je na isti način, gavažom, aplicirana ekvivalentna zapremina destilovane vode. Tretman eksperimentalnih životinja je sproveden u formi jednokratne gavaže 5 dana nedeljno sa dva dana pauze, tokom tri nedelje, bez aplikacije na dan žrtvovanja životinja. Na kraju eksperimenta, životinje su žrtvovane dekapitacijom u anesteziji parom dietil etra. Uzorci pankreasa i puna krv iz trupa uzeti su odmah nakon žrtvovanja i dalje su prosleđena kroz procedure pripreme uzoraka pankreasa za ispitivanje na svetlosnom mikroskopu, odnosno za serumsku analizu.

3.1.2. Obrada uzoraka pankreasa

3.1.2.1. Priprema uzoraka pankreasa za isitivanje na svetlosnom mikroskopu

Nakon dekapitacije, uzeto je kompletno tkivo pankreasa i fiksirano u 10% rastvoru formalina. Nakon 24 časovne fiksacije u formalinu, pankreasi su izvađeni iz fiksativa, ispirani u 70% alkoholu nakon čega je usledila standardna procedura dehidratacije, prosvetljavanja u ksilolu i kalupljenja u parafinu. Pankreasno tkivo je tokom kalupljenja orijentisano tako da je duža osa organa bila paralelna sa dužom ivicom kalupa, čime je obezbeđeno da su na svakom preseku zastupljeni svi regioni pankreasa. Dobijeni parafinski kalupi su sečeni na Reichert-ovom klizećem mikrotomu u serijske preseke debljine 5 μm . Kako bi se izbegla analiza istih Langerhansovih ostrva, za analizu su uzimani rezovi pankreasnog tkiva u razmaku od najmanje 250 μm .

3.1.2.2. Histochemijske metode bojenja parafinskih rezova pankreasa

Dobijeni presezi pankreasa su bojeni standardnom histološkom metodom bojenja parafinskih rezova hematoksilinom i eozinom (H-E) (Švob, 1974) (obe boje: Merck, Darmstadt, Germany), i montirani u DPX-u. Presezi pankreasa obojeni H-E metodom su korišćeni za određivanje broja i dijametra Langerhansovih ostrva pankreasa.

Za specifično prikazivanje kapilarnog tkiva pankreasa korišćena je trihromna Mallory metoda bojenja (Švob, 1974). Po ovoj metodi presezi pankreasa se deparafinizuju u ksilolu i rehidratizuju kroz seriju alkohola sa opadajućim koncentracijama. Nakon rehidratacije presezi se uranjaju u vodeni rastvor kiselog fuksina, zatim u vodeni rastvor fosfomolibdenske kiseline i na kraju u vodeni rastvor oksalne kiseline i boja oranž G i metilensko plavo (sve korišćene hemikalije: Merck, Darmstadt, Germany). Između uranjanja u svaki od 3 pomenuta rastvora, presezi se ispiraju u destilovanoj vodi, a po završenom bojenju, presezi se dehidriraju u seriji alkohola sa rastućim koncentracijama, prosvetle u ksilolu i montiraju u DPX-u. Presezi obojeni Mallory metodom su korišćeni za posmatranje kapilara Langerhansovih ostrvaca.

3.1.2.3. Imunohistochemijske metode bojenja za prikaz α - i β -ćelija endokrinog pankreasa

Imunohistochemijske metode bojenja su primenjene u cilju ispitivanja ekspresije različitih proteina u pojedinim endokrinim ćelijama Langerhansovih ostrva pankreasa. U α -ćelijama je ispitivana ekspresija glukagona, a u β -ćelijama je ispitivana ekspresija insulina. Pored toga, u α - i β -ćelijama praćena je i ekspresija sledećih enzima: inducibilne azot-monooksid sintetaze (iNOS), citohroma P450 2E1 (CYP2E1), katalaze (CAT) i superoksid dismutaze 1 i 2 (SOD1 i SOD2). U eksperimentu su korišćena antitela prikazana u Tabeli 2. Parafinski presezi pankreasa bojeni su imunohistochemijski, Ultravision LP Detection System protokolom prema uputstvu proizvođača (Thermo Scientific, UK).

Nakon deparafinizacije i rehidratacije presezi su isprani u TBS puferu (pH 7,4) (*eng.* Tris-buffered saline - **TBS**). Isečci su potom inkubirani u vodonik-peroksid bloku (Hydrogen Peroxide Block) 10 min na sobnoj temperaturi da bi se inhibirale endogene peroksidaze, a zatim, nakon ispiranja u TBS-u, usledila je inkubacija u ultra V bloku (Ultra V Block) 5 min na sobnoj temperaturi, posle čega su isečci još jednom ispirani u TBS-u. Sledeća faza je inkubacija preseka pankreasa sa primarnim antitelom 30 min na sobnoj temperaturi, a zatim i sa pojačivačem primarnog antitela (Primary Antibody Enhancer) 10 min na sobnoj temperaturi, posle čega je sledilo ispiranje u TBS-u. Presezi su potom inkubirani sa HRP polimerom (HRP Polymer) 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u TBS-u, na preseke je nanet hromogen u vidu smeše DAB plus hromogena (DAB Plus Chromogen) i DAB plus supstrata (DAB Plus Substrate). Nakon tretmana hromogenom, presezi su isprani u destilovanoj vodi, a zatim je usledilo bojenje bazofilnih ćelijskih struktura Majerovim hematoksilinom. Presezi su na kraju procedure dehidratirani, isprani u ksilolu i montirani u DPX-u.

Detekcija glukagona na parafinskim presecima je zahtevala demaskiranje antigenih mesta kuvanjem preseka u citratnom puferu. Nakon izvršene deparafinizacije i rehidratacije, presezi su premešteni u kadicu sa citratnim puferom (10 mM; pH 6,0) i kuvani 10 min u mikrotalasnoj rerni. Presezi su isprani u TBS puferu, nakon čega se pristupa inkubaciji sa vodonik-peroksid blokom, a procedura do kraja teče prema gore opisanom protokolu za imunohistochemijsko bojenje α -ćelija. Presezi koji su služili kao negativne kontrole su prošli kroz identičan protokol, s

tim što na njih nije stavljano antitelo, već su za to vreme bili prekriveni sa ekvivalentnom zapreminom TBS-a.

Tabela 2. Antitela korišćena za imunohistohemijsko obeležavanje proteina

Protein	Antitelo
Glukagon	Rabbit polyclonal antibody, <i>ready-to-use</i> , RB-1422-R7, Thermo Scientific, UK
Insulin	Mouse monoclonal antibody, <i>ready-to-use</i> , MS-1379-R7, Thermo Scientific, UK
iNOS	Rabbit polyclonal to iNOS, Anti-iNOS antibody, ab 15323, Abcam, UK
CYP2E1	Rabbit polyclonal to P450 2E1, Anti-Cytochrome P450 2E1 antibody, ab84598, Abcam, UK
CAT	Rabbit polyclonal to Catalase, Anti-Catalase antibody, ab16731, Abcam, UK
SOD1	Rabbit polyclonal to Superoxide Dismutase 1, Anti-Superoxide Dismutase 1 antibody, ab13498, Abcam, UK
SOD2	Rabbit polyclonal to Superoxide Dismutase 2, Anti-Superoxide Dismutase 2 antibody, ab13533, Abcam, UK

3.1.3. Histološka i stereološka analiza obojenih rezova pankreasa

Analiza obojenih rezova pankreasa je obuhvatala kvalitativnu (histološku) i kvantitativnu (linearna merenja i stereološka analiza) analizu endokrinog pankreasa u cilju utvrđivanja njegove potencijalne promene pod uticajem akrilamida. Ove analize su urađena na svetlosnom mikroskopu marke Reichert 310 na uveličanjima 400x (kvalitativna analiza) i 1000x (kvantitativna analiza).

Histološka analiza je obuhvatala analizu strukturnih promena endokrinog pankreasa, odnosno Langerhansovih ostrvaca pankreasa i kapilarne mreže kontrolnih životinja i životinja tretiranih akrilamidom. Kvantitativna analiza endokrinog pankreasa akrilamidom tretiranih i kontrolnih životinja obuhvatila je: 1. određivanje broja i dijametra Langerhansovih ostrvaca, i 2. stereološku analizu, odnosno određivanje vrednosti izabranih stereoloških parametara α - i β -ćelija Langerhansovih ostrvaca.

3.1.3.1. Određivanje broja i dijametra Langerhansovih ostrvaca

Određivanje broja i dijametra Langerhansovih ostrvaca izvršena je na svetlosnom mikroskopu na uveličanju od 400X.

U cilju određivanja broja ostrvaca, izbrojana su Langerhansova ostrvca na ukupno četiri preseka pankreasa bojena sa H-E za svaku životinju, između kojih je bio razmak od najmanje 250 μ m da

bi se izbeglo brojanje istih ostrvaca. Broj Langerhansovih ostrvaca po životinji je izražavan kao ukupan broj ostrvaca na 4 posmatrana preseka.

Dijametar Langerhansovih ostrvaca određen je linearnim merenjem okularnim mikrometrom pri čemu je uzet u obzir sferoidan oblik ovih ostrvaca, odnosno da ova ostrvca imaju dve ose: dužu (a) i kraću (b) koje se seku pod pravim uglom. Na osnovu dobijenih vrednosti linearnih merenja za dužu (a) i kraću osu (b) Langerhansovih ostrvaca izračunat je dijametar ovih ostrvaca (d_i) prema formuli:

$$d_i = \sqrt{a \cdot b}$$

Pretpostavljajući sferoidnu strukturu ostrvaca, *Fullman*-ova formula (Williams, 1977) je korišćena da bi se izračunao korigovani srednji dijametar ostrvca (\bar{D}_i):

$$\bar{D}_i = \frac{\pi}{2} \times \frac{N}{\frac{1}{d_{i1}} + \frac{1}{d_{i2}} + \dots + \frac{1}{d_{iN}}}$$

gde je N ukupan broj izmerenih ostrvaca,

d_{i1} , d_{i2} , ..., d_{iN} su dijometri pojedinačnih merenih ostrvaca.

Analiza dijametara ostrvaca je urađena prema srednjoj vrednosti korigovanih dijametara svih ostrvaca na četiri analizirana preseka, za svaku životinju.

3.1.3.2. Stereološka analiza α - i β -ćelija Langerhansovih ostrvaca

Stereološka analiza je obuhvatila preseke Langerhansovih ostrvaca, imunohistohemijski obojenih antitelima na insulin i glukagon. Za stereološku analizu Langerhansovih ostrvaca je korišćena "point – counting" tehnika pomoću Weibel-ovog mnogonamenskog testnog sistema sa 42 tačke (M42) (Weibel, 1979), smeštenog u okular svetlosnog mikroskopa. Stereološka analiza je vršena na uveličanju 1000x.

Korišćenjem Weibel-ovog mnogonamenskog testnog sistema na presecima bojenim imunohistohemijskim metodama određeni su sledeći stereološki parametri α - i β -ćelija endokrino pankreasa:

1. Volumenska gustina α -ćelija ($Vv\alpha$)
2. Numerička gustina α -ćelija ($Nv\alpha$)
3. Površinska gustina α -ćelija ($Sv\alpha$)
4. Volumenska gustina jedara α -ćelija ($Vvn\alpha$)
5. Volumenska gustina citoplazme α -ćelija ($Vvc\alpha$)
6. Nukleo – citoplazmatski odnos α -ćelija ($N\alpha/C\alpha$)
7. Volumenska gustina β -ćelija ($Vv\beta$)
8. Numerička gustina β -ćelija ($Nv\beta$)
9. Površinska gustina β -ćelija ($Sv\beta$)
10. Volumenska gustina jedara β -ćelija ($Vvn\beta$)
11. Volumenska gustina citoplazme β -ćelija ($Vvc\beta$)
12. Nukleo – citoplazmatski odnos β -ćelija ($N\beta/C\beta$)

Da bi mogli da se izračunaju navedeni stereološki parametri, prvo je određen ukupan broj testnih tački (Pt), površina korišćenog testnog polja (At) i ukupna dužina linija testnog sistema (Lt).

- Ukupan broj tačaka testnog sistema:

$$Pt = 42 \cdot n$$

gde je:

42 – ukupan broj tačaka na mrežici M42 testnog sistema

n – broj analiziranih vidnih polja

- Površina testnog polja:

$$At = Pt \cdot \frac{\sqrt{3}}{2} \cdot d^2$$

gde su:

Pt – ukupan broj tačaka testnog sistema

d – dužina testne linije pri odgovarajućem uvećanju mikroskopa

- Ukupna dužina testnih linija u jednom testnom polju

$$Lt = d \cdot 21 \cdot n \cdot f$$

gde su:

d – dužina jedne testne linije

n – broj analiziranih vidnih polja

21 – ukupan broj testnih linija na mrežici M42 testnog sistema

f – faktor koji se dobija baždarenjem okularnog mikrometra i zavisi od uvećanja na kojem se meri.

Volumenska gustina α - i β -ćelija, njihovih jedara i citoplazme izračunata je po formuli:

$$Vv = \frac{p}{Pt}$$

gde su:

p – ukupan broj tačaka testnog sistema koje pogađaju posmatrane strukture na celom preseku

Pt – ukupan broj tačaka testnog sistema

- Numerička gustina α - i β -ćelija izračunata je po formuli:

$$Nv = \frac{k}{\beta} \cdot \sqrt{\frac{Pt \cdot \left(\frac{N}{At}\right)^3}{p}}$$

gde su:

k – korektivni faktor, iznosi 1,9 za uvećanje od 1000x

β – korektivni faktor oblika, iznosi 1,55

N – ukupan broj α - / β -ćelija u ispitivanim testnim poljima

At – površina testnog polja

p – ukupan broj tačaka testnog sistema koje padaju na α - / β -ćelije

- Površinska gustina α - / β -ćelija izračunata je po formuli :

$$Sv = 2 \cdot \frac{I}{Lt}$$

gde su:

I – ukupan broj preseka testnih linija sa konturama α - / β -ćelija

Lt - ukupna dužina testnih linija u analiziranim testnim poljima

- Nukleocitoplazmatski odnos:

$$N/C = \frac{pn}{pc}$$

gde su:

pn – ukupan broj tačaka testnog sistema koji pada na nukleus α - / β -ćelija

pc - ukupan broj tačaka testnog sistema koji pada na citoplaznu α - / β -ćelija

3.1.4. Kvantifikacija ekspresije proteina analizom digitalnih fotografija

Digitalne fotografije su urađene Zeiss Imager.A1 svetlosnim mikroskopom (Zeiss, Göttingen, Nemačka), sa kamerom AxioCam MRc5, rezolucije 5 Megapixel-a (Zeiss, Göttingen, Nemačka). Nivo osvetljenja i podešavanja kamere su kontrolisani uz pomoć softvera AxioVision V4,6 (Zeiss, Göttingen, Nemačka). Fotografije Langerhansovih ostrvaca su slikane na uveličanju od 400x i 630x. Za određivanje optičke gustine je napravljeno 40 fotografija ostrvaca (rezolucije 2584 x 1936 piksela) po životinji.

3.1.4.1. Određivanje optičke gustine (OD)

Kvantifikacija glukagona, insulina, CYP2E1, iNOS, CAT, SOD1 i SOD2 u ćelijama Langerhansovih ostrvaca je izvršena uz pomoć Windows softvera ImageJ (ImageJ, Version 1.50f) na digitalnim fotografijama Langerhansovih ostrvaca slikanih sa preparata bojenih imunohistohemijskim metodama, primenom odgovarajućih antitela prikazanih u tabeli 2. Kvantifikacija se zasniva na merenju optičke gustine (engl *optical density* - **OD**) DAB boje koja se vezala za posmatrani protein.

Za razdvajanje DAB i hematoksilin boja korišćen je programski dodatak "*Colour deconvolution plugin*" da bi se odredila tačna optička gustina vektora za RGB kanal (Crveno-zeleno-plavi kanal, eng. *Red-Green-Blue* - **RGB**) ovih boja kod imunohistohemijski obojenih preparata. Prema metodi koju su uspostavili Ruifork i sar. (2001) i Varghese i sar. (2014), merena je optička gustina RGB kanala za DAB boju i proporcionalna je koncentraciji boje na preparatu. Zbog toga se količina boje može odrediti merenjem optičke gustine na talasnoj dužini specifičnoj za tu boju u skladu sa Lambert-Beer-ovim zakonom (Jähne, 1997).

Optička gustina se izračunava preko formule:

$$OD = -\log_{10} (I_C/I_{0,C}),$$

gde je I_C intenzitet detektovane svetlosti nakon prolaska kroz preparat, a $I_{0,C}$ je intenzitet ulazne svetlosti koje pada na preparat.

3.1.5. Priprema u seruma i određivanje koncentracije glukoze u serumu

Krv životinja iz kontrolne i eksperimentalnih grupa je uzeta iz tela pacova, odmah nakon izvršene dekapitacije. Krv je centrifugirana 10 min na 2000 g na 4°C i izdvojen je serum. Koncentracija glukoze u serumu je određivana na *Konelab 20XT* analyzer-u (Thermo Fisher, Finska), uz korišćenje GLUCOSE MR reagensa (LINEAR CHEMICALS S:L., Španija). Analiza je urađena od strane Instituta za primenu nuklearne energije, Beograd u skladu sa standardom ISO 9001.

3.2. ĆELIJSKA KULTURA

Ćelijska linija insulinoma β -ćelija pacova (*Ratus norvegicus*) Rin-5F (ATCC-CRL-2058) (dobijena ljubaznošću dr Melite Vidaković, Odeljenje za molekularnu biologiju, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd) gajena je u RPMI-1640 medijumu (Roswell Park Memorial Institute medium, Gibco, Paisley, UK) u koji je dodat 10% fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum* - **FBS**) kao i 50 units/ml penicilina i 50 μ g/ml streptomicina. Ćelijska linija je gajena pod konstantnim uslovima od 37°C, u atmosferi od 5% CO₂. Nakon dostizanja stanja potpune konfluentnosti, ćelije su tripsinizovane i ponovo kultivisane.

3.2.1. Tripsinizacija ćelija

Rin-5F ćelije adheriraju za dno flaska u kojem se nalaze tokom gajenja. Da bi mogle da se koriste u eksperimentu, neophodno je da se uklone za dna posude za gajenje što se postiže tehnikom tripsinizacije. Kada je dostignuta konfluentnost ćelija od 70%, uklanjan je medijum za kultivisanje, i ćelije su pažljivo ispirane PBS puferom pH 7,4 (eng. *phosphate-buffered saline* - **PBS**) (*Ambion*®, *Thermo Fisher Scientific*) da bi se uklonile mrtve i neadherentne ćelije, ali i da bi se uklonio višak medijuma koji bi ometao aktivnost tripsina. Nakon ispiranja, PBS se uklanja, a na ćelije se dodaje 1 ml rastvora tripsina-EDTA (0,25%) (Gibco, Paisley, UK). Tripsin je enzim koji prekida međućelijske veze što dovodi i do odlepljivanja ćelija od dna posude za gajenje. Kada ćelije počnu da se odvajaju od podloge, reakcija se prekida dodavanjem 4 ml medijuma sa serumom, nakon čega sledi resuspenzija ćelija, brojanje ćelija i njihovo korišćenje u daljem eksperimentu.

3.2.2. Priprema ćelijske suspenzije za sejanje na mikrotitar ploče

Po dostizanju 70% konfluentnosti, ćelije su tripsinizovane, resuspendovane i prenete u falkon iz kojeg je uzeto 50 μ l ćelijske suspenzije i dodato u kivetu u kojoj se nalazi 50 μ l 0.4% boje tripan plavo (Sigma Aldrich Chemicals Co., St. Louis, MO, USA). Po 10 μ l obojene ćelijske suspenzije se dodaje na svaku, od dve ugravirane Bürker-Türk mrežice hemocitometra. Ćelije su se brojale na obe mrežice na Laica DM IL LED mikroskopu (Leica, Wetziar, Nemačka). Broj ćelija po ml medijuma je izračunat prema formuli:

$$\text{Broj ćelija/ml} = (X_1 + X_2)/2 \times 2 \times 10000$$

gde je X_1 broj ćelija izbrojanih na jednoj mrežici hemocitometra, a X_2 broj ćelija izbrojanih na drugoj mrežici hemocitometra.

U sterilne mikrotitar ploče sa 96 bunarića u svaki bunarić je zasejano 5×10^4 ćelija u ukupnoj zapremini medijuma 0,2 ml. U sterilne mikrotitar ploče sa 6 bunarića zasejano je 1×10^6 ćelija/bunariću u ukupnoj zapremini medijuma 2 ml.

3.2.3. Test vijabilnosti ćelija

Vijabilnost ćelijske linije Rin-5F nakon tretmana akrilamidom je analizirana sa dva testa vijabilnosti:

1. 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid (MTT) testom
2. Metodom bojenja tripan plavo

3.2.3.1. MTT test

MTT test je kolorimetrijski test koji je pouzdan indikator metaboličke aktivnosti ćelije. Test se zasniva na redukciji MTT, žute hidrosolubilne tetrazolijumske boje, mitohondrijalnim dehidrogenazama, pri čemu nastaju karakteristično obojeni formazanski kristali. Pošto su jedino enzimi iz aktivnih mitohondrija živih ćelija u mogućnosti da izvedu redukciju, ovaj test je precizan pokazatelj ćelijske vijabilnosti.

Za MTT esej, Rin-5F ćelije su sejane na sterilne ploče sa 96 bunarića ravnog dna. Nakon dostizanja 70% konfluentnosti, ćelije su tretirane sa rastućim koncentracijama akrilamida (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM i 20 mM) tokom 24 h, na 37°C. Po isteku tretmana, medijum je uklonjen, a u svaki bunarić je dodato 200 µl rastvora MTT-a (Sigma Aldrich Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) u RPMI medijumu u koncentraciji od 0,1 mg/ml. Ćelije su inkubirane u mraku, 2 h na 37°C. Nakon isteka inkubacije, rastvor MTT-a je odliven, a u svaki bunarić sa ćelijama je dodato 100 µl dimetil sulfoksida (DMSO) da bi se rastvorili nastali kristali formazana. Nakon toga je merena apsorbansa na 570 nm u automatskom čitaču za mikrotitarske ploče Multiskan EX (Thermo Labsystems, Kina). Vijabilnost ćelija je izražena u procentima, nakon poređenja sa kontrolnim ćelijama za koje se smatra da su 100% vijabilne.

3.2.3.2. Tripan plavo test

Tripan plavo je boja koja se koristi za selektivno bojenje ćelija. Metoda se zasniva na činjenici da je boja tripan plavo negativno naelektrisana i ne može da prođe kroz polupropustljivu membranu živih ćelija. Zbog toga žive ćelije ostaju nebojene, ali se mrtve ćelije boje plavo jer membrana gubi svojstvo selektivne propustljivosti.

Za tripan plavo metodu bojenja, Rin-5F ćelije su sejane na sterilne ploče sa 6 bunarića ravnog dna. Nakon dostizanja 70% konfluentnosti, ćelije su tretirane sa rastućim koncentracijama akrilamida (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM i 20 mM) tokom 24 h, na 37°C. Po isteku tretmana, pokupljen je ćelijski supernatant i odliven u falkon, a nakon tripsinizacije i resuspendovanja, u isti falkon su prebačene i ćelije zalepljene za dno bunarića. Iz dobijene suspenzije ćelija je izdvojeno 10 µl suspenzije i pomešano sa 0,4% rastvorom boje tripan plavo (Sigma Aldrich Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) u odnosu 1:1. Nakon toga, obojene i nebojene ćelije su brojane pod invertnim mikroskopom u Bürker-Türk komori hemocitometra. Procenat vijabilnih ćelija se računao po formuli:

% vijabilnih ćelija = $[1 - (\text{broj obojenih ćelija} / \text{broj ukupnih ćelija})] \times 100$.

3.2.4. Priprema homogenata Rin-5F ćelija za određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

Rin-5F ćelije su sejane u sterilne ploče sa 6 bunarića ravnog dna. Nakon dostizanja 70% konfluentnosti, ćelije su tretirane sa akrilamidom u koncentraciji od 10 mM (IC₅₀) u različitim vremenskim intervalima (0,5, 1, 3, 6, 12, i 24 h). Nakon isteka tretmana kontrolne i tretirane ćelije pokupljene su u PBS-u. Ćelije su zatim prebačene u ependorf epruvetu i centrifugirane 5

min na 200 x g, na 4°C. Nakon centrifugiranja supernatant je odliven, a na ćelijski talog dodato je 3 zapremine fosfatnog pufera (50 mM, pH 7,8). Ćelije su zatim sonifikovane sa jednim pulsom koji je trajao 30 s. Nakon izvršene sonifikacije, uzorci su centrifugirani 1 min na 14000 x g, 4°C. Supernatant je prebačen je u novu ependorf epruvetu, alikvotiran i čuvan na -80°C.

3.2.4.1. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Katalaza (CAT) je enzim koji katališe reakciju tokom koje dolazi do razgradnje vodonik peroksida (H₂O₂) do kiseonika i vode. Metoda kojom se prati aktivnost katalaze u ćeliji se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju razgradnje H₂O₂ koje se uočava kao pad apsorbance na talasnoj dužini od 240 nm, na kojoj H₂O₂ pokazuje maksimum apsorpcije (Aebi, 1984).

Enzimski esej se izvodi u rastvoru H₂O₂ koji je pripremljen tako što je dodato 30% H₂O₂ u 50 mM fosfatni pufer pH 7,0 do postizanja apsorbance između 0,520 i 0,550 na 240 nm. Reakcija je započeta dodavanjem 25 µl uzorka u 3 ml podešenog rastvora H₂O₂ i praćena je promena apsorbance na na 240 nm tokom 3 minuta. Eksperiment je rađen sa kontrolnim Rin-5F ćelijama i ćelijama koje su tretirane sa 10 mM dozom AA tokom 0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h.

Specifična aktivnost CAT je računata po formuli:

$$\text{Specifična aktivnost CAT (U/mg proteina)} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times 1000}{43,6 \times C_{pr} \times V_{uz}/V_{rs}}$$

Gde su:

ΔA_{uz} - promena apsorbance u minuti za uzorak

ΔA_{sp} - promena apsorbance u minuti za slepu probu

C_{pr} - koncentracija proteina mg/ml

V_{uz} - zapremina uzorka u ml

V_{rs} - zapremina reakcione smeše u ml

43.6 - molarni ekstincioni koeficijent za vodonik peroksid na 240 nm

3.2.4.2. Određivanje aktivnosti ukupne superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD je određivana po metodi McCord i Fridovich (1968) u sistemu citohrom c (Fe³⁺) / ksantin / ksantin oksidaza. Metoda se zasniva na tome da superoksidni radikal koji nastaje u reakciji ksantina sa ksantin oksidazom (XOD), redukuje citohrom c iz fero u feri oblik (Fe³⁺ u Fe²⁺) što se uočava kao promena apsorbance na 550 nm. Ukoliko je SOD prisutna u uzorku, doći će do dismutacije superoksidnog radikala što će za posledicu imati smanjenje brzine redukcije citohroma c. Smanjenje brzine redukcije citohroma c je proporcionalno aktivnosti SOD. Za jedinicu aktivnosti SOD uzima se ona aktivnost SOD koja je potrebna za smanjenje brzine redukcije citohroma c za 50% pri promeni apsorbance od 0,025/min u slepoj probi. Aktivnost ukupne SOD je merena u uzorcima kontrolnih i tretiranih Rin-5F ćelija. Reagensi su pripremljeni na sledeći način:

Rastvor A: 0,57 ml KH₂PO₄, 3,14 ml Na₂HPO₄, 0,1 ml EDTA, 1,0 ml NaN₃, 1,0 ml ksantina, 0,4 ml citohroma c i dH₂O do zapremine od 100 ml. Rastvor A je podešen na pH 7,8.

Rastvor B: 0,2 U XOD/ml u 0,1 mM EDTA. Rastvor B se uvek pravi svež, i drži se na ledu.

Reakciona smeša je dobijena mešanjem 1,3 ml rastvora A, 0,1 ml rastvora B i 20µl uzorka. Prvo se pomešaju rastvor A i uzorak, a reakcija počinje dodavanjem rastvora B. Apsorbanca se prati u

toku 3 minuta, na sobnoj temperaturi. Aktivnost SOD se izražava u jedinicama aktivnosti po mg proteina:

$$\text{Specifična aktivnost SOD (U/mg proteina)} = \frac{(\Delta A_{\text{sp}} - \Delta A_{\text{uz}}) \times 100}{50 \times \Delta A_{\text{sp}} \times \Delta C_{\text{pr}} \times V_{\text{uz}}}$$

Gde su:

ΔA_{sp} – srednja promena apsorbance slepe probe

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔC_{pr} – koncentracija proteina u uzorku (mg/ml)

V_{uz} - zapremina uzorka u ml

3.2.5. Merenje koncentracije nitrita u supernatu ćelijske kulture Rin-5F ćelija

Kao merilo aktivnosti iNOS i sinteze NO \cdot se koristi metoda kojom se indirektno meri sinteza NO \cdot određivanjem koncentracije nitrita (NO $_2^-$) u medijumu u kojem su gajene ćelije. Azot-monoksid (NO \cdot) slobodni radikal koji karakteriše visoka reaktivnost. U supernatantu ćelijskih kultura, NO \cdot brzo reaguje sa molekularnim kiseonikom (O $_2$) ili superoksidnim anjonom (O $_2^{\cdot-}$) što dovodi do stvaranja nitrita (NO $_2^-$) i nitrata (NO $_3^-$), koji su hemijski stabilniji (Chen i sar., 1998). Metoda se zasniva na merenju koncentracije nitrita koja se određuje kolorimetrijskom detekcijom uz dodatak Griess-ovog reagensa, koji sa nitritima formira azo-boju. Eksperiment je rađen sa kontrolnim Rin-5F ćelijama i ćelijama koje su tretirane sa 10 mM koncentracijom AA tokom 0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h, a za merenje koncentracije prisutnog NO $_2^-$ se koristi medijum u kojem su gajene ćelije.

Nakon tretmana 100 μ l medijuma u kojem su gajene ćelije prebačeno je u mikrotitar ploču sa 96 bunarića ravnog dna. Zatim je dodato 50 μ l 1% rastvora sulfanilamida pripremljenog u 5% H $_3$ PO $_4$ (Griess A) a nakon desetominutne inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku, dodato je i 50 μ l 0,1% rastvora N-1-naftilendiamin dihidrohlorida (Griess B). Nakon toga su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi 10 min u mraku uz blago mućkanje. Apsorbanca je merena na 540 nm. Koncentracija nitrita je izračunata prema standardnoj krivi koja je dobijena merenjem absorbancija za poznate koncentracije NaNO $_2$.

3.2.6. Priprema homogenata Rin-5F ćelija i esej za određivanje lipidne peroksidacije

3.2.6.1. Priprema homogenata

Rin-5F ćelije su sejane u sterilne ploče sa 6 bunarića ravnog dna. Nakon dostizanja 70% konfluentnosti, ćelije su tretirane sa akrilamidom u koncentraciji od 10 mM (IC $_{50}$) u različitim vremenskim intervalima (0,5, 1, 3, 6, 12, i 24 h). Nakon isteka tretmana kontrolne i tretirane ćelije pokupljene su u PBS-u. Ćelije su zatim prebačene u ependorf epruvetu i centrifugirane 5 min na 200 x g, na 4°C. Nakon centrifugiranja supernatant je odliven, a na ćelijski talog dodato je 3 zapremine KCl pufera (1,15 M, pH 7,4). Ćelije su zatim sonifikovane sa jednim pulsom koji je trajao 30 s. Nakon sonifikacije je dobijeni homogenat korišćen za pripremu reakcione smeše.

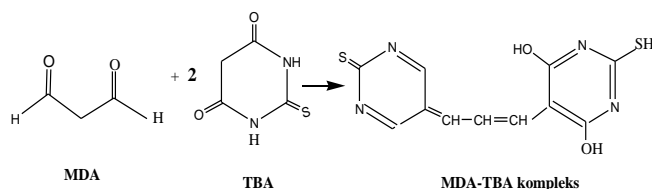
Reakciona smeša je pripremana tako što je 0,1 – 0,5 ml homogenata dobijenog sonifikacijom pomešano sa 1 ml TCA-TBA-HCl reagensa, promešano na vorteksu i zagrevano u vodenom kupatilu 30 min na 90°C. Nakon zagrevanja, epruvete su ohlađene na ledu 5 min, a zatim centrifugirane na 1000 x g, 10 min. Za dalju analizu se koristi supernatant.

3.2.6.2. Određivanje lipidne peroksidacije (TBARS)

TBARS (eng. *ThioBarbituric Acid Reactive Substances* - **TBARS**) esej je metoda za kvantifikaciju prisustva malondialdehida (MDA), kao krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije čija koncentracija se povećava u uslovima oksidativnog stresa (Buege i Aust, 1978).

TBARS esej se bazira na reakciji u kojoj nastaje kompleks između 2-tiobarbiturine kiseline (TBA) sa malondialdehidima (MDA), pri čemu nastaje obojeni kompleks sa apsorpcionim maksimumom na 535 nm i molarnim ekstinkcionim koeficijentom $\epsilon=15,6 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Formiranje kompleksa se dešava na temperaturi od 90-100°C.

Mehanizam reakcije TBARS



Koncentracija TBARS je određena spektrofotometrijski, iz supernatanta, na 535 nm uz TCA-TBA-HCl reagens kao slepu probu.

Reagens TCA-TBA-HCl je pripremljen kao 15% w/v TCA – 15 g trihloroacetne kiseline; 0,375% w/v TBA – 0,375 g tiobarbiturine kiseline; 0,25 M HCl - ~2,1 ml cHCl; prvo su rastvoreni TCA i TBA, a zatim je dodata kiseline i sve je dopunjeno do ukupne zapremine od 100 ml sa dH₂O.

Količina MDA se računa prema formuli:

$$C_{\text{TBARS}} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 10}{1,56 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}} \text{ (MDA nmol/mg proteina)}$$

ΔA_{sp} – srednja vrednost apsorbanije slepe probe

ΔA_{uz} - srednja vrednost apsorbanije uzorka

V_{rs} - zapremina reakcione smeše (ml)

V_{uz} – zapremina uzorka (ml)

C_{pr} – koncentracija proteina u mg/ml

3.2.7. Priprema homogenata Rin-5F ćelija i esej za određivanje redukovanoG GSH i slobodnih -SH grupa proteina

3.2.7.1. Priprema homogenata

Za određivanje redukovanoG GSH i slobodnih –SH grupa proteina, Rin-5F ćelije su sejane na sterilne ploče sa 6 bunarića ravnog dna. Nakon dostizanja 70% konfluentnosti, ćelije su tretirane sa akrilamidom u koncentraciji od 10 mM (IC₅₀) u različitim vremenskim intervalima (0,5, 1, 3, 6, 12, i 24 h). Nakon isteka tretmana, kontrolne i tretirane ćelije pokupljene su u PBS-u. Ćelije su zatim centrifugirane 5 min na 4°C, na brzini od 200 x g. Nakon centrifugiranja, supernatant je odliven, a talog je resuspendovan u 2,5% sulfosalicilnoj kiselini (eng. sulphosalicylic acid - SSA) i sonifikovan sa jednim pulsom koji je trajao 30 s. Homogenati dobijeni sonifikacijom su, zatim, inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi i centrifugirani 5 min na 4°C na brzini od 5000 x g. Supernatant dobijen ovim putem je korišćen dalje za određivanje redukovanoG GSH. Talog dobijen nakon centrifuge je dva puta ispran sa 100 µl 2% SSA, a zatim resuspendovan u 100 µl 6M guanidin-HCl, i iz njega su određivane slobodne –SH grupe.

3.2.7.2. Određivanje redukovanoG glutationa (GSH) i slobodnih –SH grupa proteina

Redukovani glutation i slobodne –SH grupe su određivani metodom po Ellman-u (Ellman, 1959), kao količina neproteinskih sulfhidrilnih ostataka (tiola). Metoda se zasniva na reakciji redukovanoG GSH i redukovanih –SH grupa proteina sa 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoevom kiselinom (DNTB), kada nastaje žuto obojeni proizvod, 2-nitro-5-tiobenzoeva kiselina (TNB). Formirani proizvod se detektuje spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 405 nm.

Potrebni reagensi su: Ellman-ov reagens (0.2 mM DTNB u 0.1 M fosfatnom puferu pH 8.0), 4% SSA i standardi GSH koncentracije od 2 do 0,125 mM u 4% SSA.

Esej je rađen u mikrotitar pločicama tako što je na 20µL standarda/uzorka dodavano 200 µL Ellman-ovog reagensa. Sadržaj redukovanoG GSH izračunat je na osnovu standardne krive dobijene određivanjem apsorbancija za poznate koncentracije GSH rastvorene u 4% SSA, a izražen je kao GSH nmol/mg proteina. Slobodne –SH grupe proteina su izračunate na osnovu standardne krive za GSH i izražene kao -SH nmol/mg proteina.

3.2.8. Merenje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina u svim uzorcima je utvrđivana Bradford-ovom metodom (1976). Princip metoda se zasniva na reakciji proteina sa bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 sa kojom formiraju kompleks i uzrokuju promenu boje iz smeđe-crvene u plavu, sa maksimumom apsorpcije na 595 nm. Mereni intenzitet plave boje je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku koja je određivana na osnovu standardne krive. Kao standard korišćen je goveđi serum albumin, BSA (eng. *bovine serum albumin* - BSA). Esej je rađen u mikrotitar pločici dodavanjem 250 µl Bradford-ovog reagensa na 5 µl standarda/uzorka.

3.2.9. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

Ekspresija gena za Bax i Bcl-2, insulin, CAT, SOD1, SOD2, iNOS i CYP2E1 u β -ćelijama je ispitana metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (eng. *real-time PCR - RT-qPCR*).

3.2.9.1. Priprema uzoraka i izolacija totalne RNK

Rin-5F ćelije su sejane u sterilne mikrotitar ploče sa 6 bunarića ravnog dna i tretirane sa 10 mM (IC_{50}) koncentracijom AA u različitim vremenskim intervalima (0,5, 1, 3, 6, 12, 24 h). Po dostizanju 70% konfluentnosti izolovana je totalna RNK uz pomoć RNAqueous®-4PCR Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) prema uputstvu proizvođača.

Po isteku tretmana, supernatant je odbačen, a ćelije su pokupljene u 350 μ l pufera za lizu (eng. *Lysis/Binding Solution*) i dodatno lizirane na vorteksu. Na lizirane ćelije je dodato 350 μ l 64% etanola i svaki uzorak je promešan na vorteksu. Lizirane ćelije su prebačene na filter kolonu (eng. *Filter Cartridge*) postavljenu u ependorf epruvetu od 2 ml i centrifugirane 1 min na 15000 x g. Nakon završenog centrifugiranja, filtrat je obačen, a filter je ispran sa 700 μ l pufera za ispiranje #1 (eng. *Wash Solution #1*) nakon čega je uzorak ponovo centrifugiran 1 min na 15000 x g. Filtrat je uklonjen, a zatim je filter ispran sa 500 μ l pufera za ispiranje #2/3 (eng. *Wash Solution #2/3*) i centrifugiran 1 min na 15000 x g. Kolona je još jednom isprana sa 500 μ l pufera za ispiranje #2/3 i centrifugirana 1 min na 15000 x g. Kolona je prebačena u novu ependorf epruvetu koja je oslobođena RNKaze (eng. *RNase-free*), i na centar filtera, gde se nalazi vezana RNK, dodato je 50 μ l elucionog rastvora (eng. *Elution Solution*) koji je prethodno zagrejan na 80°C. Nakon toga je ponovo usledilo centrifugiranje 30 sekundi na 15000 x g na sobnoj temperaturi. Zatim je na kolonu dodato još 30 μ l elucionog rastvora i ponovljeno je centrifugiranje pod istim uslovima. Dobijen je eluat koji sadrži celokupnu ćelijsku RNK. Da bi se otklonili tragovi kontaminacije sa DNK iz uzorka, primenjen je tretman DNKazom. U eluat je dodato je 8 μ l 10x DNKaza 1 pufera (eng. *DNase 1 Buffer*) i 1 μ l DNKaze 1 (eng. *DNase 1*), nakon čega je uzorak inkubiran 30 min na 37°C. Kada je završen inkubacioni period eluat je pomešan sa 8,8 μ l reagensa za inaktivaciju DNKaze (eng. *DNase Inactivation Reagent*) i inkubiran 2 min na sobnoj temperaturi. Čistoća i koncentracija dobijene totalne RNK su proverene merenjem apsorbance na 260 nm na BioSpec-nano spektrofotometru (*Shimadzu, Hadano, Japan*).

3.2.9.2. Reverzna transkripcija

Nakon izolovanja i merenja koncentracije, RNK je reakcijom reverzne transkripcije prevedena u komplementranu DNK (cDNK) pomoću High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Komplementrana DNK predstavlja lanac DNK sintetisan na osnovu lanca iRNK u reakciji koju katalizuje enzim reverzna transkriptaza.

Reakciona smesa se sastojala od 10 μ l RNK uzorka (1 μ g RNK), 2 μ l 10xRT pufera (eng. *RT Buffer*), 0,8 μ l 100 mM dNTP, 2 μ l 10xRT nasumičnih prajmera (eng. *RT Random Primers*), 1 μ l reverzne transkriptaze (eng. *MultiScribeTM Reverse Transcriptase*), 1 μ l inhibitora RNKaze (eng. *RNase Inhibitor*) i 3,2 μ l vode oslobođene nukleaza (eng. *nuclease-free H₂O*).

Reakcija reverzne transkripcije se odvijala u 3 koraka u bloku za zagrevanje (eng. *Thermal cycler*). Prvi korak je bio zagrevanje na 25°C 10 min, drugi korak je zagrevanje na 37°C 120

min, a treći korak je zaustavljanje reakcije zagrevanjem uzorka na 85°C 5 min. Sintetisana cDNK je čuvana na -20°C do dalje upotrebe.

3.2.9.3. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (qPCR)

Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu je izvedena uz pomoć mikrotitar ploča sa 96 bunarića adaptiranih za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, Warrington, UK) i Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). Power SYBR® Green PCR Master Mix sadrži fluorescentnu boju SYBR® Green, enzim DNK polimerazu – (AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase, UP) dNTP, optimizovan pufer i *Passive reference*. Pre dodavanja u qPCR reakciju, cDNK matrica je razblažena 10x.

Reakciona smeša za qPCR koja se dodavala u svaki bunarić mikrotitar ploče u ukupnoj zapremini od 10 µl se sastojala od 5 µl SYBR Green Master Mix (2X), 0,5 µl specifičnih prajmera za gen od interesa (Tab. 3) ili za referentni gen β-aktin, 2 µl cDNK i 2 µl dH₂O. Prajmeri korišćeni u reakcionoj smeši su dati u tabeli 3. Ploča je prekrivena optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems, Warrington, Velika Britanija), centrifugirana 3 min na 1000 x g i prenetu u termoblok RT-qPCR MasterCycler RealPlex 4 (Eppendorf, Hamburg, Germany) aparata. Amplifikacija se odvijala na sledeći način: inicijalna denaturacija 10 min na 95°C, praćena koracima denaturacije DNK lanca 15 s na 95°C i vezivanja prajmera i elongacije lanca od 1 min na 60°C. Ciklus je ponovljen 40 puta. Nivo ekspresije gena od interesa standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β-aktin koji je detektovan u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt}, gde je dCt razlika između Ct vrednosti ispitivanog gena i gena za β-aktin.

Tabela 3. Sekvence prajmera korišćenih za qPCR analizu.

Naziv gena	Sekvenca para prajmera 5' – 3'
Bcl-2	Fw: 5'-AAGCTGTCACAGAGGGGCTA-3' Rev: 5'-CTCTCAGGCTGGAAGGAGAA-3'
Bax	Fw: 5'-CTGCAGAGGATGATTGCTGA-3' Rev: 5'-GATCAGCTCGGGCACTTTAG-3'
β-aktin	Fw: 5'-AGATTACTGCCCTGGCTCCT-3' Rev: 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'
Insulin	Fw: 5'-ATGGCCCTGTGGATGCGCTT-3' Rev: 5'-ACAATGCCACGCTTCTGCCG-3'
Katalaza	Fw: 5'-CCAGCGACCAGATGAAGCA-3' Rev: 5'-TGGTCAGGACATCGGGTTTC-3'
SOD1	Fw: 5'-AAGCGGTGAACCAGTTGTG-3' Rev: 5'-CCAGGTCTCCAACATGCC-3'
SOD2	Fw: 5'-GGTGGAGAACCCAAAGGAGA-3' Rev: 5'-AGCAGTGGAATAAGGCCTGT-3'
CYP2E1	Fw: 5'-TCCCCAAGTCTTTCACCAAGT-3' Rev: 5'-GAGCCAAGGTGCAGTGTGAAC-3'
iNOS	Fw: 5'-TGCTAATGCGGAAGGTCATG-3' Rev: 5'-GCTTCCGACTTTCCTGTCTCA-3'

3.3. STATISTIČKA OBRADA

Statistička obrada podataka dobijenih linearnim merenjima, stereološkom i serološkom analizom, kao i analizom optičke gustine je izvršena u program Statistica 8.0 (StatSoft, Inc). Stereološki parametri, optičke gustine, broj i dijametar Langerhansovih ostrvaca su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis ANOVA testom. Komparirane su razlike između eksperimentalnih grupa za svaki analizirani parameter, a vredosti $p < 0,05$ su smatrane statistički značajnim. Rezultati serološke analize su podvrgnuti analizi One-way ANOVA testom praćenim Bonferoni post-hoc testom. Komparirane su razlike između eksperimentalnih grupa sa postavljenim nivoom značajnosti od $p < 0,05$. Rezultati dobijeni analizama na Rin-5F ćelijskoj kulturi su analizirani Mann – Whitney U-testom. Dobijeni rezultati su prikazani kao srednja vrednost (mean) \pm standardna greska (SEM) za svaki ispitivani parameter i svaku eksperimentalnu grupu životinja.

4. REZULTATI

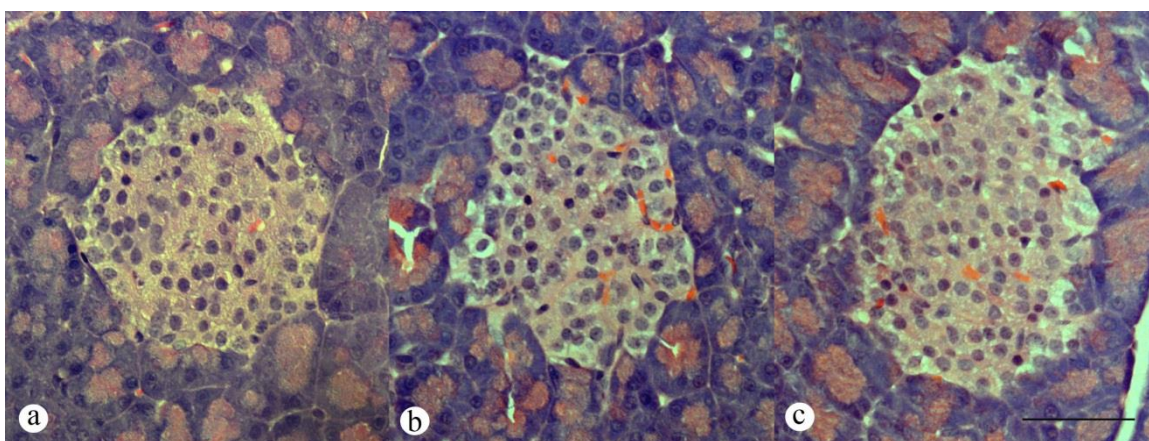
4.1. UTICAJ TRETMANA AKRILAMIDOM NA ENDOKRINI PANKREAS MUŽJAKA PACOVA SOJA WISTAR, TRETIRANIH U JUVENILNOM PERIODU

4.1.1. Opšta mikroanatomska struktura Langerhansovih ostrvaca nakon primene akrilamida

Histološkom, kvalitativnom analizom je proučavana mikroanatomska građa Langerhansovih ostrvaca kontrolnih i akrilamidom tretiranih mužjaka juvenilnih pacova soja Wistar, na preparatima obojenim H-E i Mallory metodom. Analiza preparata bojenih H-E metodom je izvršena na svetlosnom mikroskopom pri uveličanju od 400x, dok je analiza rezova pankreasa bojenih Mallory metodom izvršena na uveličanju od 630x. Na rezovima pankreasa bojenim H-E metodom nije uočena pojava značajnih promena u histološkoj građi Langerhansovih ostrvaca kod životinja tretiranih sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm (AA 25 mg/kg) i 50 mg/kg tm (AA 50 mg/kg) u poređenju sa kontrolom (Sl. 7). Tipična građa Langerhansovih ostrvaca bez uočljive promene u količini vezivnog tkiva je potvrđena i analizom preseka na uveličanju od 630x, bojenih Mallory metodom (Sl. 10).

4.1.2. Dijametar i broj Langerhansovih ostrvaca nakon primene akrilamida

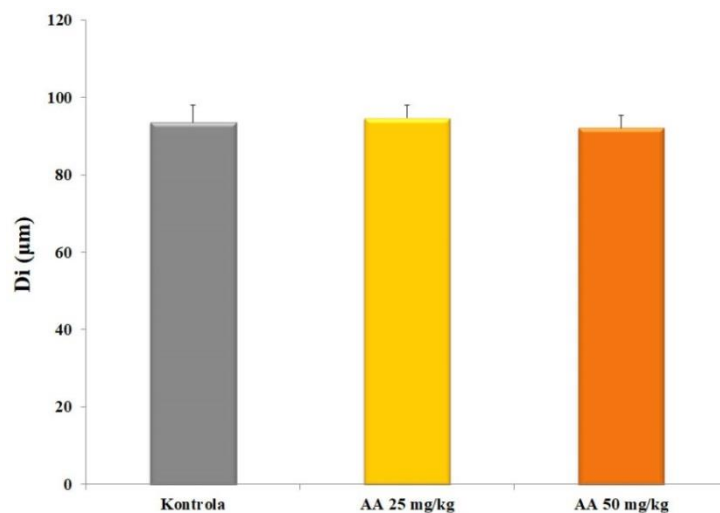
Dijametar i broj Langerhansovih ostrvaca kod kontrolnih i akrilamidom tretiranih životinja su određivani na ukupno 120 pankreasnih rezova (4 reza po životinji) obojenih H-E metodom, na uveličanju od 400x. Analiza preseka pankreasa tretiranih životinja sa obe doze akrilamida nije pokazala promenu ni u dijimetru, ni u broju Langerhansovih ostrvaca u poređenju sa kontrolnim životinjama.



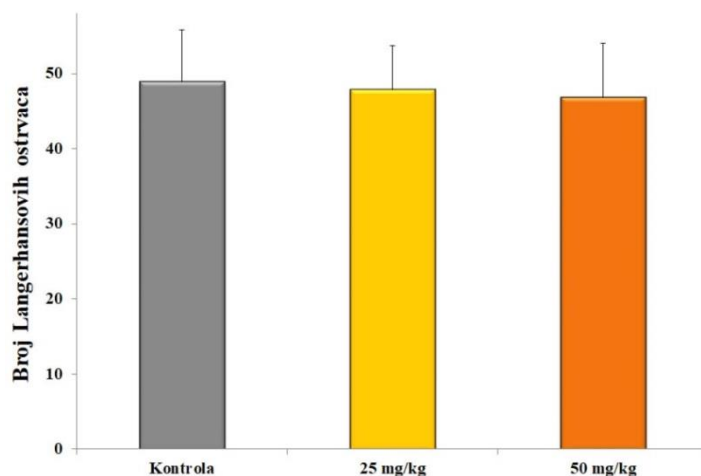
Sl. 7. Langerhansova ostrvca juvenilnih mužjaka pacova. (a) Kontrola, (b) AA 25 mg/kg tm, (c) AA 50 mg/kg tm. H-E metoda bojenja. Bar: 50 μ m.

Korigovani srednji dijametar (D_i) Langerhansovih ostrvaca nije statistički značajno promenjen kod pacova tretiranih sa obe doze akrilamida, u poređenju sa kontrolnim životinjama (Sl. 8).

Broj Langerhansovih ostrvaca je, dozno-zavisno smanjen, kod životinja tretiranih sa obe doze akrilamida. Međutim, uočeno smanjenje nema statističku signifikantnost u poređenju sa kontrolnim životinjama (Sl. 9).



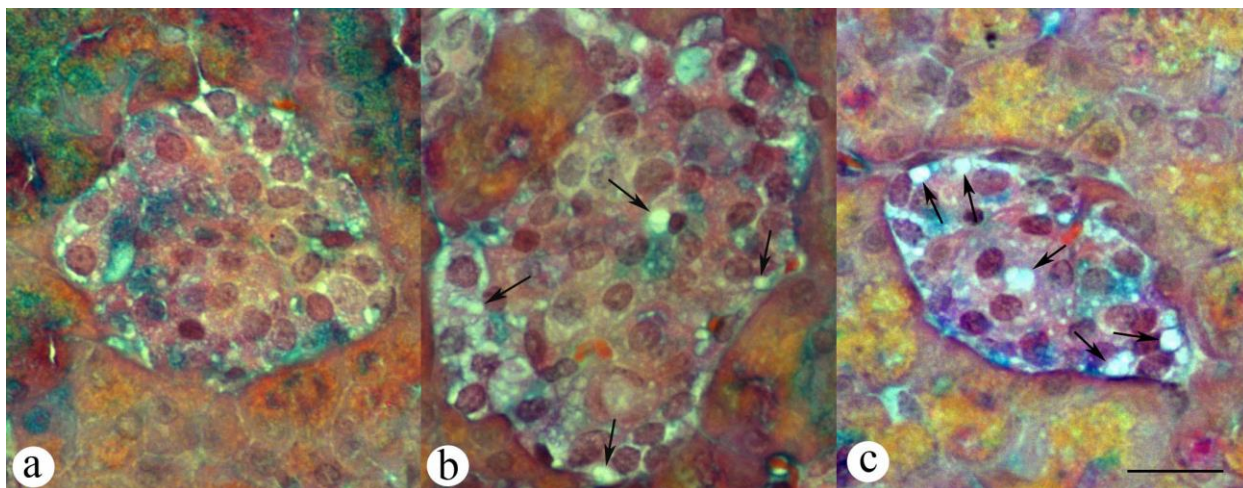
Sl. 8. Korigovani srednji dijamer (Di) Langerhansovih ostrvaca (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.



Sl. 9. Broj Langerhansovih ostrvaca (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa AA u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.

4.1.3. Analiza kapilara Langerhansovih ostrvaca nakon primene akrilamida

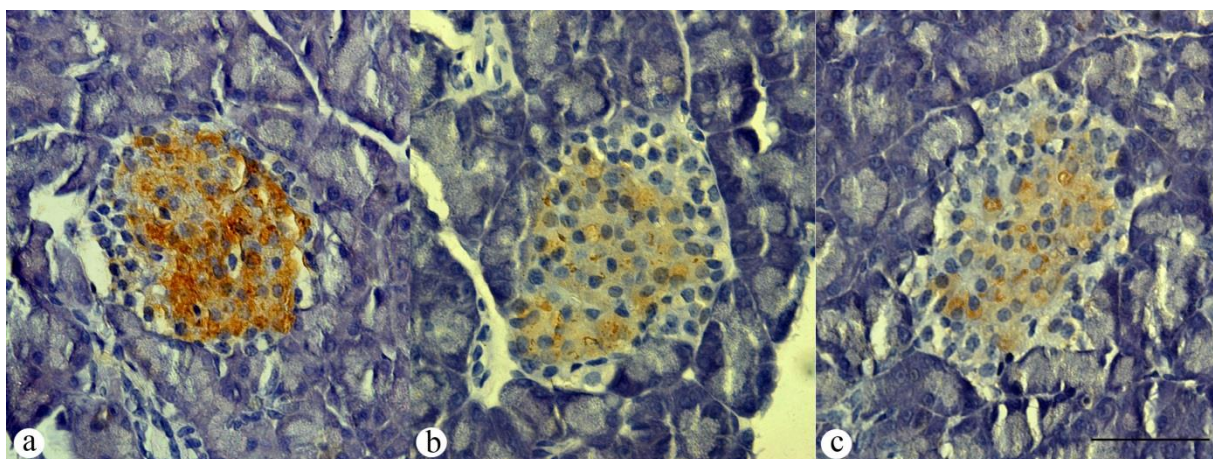
Analiza kapilara Langerhansovih ostrvaca kod kontrolnih i akrilamidom tretiranih životinja je izvršena na svetlosnim mikroskopom na presecima pankreasa obojenim trihromnom Mallory metodom, na uveličanju od 630x. Kod životinja tretiranih sa obe doze akrilamida se uočava dilatacija insularnih kapilara u odnosu na kontrolne životinje (Sl. 10).



Sl. 10. Langerhansova ostrvca juvenilnih mužjaka pacova. (a) Kontrola, (b) AA 25 mg/kg tm, (c) AA 50 mg/kg tm. Dilatirani kapilari (↑). Mallory metoda bojenja. Bar: 20 μ m.

4.1.4. Stereološka analiza β -ćelija kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

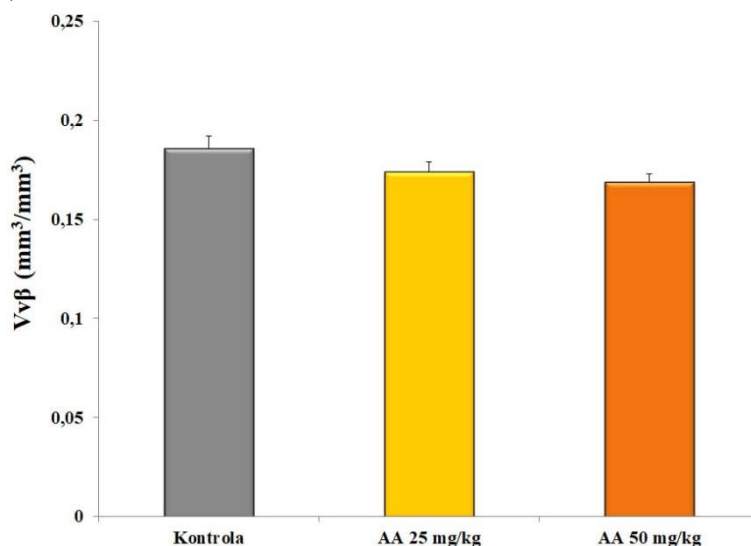
Langerhansova ostrvca kontrolnih pacova su sačinjena primarno od β -ćelija koje dominiraju i koje su tipično lokalizovane u centru ostrvca, što je osnovna karakteristika arhitekture ovih ostrvaca kod kontrolnih pacova (Sl. 11-a). Stereološkom metodom analizirane su volumenske gustine ($Vv\beta$), numeričke gustine ($Nv\beta$), površinske gustine ($Sv\beta$), volumenske gustine jedra ($Vvn\beta$), i citoplazme ($Vvc\beta$), kao i nukleocitoplazmatskog odnosa ($N\beta/C\beta$) pankreasnih β -ćelija. Imunopozitivne ćelije na insulin su kod tretiranih životinja pokazale dozno-zavisno smanjenje vrednosti svih posmatranih parametara, a $Nv\beta$ i $Sv\beta$ su pokazali dozno-zavisno smanjenje vrednosti koje je statistički značajno smanjena u obe tretirane grupe pacova ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu (Sl. 12-17).



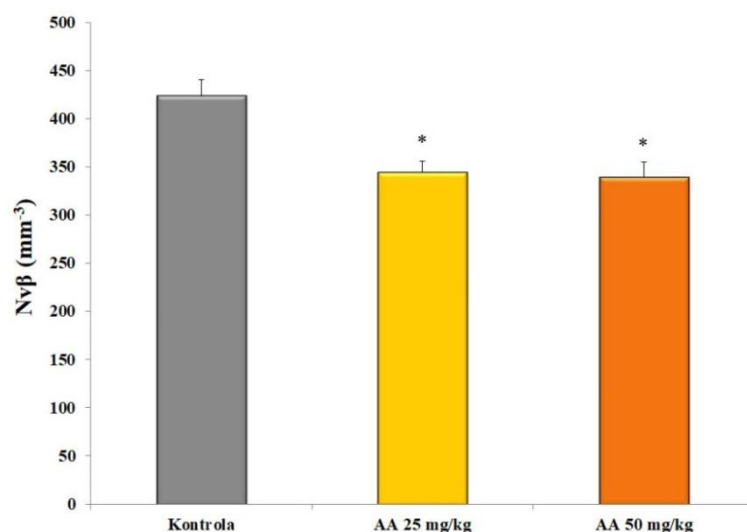
Sl. 11. Imunopozitivnost β -ćelija juvenilnih mužjaka pacova na insulin. Tamno-smeđa obojenost citoplazme predstavlja pozitivnu imunoreakciju. (a) Kontrola, (b) AA 25 mg/kg tm, (c) AA 50 mg/kg tm. Imunoheмиjsko bojenje na insulinski marker. Bar: 50 μ m.

4.1.4.1. Volumenska gustina β -ćelija ($Vv\beta$) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

Na slici 12 se vidi da je vrednost $Vv\beta$ pokazala tendenciju slabog opadanja u dozno-zavisnom maniru kod životinja tretiranih sa obe doze akrilamida u odnosu na kontrolu. Redukcija vrednosti $Vv\beta$ ni kod jedne tretirane grupe nije bila statistički signifikantna u poređenju sa kontrolnim životinjama (Sl. 12).



Sl. 12. Volumenska gustina β -ćelija ($Vv\beta$) (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.



Sl. 13. Numerička gustina β -ćelija ($Nv\beta$) (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10, * $p < 0,05$.

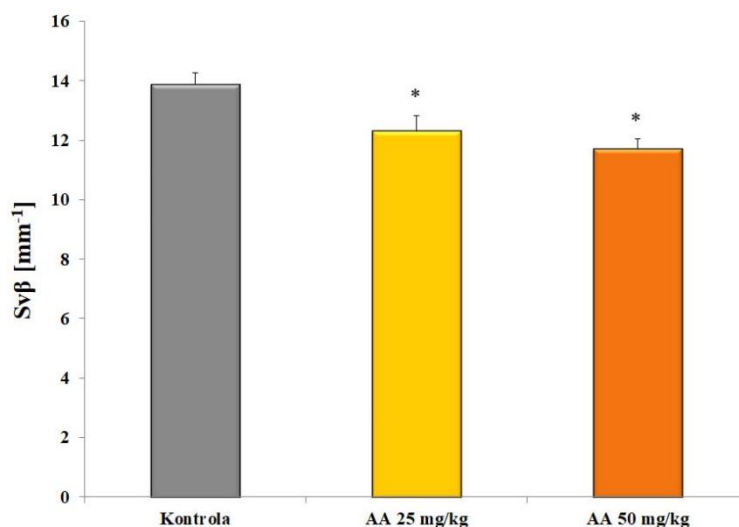
4.1.4.2. Numerička gustina β -ćelija ($Nv\beta$) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

Brojnost β -ćelija se pokazala kao veoma osetljiv parametar koji je imao dozno-zavisni odgovor na tretman sa obe doze akrilamida. Kod pacova tretiranih sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm je uočeno smanjenje u numeričkoj gustini β -ćelija za 18,69% koje je statistički značajno u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$). Tretman sa akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm je doveo do

daljeg smanjenja u broju β -ćelija za 19,9%, što je, takođe, predstavljalo statistički signifikantnu promenu u poređenju sa kontrolom (Sl. 13; Sl. 11-b, c).

4.1.4.3. Površinska gustina β -ćelija ($Sv\beta$) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

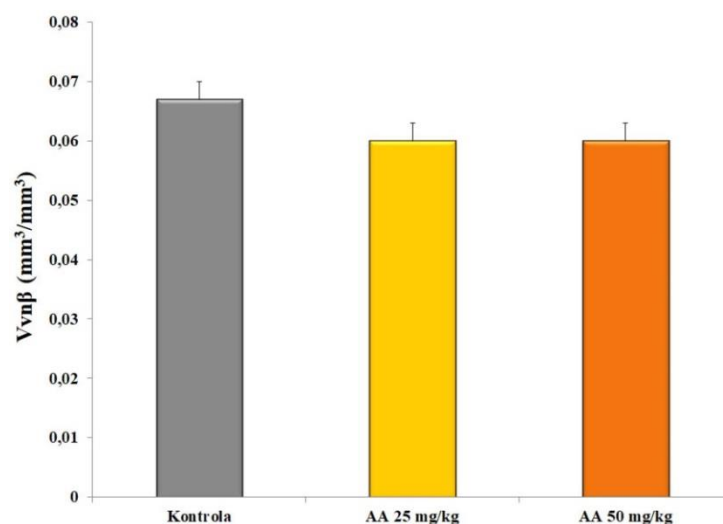
Površinska gustina β -ćelija je, takođe, pokazala dozno-zavisni pad u vrednosti kod obe grupe pacova tretiranih akrilamidom. Kao što se uočava na slici 14, vrednost $Sv\beta$ je kod pacova tretiranih sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm opala u odnosu na kontrolnu grupu za 11,37%, da bi se taj pad u vrednosti $Sv\beta$ nastavio kod pacova tretiranih sa akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm (15,62%). Pad u vrednosti $Sv\beta$ je kod obe akrilamidom tretirane grupe životinja bio statistički signifikantan u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$) (Sl. 14).



Sl. 14. Površinska gustina β -ćelija ($Sv\beta$) (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, $n=10$, $*p < 0,05$.

4.1.4.4. Volumenska gustina nukleusa β -ćelija ($Vvn\beta$) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

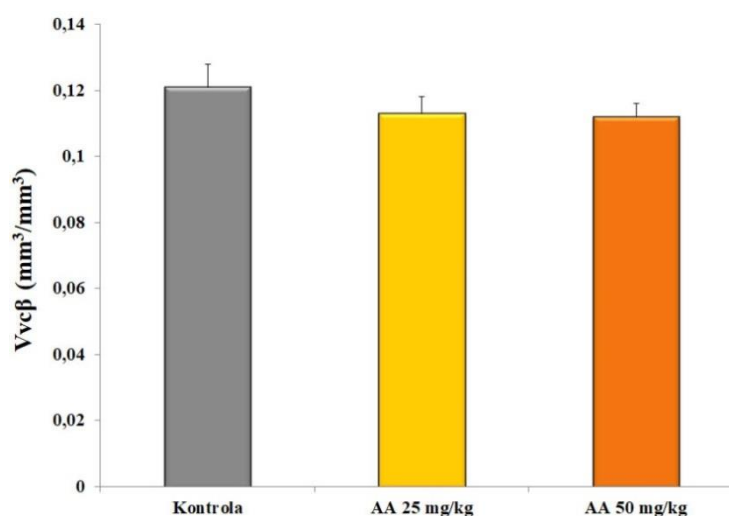
Tretman sa obe doze akrilamida, je doveo do nesignifikantnog smanjenja u vrednosti volumenske gustine nukleusa β -ćelija pankreasa u odnosu na kontrolu koja, međutim, nije bila dozno-zavisna (Sl. 15).



Sl. 15. Volumenska gustina nukleusa β -ćelija ($V_{vn\beta}$) (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.

4.1.4.5. Volumenska gustina citoplazme β -ćelija ($V_{vc\beta}$) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

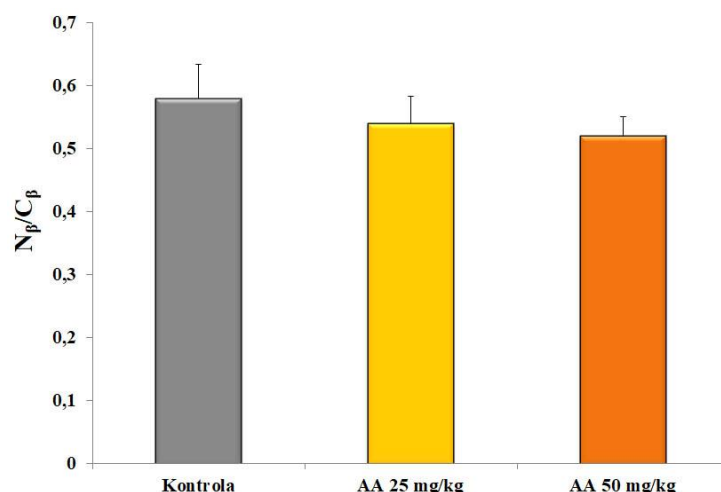
Volumenska gustina citoplazme β -ćelija je pokazala blagi pad u vrednosti kod tretiranih životinja, koji nije statistički signifikantan ni kod jedne tretirane grupe u poređenju sa kontrolom (Sl. 16).



Sl. 16. Volumenska gustina citoplazme β -ćelija (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.

4.1.4.6. Nukleocitoplazmatski odnos β -ćelija ($N\beta/C\beta$) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

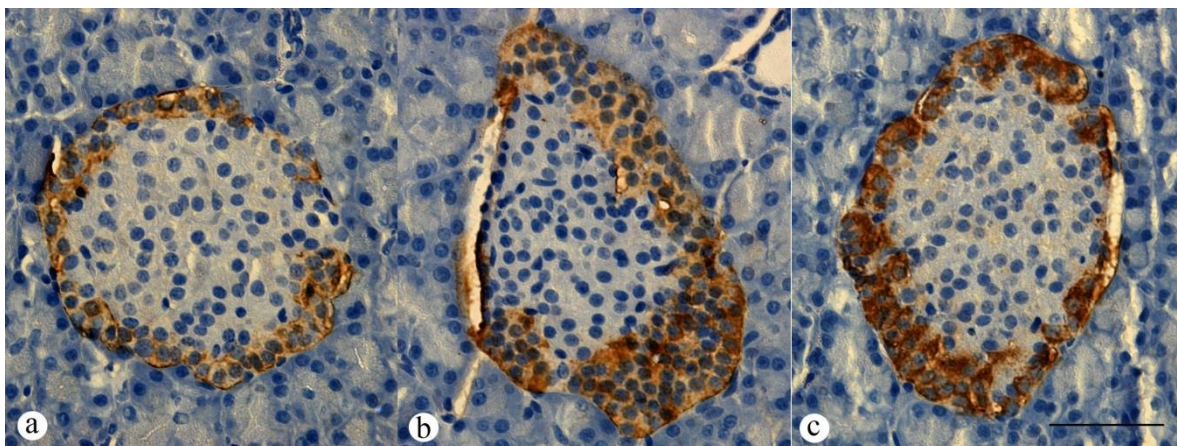
Nukleocitoplazmatski odnos ($N\beta/C\beta$) je parameter čija vrednost je opala kod β -ćelija blagom dozno-zavisnom maniru (Sl. 17). Pad vrednosti $N\beta/C\beta$ kod pacova tretiranih sa obe doze akrilamida je neznan i nije statistički signifikantan u poređenju sa kontrolnim životinjama.



Sl. 17. Nukleocitoplazmatski odnos β -ćelija (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm.

4.1.5. Stereološka analiza α -ćelija kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

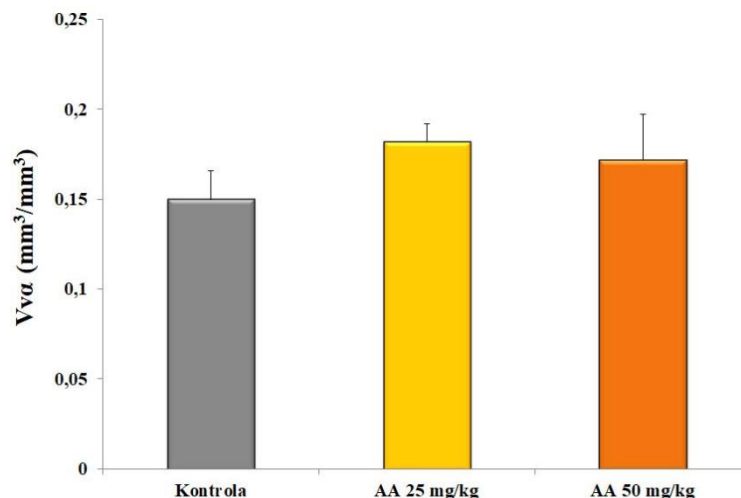
Stereološkom metodom analizirani su volumenska gustina ($Vv\alpha$), numerička gustina ($Nv\alpha$), površinska gustina ($Sv\alpha$), volumenska gustina jedra ($Vvn\alpha$), volumenska gustina citoplazme ($Vvc\alpha$) i nukleocitoplazmatski odnos ($Na/C\alpha$) pankreasnih α -ćelija. Alfa-ćelije kontrolnih pacova su uočene kao tanki prstenovi koji okružuju Langerhansovo ostrvce, što je tipična lokalizacija α -ćelija kontrolnih pacova (Sl. 18-a), a ovako su pozicionirane i α -ćelije pacova tretiranih sa obe doze akrilamida i (Sl. 18-b, 18-c). Kod pacova tretiranih sa nižom dozom akrilamida (25 mg/kg tm) došlo je do porasta vrednosti svih posmatranih stereoloških parametara (Sl. 19-24), dok je kod životinja iz eksperimentalne grupe koja je primala akrilamid u višoj dozi (50 mg/kg tm) došlo do njihovog pada, osim kod vrednosti parametra $Vvc\alpha$ (Sl. 22). Iako je došlo do pada vrednosti posmatranih parametara kod životinja tretiranih sa akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm u poređenju sa njihovim vrednostima kod životinja koje su tretirane nižom dozom, sve vrednosti posmatranih stereoloških parametara kod životinja iz grupe koja je tretirana višom dozom akrilamida su i dalje povišene u odnosu na vrednosti kod kontrolnih životinja.



Sl. 18. Imunopozitivnost α -ćelija juvenilnih mužjaka pacova na glukagon. Tamno-smeđa obojenost citoplazme predstavlja pozitivnu imunoreakciju na glukagon. (a) Kontrola, (b) AA 25 mg/kg tm, (c) AA 50 mg/kg tm. Imunohemijsko bojenje na glukagonski marker. Bar: 50 μ m.

4.1.5.1. Volumenska gustina α -ćelija (V_{α}) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

Vrednost V_{α} se kod pacova tretiranih sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm povećava u odnosu na kontrolu, međutim, bez statističke značajnosti. Kod životinja tretiranih višom dozom akrilamida, vrednost V_{α} je blago opala u poređenju sa životinjama tretiranim sa nižom dozom akrilamida, ali i dalje ostaje povšena i bez statističke signifikantnosti u poređenju sa kontrolom, (Sl.19).

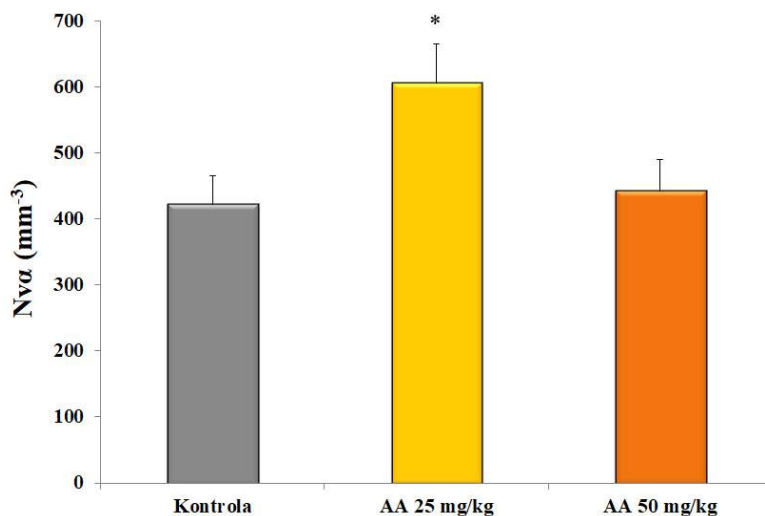


Sl. 19. Volumenska gustina α -ćelija (V_{α}) (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.

4.1.5.2. Numerička gustina α -ćelija (N_{α}) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

Numerička gustina je parameter koji je pokazao najveću promenu kod α -ćelija životinja tretiranih sa akrilamidom (Sl. 20). U tretmanu nižom dozom akrilamida dolazi do statistički značajnog skoka u broju α -ćelija, za 43,52%, u odnosu na broj α -ćelija u kontroli ($p < 0,05$), dok kod životinja tretiranih sa višom dozom akrilamida (50 mg/kg tm) N_{α} opada u poređenju sa

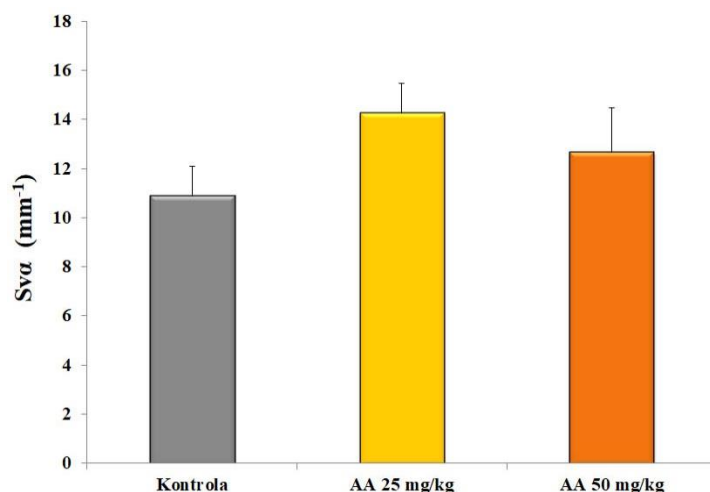
N $\nu\alpha$ životinja tretiranih sa nižom dozom akrilamida (25 mg/kg tm) i približava se kontrolnoj vrednosti od koje ostaje neznatno viša, ali ova razlika nije statistički značajna (Sl. 20).



Sl. 20. Numerička gustina α -ćelija (N $\nu\alpha$) (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10, *p<0,05.

4.1.5.3. Površinska gustina α -ćelija (S $\nu\alpha$) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

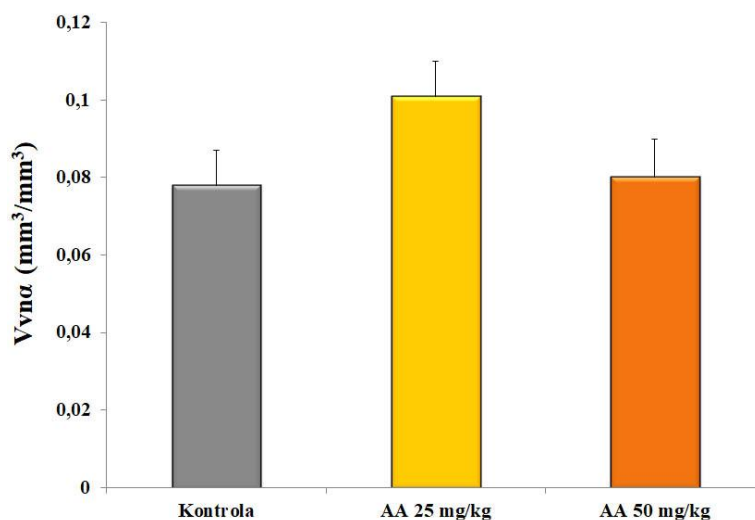
Vrednost S $\nu\alpha$ se kod životinja tretiranih sa nižom dozom akrilamida povećava kada se uporedi sa vrednošću S $\nu\alpha$ kontrolnih životinja, međutim, bez statističke značajnosti (Sl. 21). Kod životinja tretiranih za višom dozom akrilamida, S $\nu\alpha$ zadržava povišenu vrednost u odnosu na vrednost kod kontrolnih životinja, iako se smanjuje u poređenju sa S $\nu\alpha$ kod životinja tretiranih nižom dozom akrilamida. Ni jedna od promena vrednosti S $\nu\alpha$ nije statistički signifikantna (Sl. 21).



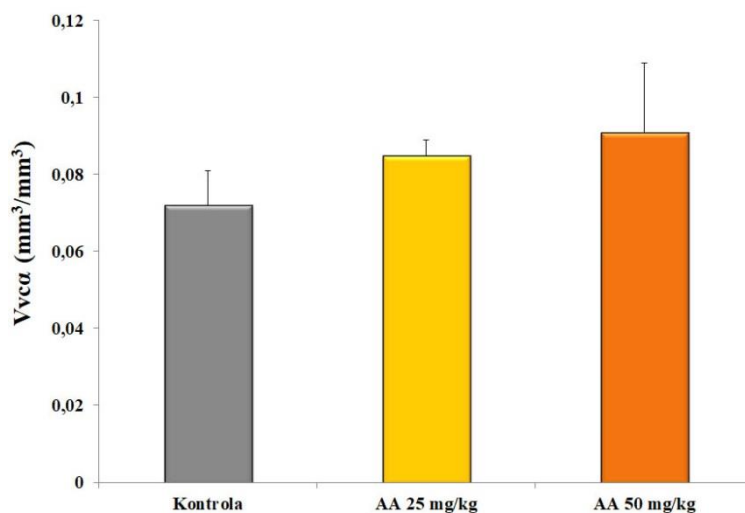
Sl. 21. Površinska gustina α -ćelija (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.

4.1.5.4. Volumenska gustina nukleusa α -ćelija ($V_{v\alpha}$) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

Tretman akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm je doveo do blagog porasta $V_{v\alpha}$ u poređenju sa kontrolnom vrednosti (Sl. 22). Kod životinja koje su tretirane akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm, vrednost $V_{v\alpha}$ opada, ali ostaje neznatno viša u odnosu na kontrolnu. Promene u vrednosti $V_{v\alpha}$ u tretmanima akrilamidom nisu statistički značajne u odnosu na kontrolu.



Sl. 22. Volumenska gustina nukleusa α -ćelija (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.



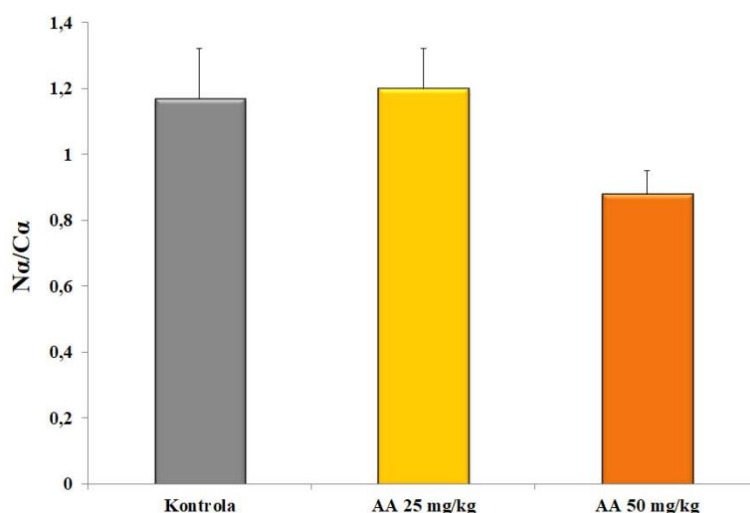
Sl. 23. Volumenska gustina citoplazme α -ćelija (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.

4.1.5.5. Volumenska gustina citoplazme α -ćelija ($V_{vc\alpha}$) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

Volumenska gustina citoplazme α -ćelija je pokazala blagi dozno-zavisni porast vrednosti kod životinja tretiranih sa obe doze akrilamida u poređenju sa kontrolnim životinjama (Sl. 23). Porast u vrednosti $V_{vc\alpha}$ nije značajan ni kod jedne akrilamidom tretirane grupe životinja u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.1.5.6. Nukleocitoplazmatski odnos α -ćelija ($N\alpha/C\alpha$) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

Nukleocitoplazmatski odnos je parameter čija vrednost pokazuje neznatan porast kod α -ćelija životinja tretiranih nižom dozom akrilamida, da bi zatim opala ispod kontrolne vrednosti kod životinja koje su primale višu dozu akrilamida (Sl. 24). Porast vrednosti nukleocitoplazmatskog odnosa kod životinja tretiranih sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm, kao ni pad vrednosti $N\alpha/C\alpha$ kod pacova tretiranih sa akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm nije statistički signifikantan u poređenju sa kontrolnim životinjama.

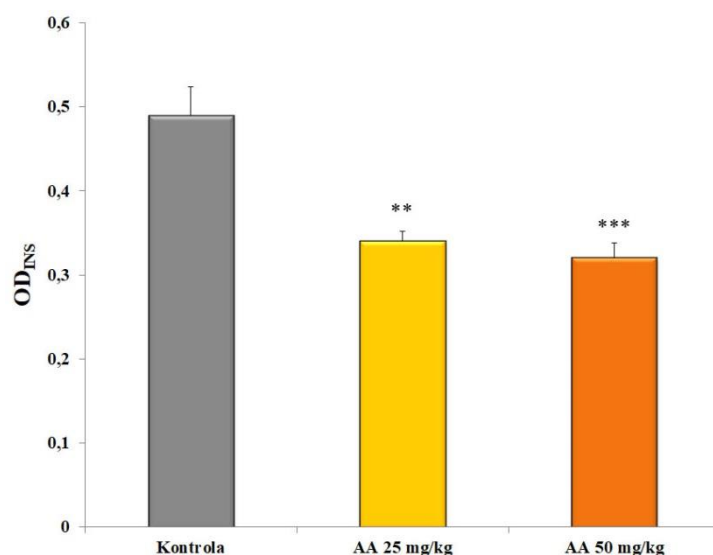


Sl. 24. Nukleocitoplazmatski odnos α -ćelija (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.

4.1.6. Analiza ekspresije odabranih proteina u ćelijama Langerhansovih ostrvaca kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

4.1.6.1. Određivanje optičke gustine insulin imunopozitivnih ćelija kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

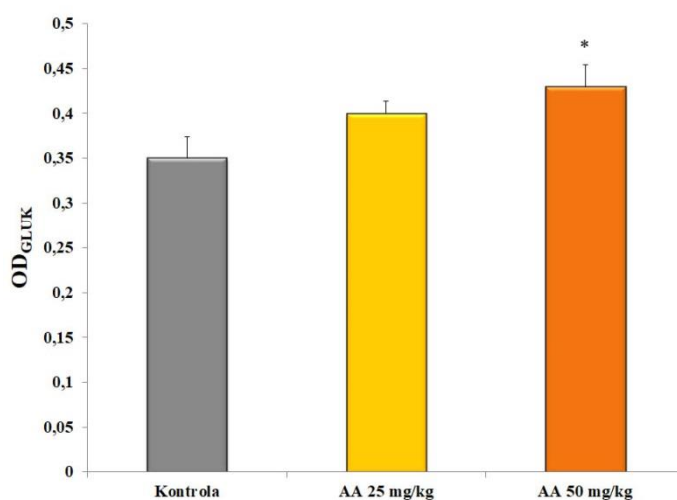
Imunohistohemijsko bojenje preseka pankreasa korišćenjem antitela na insulin je pokazalo imunoreaktivnost u β -ćelijama Langerhanovih ostrvaca. Insulin se pod svetlosnim mikroskopom video kao skup tamno-smeđih granula prisutnih u citoplazmi β -ćelija (Sl. 11). Kvantifikacija količine insulina je izvršena određivanjem optičke gustine insulin imunopozitivnih ćelija (OD_{INS}). OD_{INS} je pokazala značajnu dozno-zavisnu redukciju ekspresije insulina kod pacova tretiranih sa obe doze akrilamida u poređenju sa kontrolom, za 30,61% ($p < 0,01$) i 34,7% ($p < 0,001$), respektivno (Sl. 25).



Sl. 25. Optička gustina β -ćelija (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10, **p<0,01, ***p<0,001

4.1.6.2. Određivanje optičke gustine glukagon imunopozitivnih ćelija (OD_{GLUK}) kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

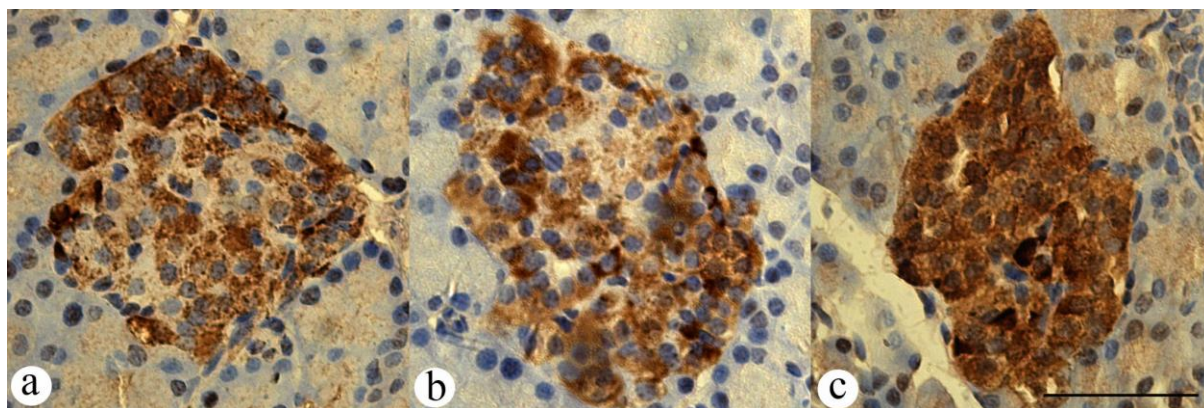
Nakon imunohistohemijskog bojenja ćelija Langerhansovih ostrvaca korišćenjem antitela na glukagon, ovaj hormon se pod mikroskopom video kao skup tamno-braon granula unutar citoplazme u α -ćelijama (Sl. 18). Kvantifikacija optičke gustine glukagon imunopozitivnih ćelija (OD_{GLUK}) je pokazala dozno-zavisni porast kod pacova tretiranih sa akrilamidom kako slabijom, tako i jačom dozom (Sl. 18). Porast vrednosti OD_{GLUK} u α -ćelijama Langerhansovih ostrvaca pankreasa pacova koji su tretirani sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm nije bio statistički značajan. Tretman pacova akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm je u α -ćelijama pacova koji su primali ovaj tretman doveo do značajnog porasta OD_{GLUK} za 22,85% u poređenju sa kontrolnim pacovima (p<0,05) što ukazuje na povećanja količine glukagona u citoplazmi (Sl. 26).



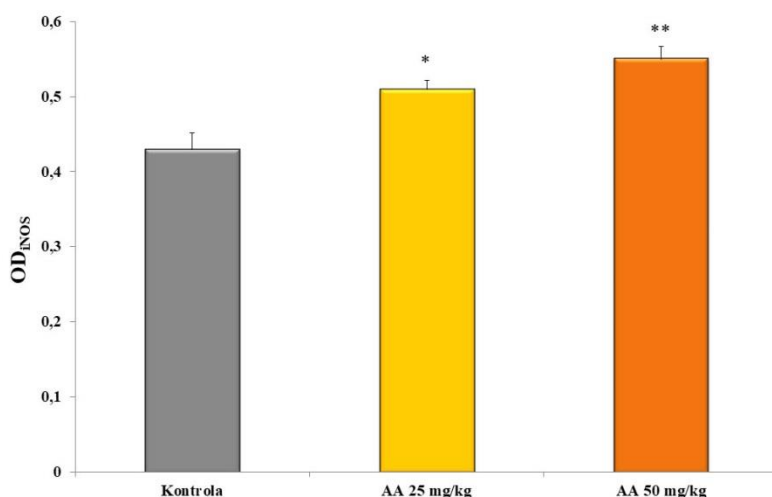
Sl. 26. Optička gustina glukogona u citoplazmi α -ćelija (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm. *p<0,05.

4.1.6.3. Određivanje optičke gustine ćelija imunopozitivnih na inducibilnu azot-oksidi sintetazu (OD_{iNOS}) u Langerhansovim ostrvcima kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

Imunohistohemijsko bojenje preseka pankreasa markerom za iNOS je pokazalo imunoreaktivnost u gotovo svim endokrinim ćelijama Langerhanovih ostrvaca kontrolnih životinja. Inducibilna azot-oksidi sintetaza se uočavala u vidu braon granula raspoređenih po citoplazmi ćelije (Sl. 27). I kod kontrolnih i kod tretiranih životinja su iNOS imunopozitivne ćelije ravnomerno raspoređene po celom ostrvcu. Tretman akrilamidom je značajno dozno-zavisno povećao OD_{iNOS} u Langerhansovim ostrvcima (Sl. 28). Tretman sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm je statistički značajno povećao vrednost OD_{iNOS} za 18,6% u poređenju sa kontrolnim životinjama ($p < 0,05$) što ukazuje na porast u sintezi iNOS (Sl. 28). Jači tretman sa akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm je doveo do još većeg porasta OD_{iNOS} , za 27,9%, u poređenju sa kontrolom, sa stepenom značajnosti od $p < 0,01$.



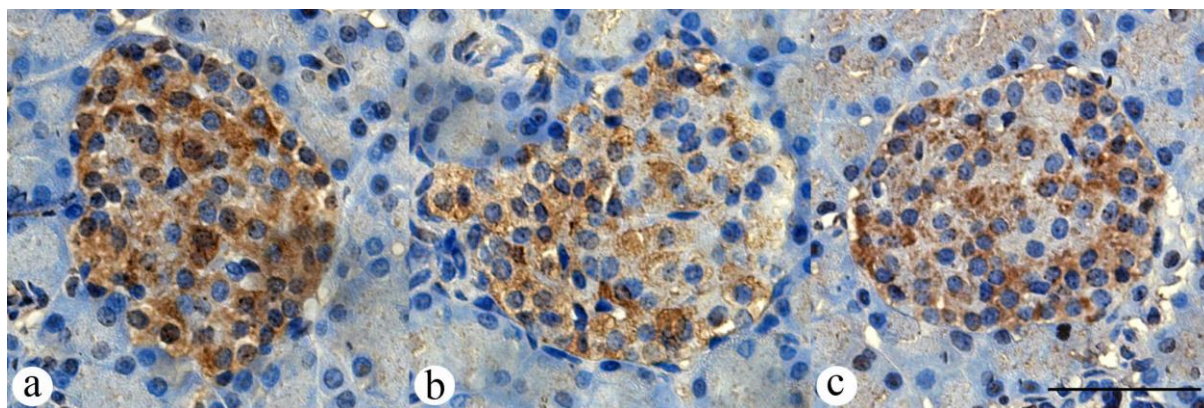
Sl. 27. Imunopozitivnost ćelija Langerhansovih ostrvaca juvenilnih mužjaka pacova na iNOS. Prisustvo tamno-braon obojenosti citoplazme predstavlja pozitivnu imunoreakciju. (a) Kontrola, (b) AA 25 mg/kg tm, (c) AA 50 mg/kg tm. Bar: 50 μ m.



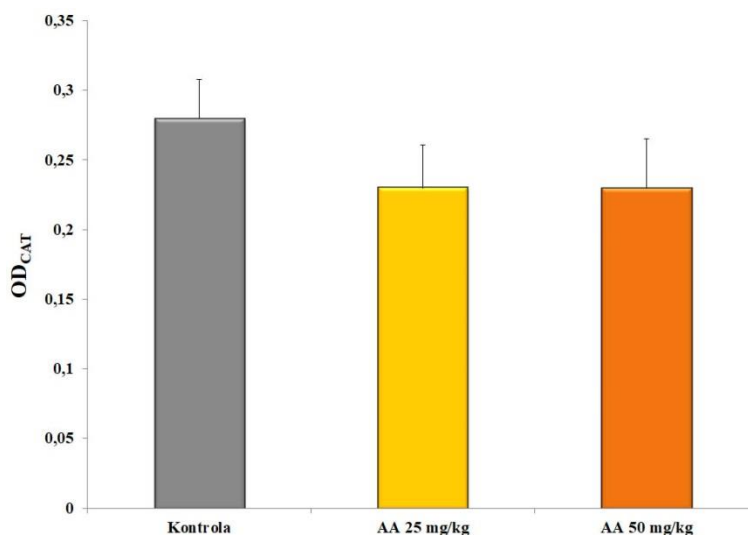
Sl. 28. Optička gustina iNOS u citoplazmi ćelija Langerhansovih ostrvaca (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.1.6.4. Određivanje optičke gustine ćelija imunopozitivnih na katalazu (OD_{CAT}) u Langerhansovim ostrvcima kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

Sve endokrine ćelije Langerhansovih ostrvaca su pokazale umerenu ekspresiju CAT. I kod kontrolnih životinja i kod životinja tretiranih sa obe doze akrilamida imunopozitivne ćelije na katalazu su ravnomerno raspoređene po celom ostrvcu. Tretman sa akrilamidom je doveo do neznatnog pada u vrednostima OD_{CAT} u Langerhansovim ostrvcima koji nije dozno zavistan i identičan je u slučaju oba tretmana u poređenju sa kontrolom. Uočeni pad u vrednosti OD_{CAT} nije statistički značajan (Sl. 29; Sl. 30).



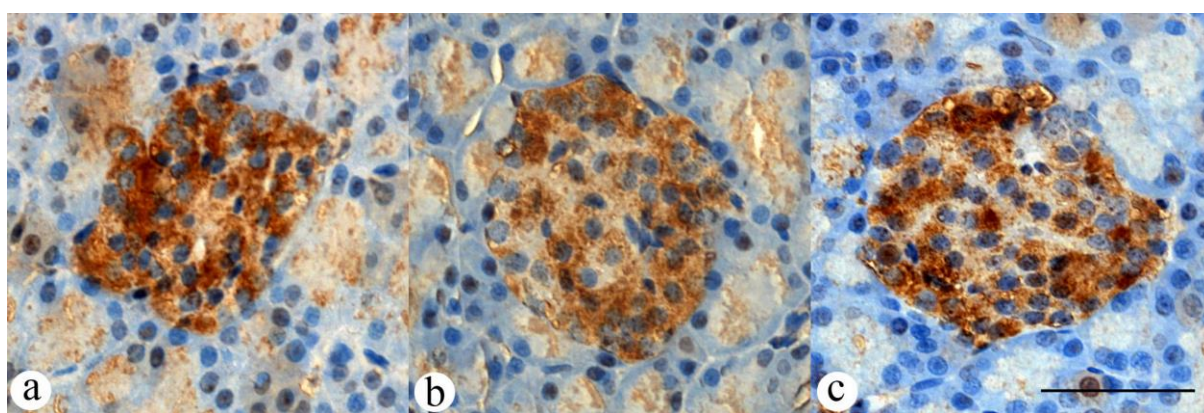
Sl. 29. Imunopozitivnost ćelija Langerhansovih ostrvaca juvenilnih mužjaka pacova na CAT. Tamno-braon obojenost citoplazme predstavlja pozitivnu imunoreakciju. (a) Kontrola, (b) AA 25 mg/kg tm, (c) AA 50 mg/kg tm. Imunohemijsko bojenje na CAT marker. Bar: 50 μ m.



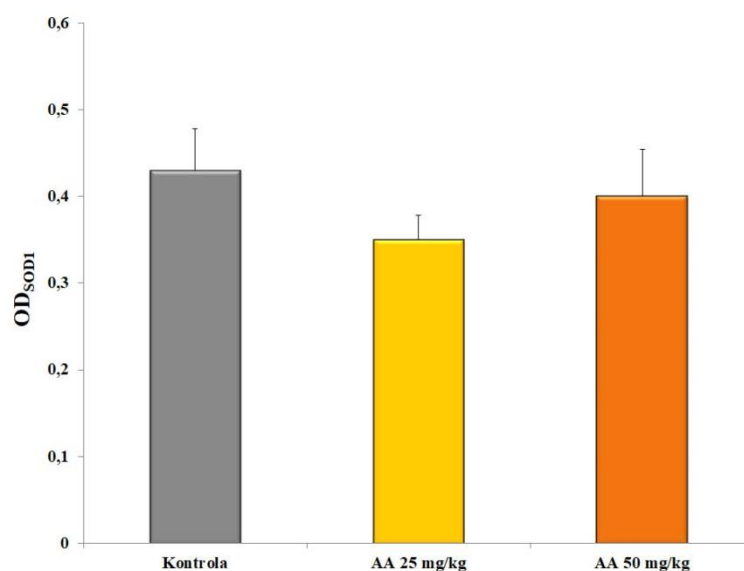
Sl. 30. Optička gustina CAT u citoplazmi ćelija Langerhansovih ostrvaca (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.

4.1.6.5. Određivanje optičke gustine ćelija imunopozitivnih na superoksid dismutazu 1 (OD_{SOD1}) i superoksid dismutazu 2 (OD_{SOD2}) u Langerhansovim ostrvcima kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

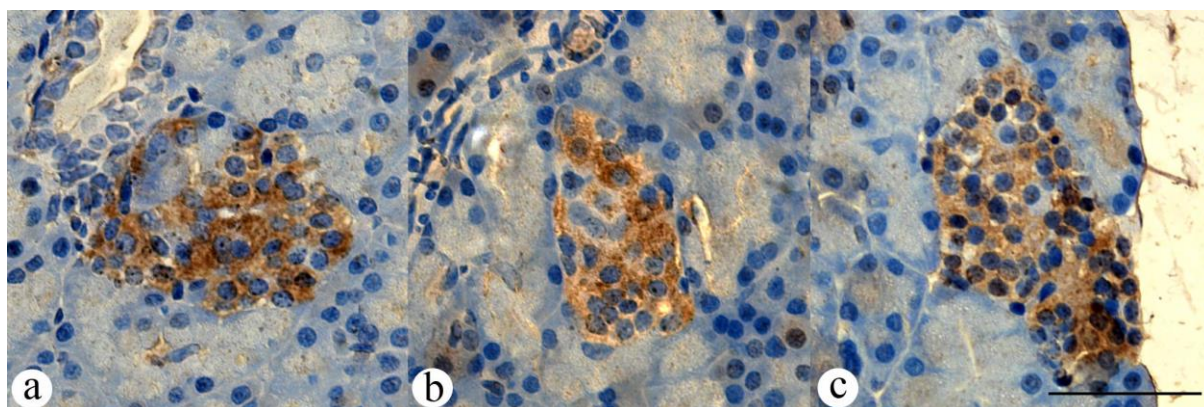
Gotovo sve endokrine ćelije Langerhansovih ostrvaca kontrolnih životinja su pokazale umerenu citoplazmatsku imunoreaktivnost na SOD1 i SOD2 (Sl. 31, Sl. 33). Tretman sa akrilamidom nije doveo do promene u vrednostima OD_{SOD1} i OD_{SOD2} (Sl. 32, 33). I kod SOD1 i SOD2 se uočava isti trend u ekspresiji proteina prilikom akrilamidnog tretmana. U oba slučaja slabiji tretman od 25 mg/kg tm izaziva pad u OD, da bi ta vrednost porasla i gotovo se izjednačila sa kontrolnom kod životinja koje su primale jači akrilamidni tretman u dozi od 50 mg/kg tm (Sl. 32, Sl. 34). Ni jedna promena u vrednosti OD za enzime SOD1 i SOD2 u endokrinim ćelijama pankreasa nije statistički značajna kada se uporedi sa kontrolom (Sl. 32, 33).



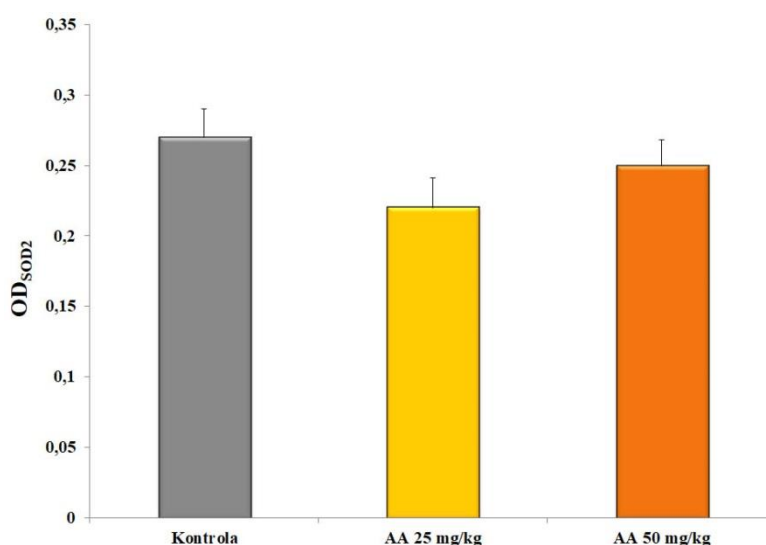
Sl. 31. Imunopozitivnost ćelija Langerhansovih ostrvaca juvenilnih mužjaka pacova na SOD1. Prisustvo tamno-braon obojenosti citoplazme predstavlja pozitivnu imunoreakciju. (a) Kontrola, (b) AA 25 mg/kg, (c) AA 50 mg/kg. Imunohemijsko bojenje na SOD1 marker. Bar: 50 μ m.



Sl. 32. Optička gustina SOD1 u citoplazmi ćelija Langerhansovih ostrvaca (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.



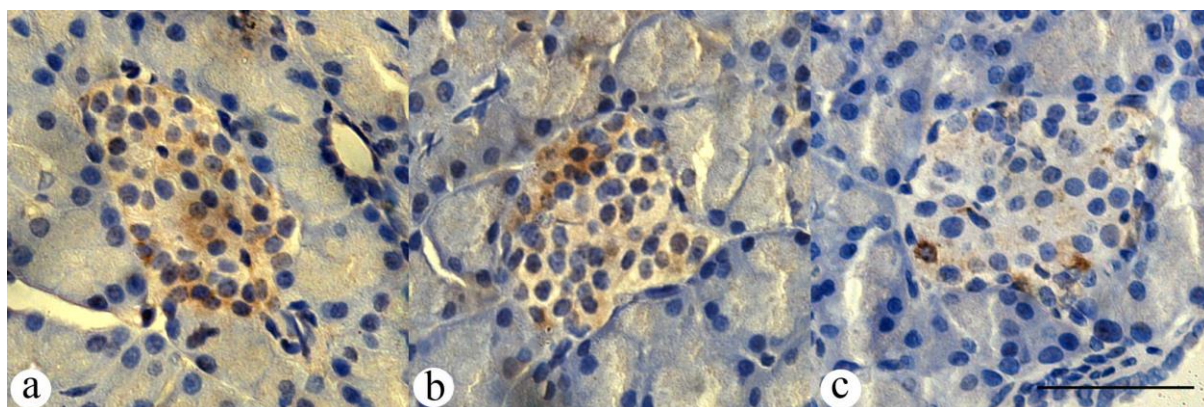
Sl. 33. Imunopozitivnost ćelija Langerhansovih ostrvaca juvenilnih mužjaka pacova na SOD2. Tamno-braon obojenost citoplazme predstavlja pozitivnu imunoreakciju. (a) Kontrola, (b) AA 25 mg/kg, (c) AA 50 mg/kg. Imunochemijsko bojenje na SOD2 marker. Bar: 50 μ m.



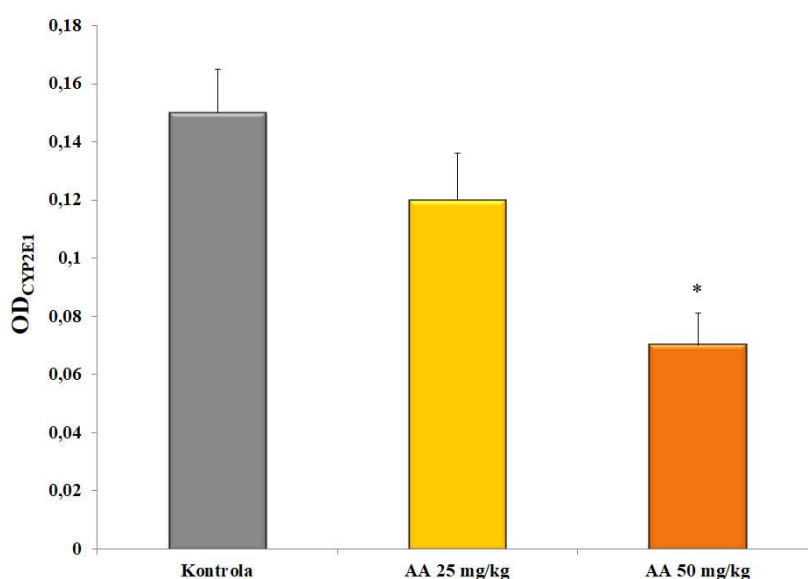
Sl. 34. Optička gustina SOD2 u citoplazmi ćelija Langerhansovih ostrvaca (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.

4.1.6.6. Određivanje optičke gustine ćelija imunopozitivnih na CYP2E1 (OD_{CYP2E1}) u Langerhansovim ostrvcima kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

Analiza pankreasnih preseka je pokazala slabu imunoreaktivnost na CYP2E1 u endokrinim ćelijama Langerhansovih ostrvaca, kako kontrolnih, tako i tretiranih životinja (Sl. 35). I kod kontrolnih i kod tretiranih životinja su CYP2E1 imunoreaktivne ćelije ravnomerno raspoređene po ostrvcu. Kod životinja tretiranih sa akrilamidom je došlo do dozno-zavisnog pada u vrednosti (Sl. 36). Ćelije Langerhansovih ostrvaca životinja tretiranih sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm ne pokazuju značajnu redukciju u OD_{CYP2E1} vrednosti, dok je kod životinja tretiranih sa akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm uočen statistički značajan pad vrednosti OD_{CYP2E1} za 51,43% u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) (Sl. 36).



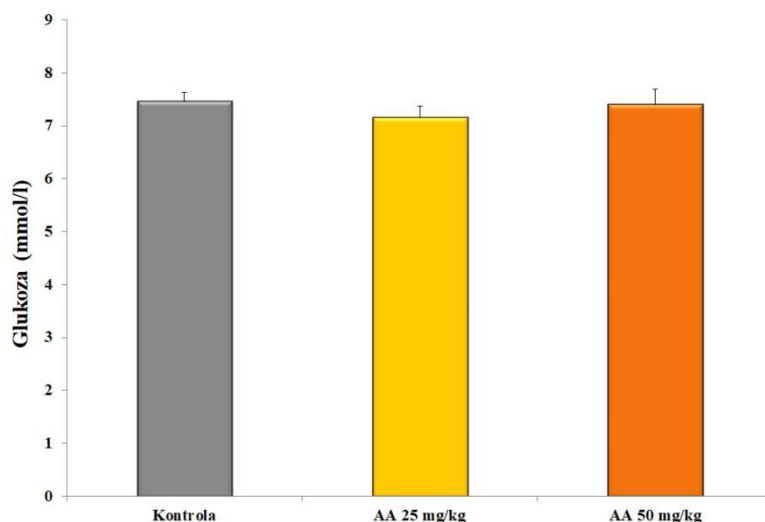
Sl. 35. Imunopozitivnost ćelija Langerhansovih ostrvaca juvenilnih mužjaka pacova na CYP2E1. Tamno-braon obojenost citoplazme predstavlja pozitivnu imunoreakciju. (a) Kontrola, (b) AA 25 mg/kg, (c) AA 50 mg/kg. Imunochemijsko bojenje na CYP2E1 marker. Bar: 50 μ m.



Sl. 36. Optička gustina CYP2E1 u citoplazmi ćelija Langerhansovih ostrvaca (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10, *p<0,05.

4.1.7. Analiza nivoa glukoze u serumu kontrolnih pacova i pacova tretiranih sa akrilamidom

Analiza nivoa glukoze u serumu pacova tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm nije pokazala statistički značajnu razliku u poređenju sa nivoom glukoze u serumu pacova iz kontrolne grupe (Sl. 37).



Sl. 37. Koncentracija glukoze u serumu (srednja vrednost \pm standardna greška) kontrolnih životinja i životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, n=10.

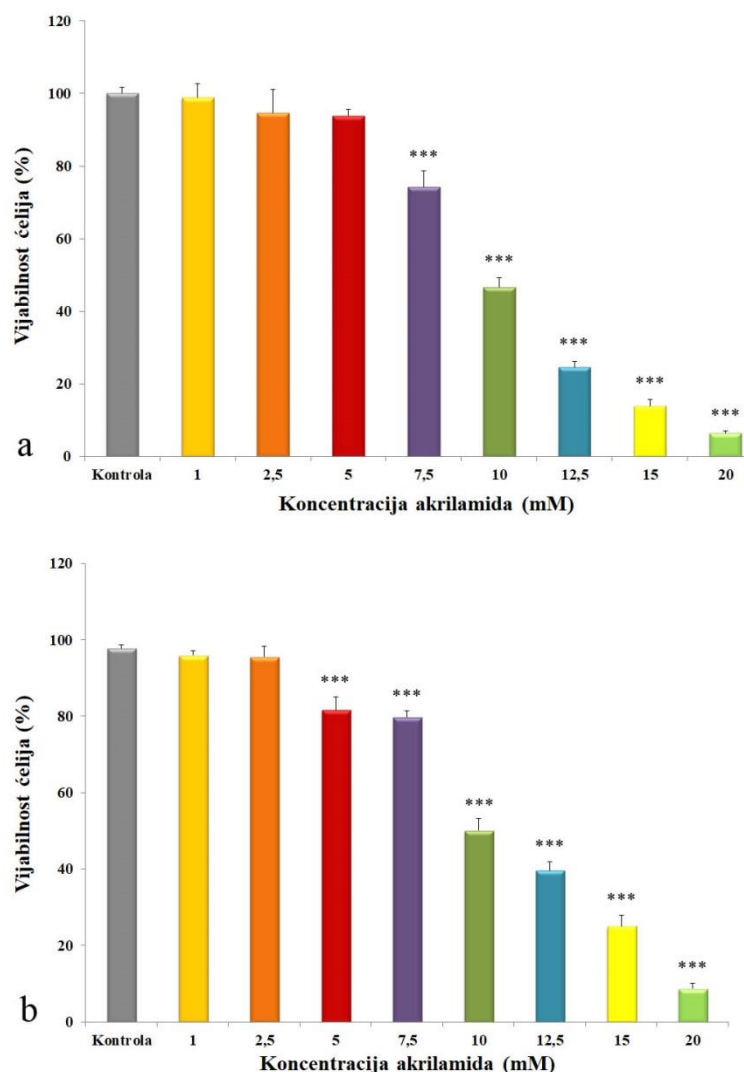
4.2. UTICAJ TRETMANA AKRILAMIDOM NA RIN-5F ĆELIJSKU LINIJU

4.2.1. Uticaj tretmana akrilamidom na vijabilnost Rin-5F ćelija

Vijabilnost ćelijske linije Rin-5F nakon tretmana akrilamidom je ispitana sa dva testa vijabilnosti: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid (MTT) esejom i metodom bojenja tripan plavo.

MTT test je pokazao da izloženost rastućim koncentracijama akrilamida tokom 24 h smanjuje vijabilnost Rin-5F ćelija u koncentracijski-zavisnom maniru (Sl. 38-a). MTT esej je pokazao značajnu redukciju vijabilnosti ćelija tretiranih sa 7,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM i 20 mM akrilamida, za 25,74%, 53,4%, 75,5%, 86,2% i 93,5%, respektivno, koja je imala veoma visoku statističku značajnost u poređenju sa kontrolnim ćelijama ($p < 0,001$) (Sl. 38-a).

Tripan plavo esej (Sl. 38-b) je pokazao da redukcija vijabilnosti ćelija tretiranih akrilamidom započinje već pri koncentraciji akrilamida od 5 mM, i nastavlja se u koncentracijski-zavisnom maniru pri koncentracijama od 7,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM i 20 mM akrilamida, za 16,43%, 18,47%, 48,75%, 59,47%, 74,33% i 91,09%, respektivno. Smanjena vijabilnost Rin-5F ćelija kod svih pomenutih tretmana sa akrilamidom ima veoma visoku statističku značajnost u poređenju sa kontrolom ($p < 0,001$). Rezultati MTT i tripan plavo testova vijabilnosti pokazuju da je koncentracija akrilamida od 10 mM dovela do smrti 53,4% i 48,75% akrilamidom tretiranih Rin-5F ćelija, redom, zbog čega je ova koncentracija korišćena kao IC_{50} vrednost u svim daljim eksperimentima.



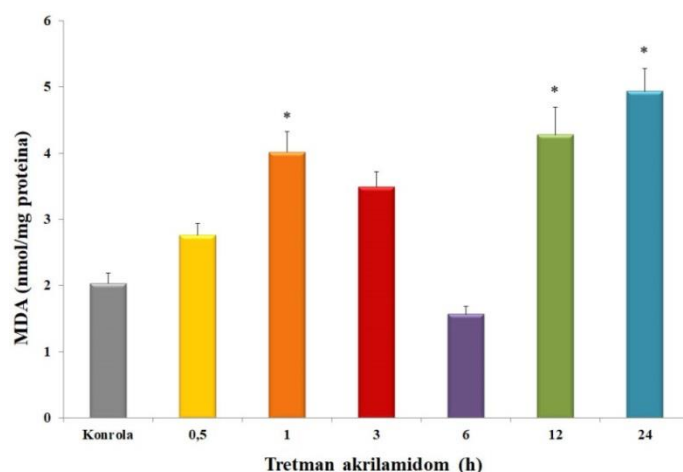
Sl. 38. (a) MTT test vijabilnosti Rin-5F ćelija nakon tretmana akrilamidom tokom rastućih koncentracija. Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. *** $p < 0,001$. (b) Tripin plavo test vijabilnosti Rin-5F ćelija nakon tretmana akrilamidom tokom rastućih koncentracija. Prikazana je srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta. *** $p < 0,001$.

4.2.2. Uticaj tretmana akrilamidom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u Rin-5F ćelijama

U cilju ispitivanja potencijalnog efekta akrilamida na parametre oksidativnog stresa i ćelijski sistem antioksidativne zaštite, analizirani su biomarkeri oksidativnog stresa, kao i aktivnost odabranih enzima antioksidativne zaštite nakon tretmana Rin-5F ćelijske linije sa 10 mM akrilamidom (IC_{50}) tokom različitih vremenskih perioda (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h). Posmatrani su sledeći biomarkeri oksidativnog stresa: nivo lipidne peroksidacije, koncentracija redukovano glutationa (GSH), nivo slobodnih sulfhidrilnih grupa proteina (-SH) i nivo nitrita. Enzimi antioksidativne zaštite čija aktivnost je praćena u Rin-5F ćelijama nakon tretmana sa akrilamidom su SOD i CAT.

4.2.2.1. Uticaj tretmana akrilamidom na lipidnu peroksidaciju u Rin-5F ćelijama

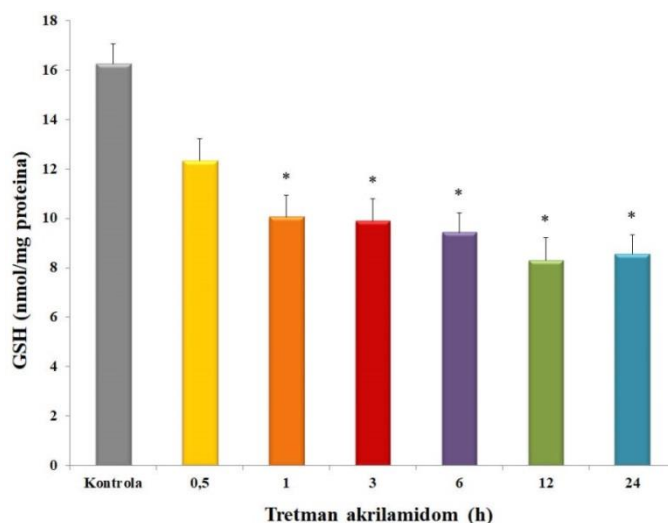
Nivo lipidne peroksidacije u Rin-5F ćelijama nakon tretmana akrilamidom je određen pomoću TBARS eseja kojim je ispitano prisustvo malondialdehida (MDA), produkta lipidne peroksidacije. Statistički značajan porast u nivou MDA je uočen nakon tretmana akrilamidom u trajanju od 1 h, 12 h i 24 h od 2, 2,1 i 2,42 puta, respektivno, u poređenju sa kontrolnim ćelijama, ($p < 0,05$) (Sl. 39).



Sl. 39. Nivo lipidne peroksidacije u Rin-5F ćelijama (srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h). * $p < 0,05$.

4.2.2.1. Uticaj tretmana akrilamidom na nivo redukovanog glutationa (GSH) u Rin-5F ćelijama

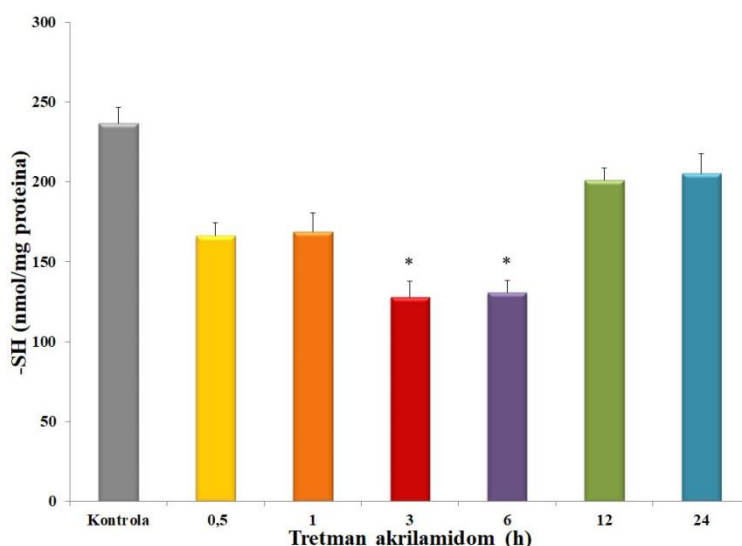
Nakon tretmana ćelijske linije Rin-5F sa 10 mM akrilamidom u različitim vremenskim intervalima izmeren je nivo redukovanog GSH. Kao što je prikazano na slici 40, tretmani 10 mM akrilamidom tokom 1, 3, 6, 12 i 24 h su pokazali statistički signifikantan pad za 38,5%, 39,2%, 41,97%, 48,92% i 47,38%, respektivno, u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) (Sl. 40).



Sl. 40. Uticaj tretmana akrilamidom na nivo redukovanog GSH u Rin-5F ćelijama (srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h). * $p < 0,05$.

4.2.2.2. Uticaj tretmana akrilamidom na nivo slobodnih sulfhidrilnih grupa proteina (-SH) u Rin-5F ćelijama

Statistički značajan pad u nivou slobodnih -SH grupa proteina u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) je uočen kod ćelija koje su tretirane sa akrilamidom tokom 3 h (45,94%) i 6 h (44,83%) (Sl. 41). Pad u nivou slobodnih -SH grupa u ostalim tačkama tretmana (0,5, 1, 12 i 24 h) sa IC_{50} koncentracijom akrilamida nije bio statistički značajan u odnosu na kontrolne ćelije (Sl. 41).



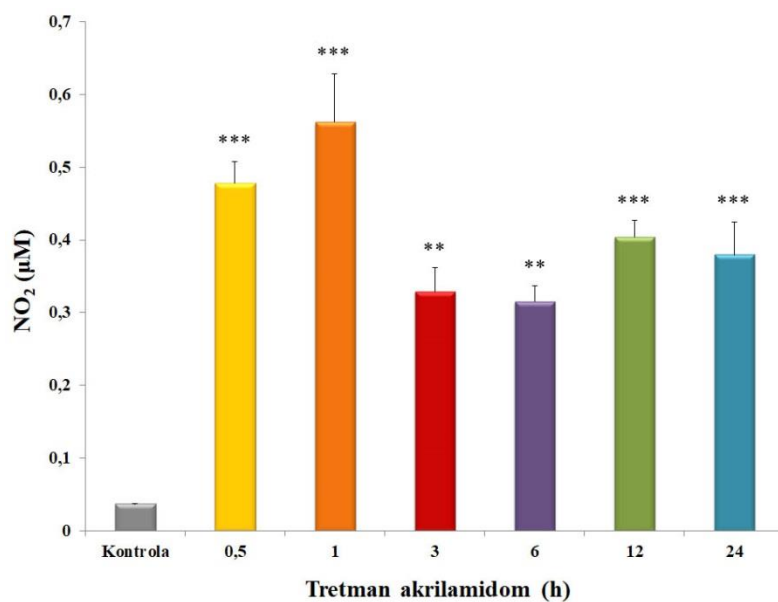
Sl. 41. Uticaj tretmana akrilamidom na nivo slobodnih -SH grupa proteina u Rin-5F ćelijama (srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h). * $p < 0,05$.

4.2.2.3. Uticaj tretmana akrilamidom na nivo prisutnih nitrita (NO_2^-) u Rin-5F ćelijama

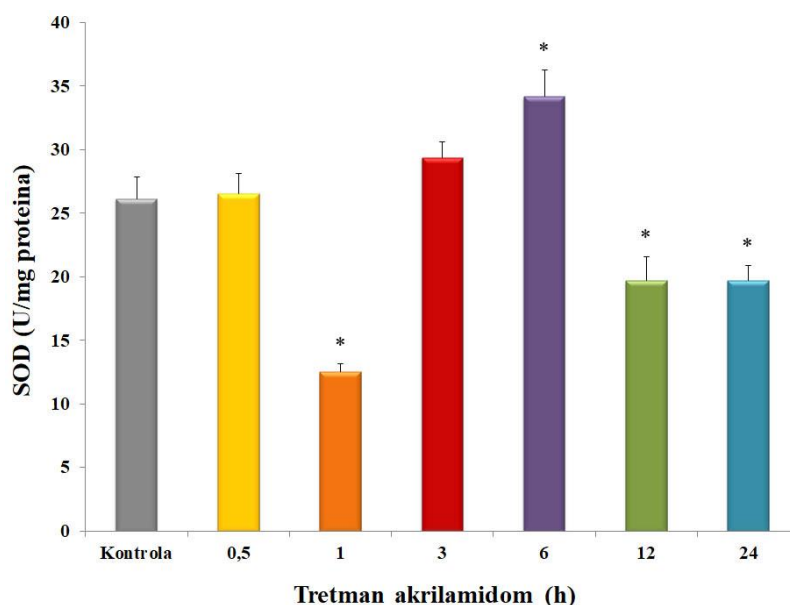
Nakon tretmana akrilamidom količina produkcije NO^{\cdot} se određuje indirektno, merenjem koncentracije nitrita (NO_2^-) u medijumu u kojem su gajene Rin-5F ćelije. U kontrolnim ćelijama je uočen nezatni nivo NO_2^- , dok je tretman sa akrilamidom u koncentraciji IC_{50} doveo do značajnog povećanja nivoa NO_2^- u svim tretmanima tokom različitih vremenskih perioda, u poređenju sa kontrolnim vrednostima. Tretman od 3 i 6 h je povećao koncentraciju NO_2^- 10,67 i 10,33 puta ($p < 0,01$), a tretman od 0,5, 1, 12 i 24 h je povećao koncentraciju NO_2^- 15,67, 18,67, 13,33 i 12,33 puta, respektivno ($p < 0,001$) (Sl. 42).

4.2.2.4. Uticaj tretmana akrilamidom na aktivnost enzima superoksid dismutaza (SOD) u Rin-5F ćelijama

Kao što se vidi na slici 43, različita dužina izlaganja Rin-5F ćelija akrilamidu ima za rezultat promenu u aktivnosti SOD. Ukupna SOD aktivnost se statistički značajno smanjila nakon izloženosti akrilamidu u trajanju od 1, 12 i 24 h za 52,1%, 24,71% i 24,44%, respektivno, u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$) (Sl. 43). Nasuprot ovome, tretman u trajanju od 6 h značajano je pojačao aktivnost SOD, za 30,75%, u odnosu na kontrolne ćelije ($p < 0,05$) (Sl. 43).



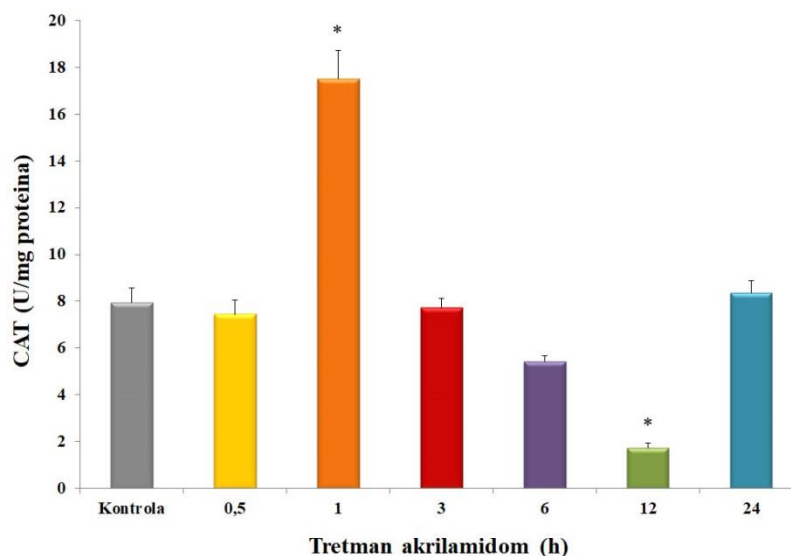
Sl. 42. Uticaj tretmana akrilamidom na nivo NO₂⁻ u Rin-5F ćelijama (srednja vrednost ± standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h). **p<0,01, ***p<0,001.



Sl. 43. Uticaj tretmana akrilamidom na aktivnost enzima SOD u Rin-5F ćelijama (srednja vrednost ± standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h). *p<0,05.

4.2.2.5. Uticaj tretmana akrilamidom na aktivnost enzima katalaza (CAT) u Rin-5F ćelijama

Aktivnost enzima CAT u Rin-5F ćelijskoj liniji tretiranoj sa 10 mM akrilamidom je prikazana na slici 44. Najveća aktivnost CAT je izmerena kod akrilamidnog tretmana u trajanju od 1 h, kada dolazi do statistički značajnog porasta, 2,2 puta (p<0,05), u odnosu na kontrolu. Tretman od 12 h doveo do signifikantnog pada u aktivnosti CAT, 4,6 puta, u odnosu sa aktivnost ovog enzima u kontrolnim ćelijama (p<0,05) (Sl. 44).



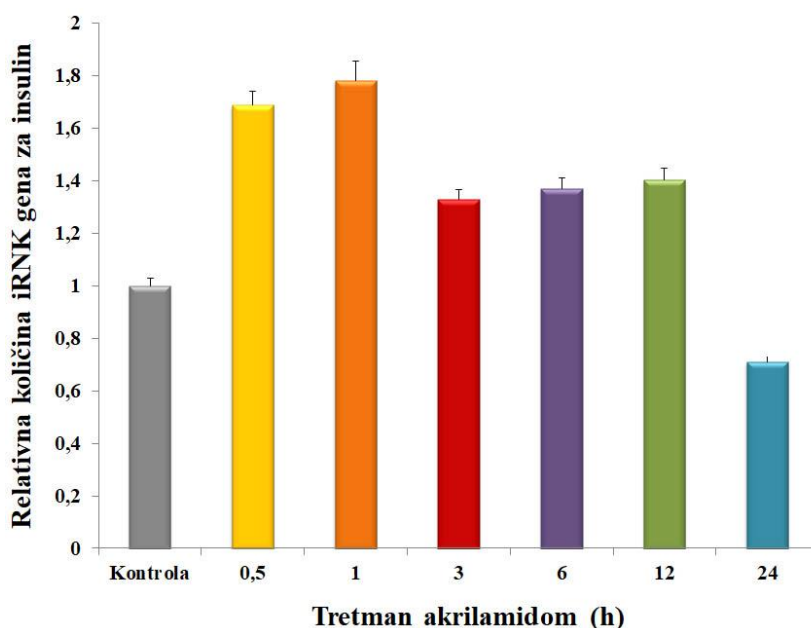
Sl. 44. Uticaj tretmana akrilamidom na aktivnost enzima CAT u Rin-5F ćelijama (srednja vrednost ± standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h). * $p < 0,05$.

4.2.3. Uticaj tretmana akrilamidom na ekspresiju odabranih gena u Rin-5F ćelijama

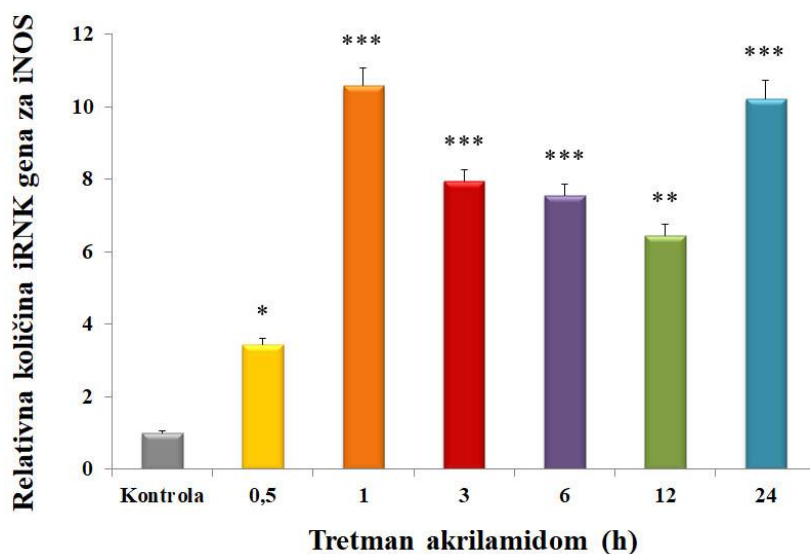
Relativna transkripcija gena za insulin, iNOS, SOD1, SOD2, CAT i CYP2E1 je određivana nakon izlaganja Rin-5F ćelija akrilamidu u različitim vremenskim intervalima. Izolovana je totalna RNK iz Rin-5F ćelija, nakon čega je reakcijom reverzne transkripcije sintetisana komplementarna DNK (eng. *Complementary DNA* - **cDNK**) koja je služila kao matrica u reakciji lančanog umnožavanja u realnom vremenu (qPCR). Komplementarna DNK je sintetisana na osnovu iRNK matrice ispitivanog gena pomoću prajmera. Tehnikom qPCR je kvantifikovana iRNK za pomenute gene u Rin-5F ćelijama korišćenjem prajmera koji su prikazani u tabeli 3 (Mateijal i metode). Nivo ekspresije gena od interesa standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin koji je detektovan u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} , gde je dCt razlika između Ct vrednosti gena od interesa i gena za β -aktin.

4.2.3.1. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu transkripciju gena za insulin u Rin-5F ćelijama

Relativna transkripcija gena za insulin je posmatrana tokom tretmana Rin-5F ćelija sa 10 mM akrilamida u trajanju od 0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h. Svi primenjeni tretmani, osim tretmana od 24 h, su doveli do porasta u sintezi iRNK gena za insulin, međutim, ni jedna od izazvanih promena nije pokazala statističku značajnost u poređenju sa kontrolnim, netretiranim, ćelijama (Sl. 45).



Sl. 45. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu ekspresiju gena za insulin (srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h) na Rin-5F ćelije. Relativna količina iRNK gena za insulin analizirana je metodom PCR u realnom vremenu. Nivo ekspresije gena za insulin standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} .



Sl. 46. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu ekspresiju gena za iNOS (srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h) na Rin-5F ćelije. Relativna količina iRNK gena za iNOS analizirana je metodom PCR u realnom vremenu. Nivo ekspresije gena za iNOS standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

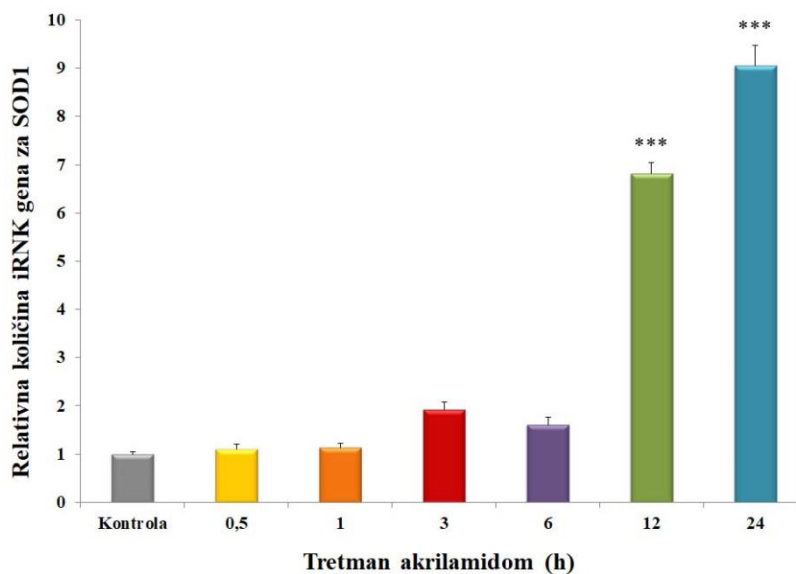
4.2.3.2. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu transkripciju gena za iNOS u Rin-5F ćelijama

Analiza relativne ekspresije gena za iNOS je pokazala da svi tretmani Rin-5F ćelija sa 10 mM akrilamidom značajno povećavaju nivo iRNK gena za iNOS (Sl. 46). Tretman od 0,5 h je

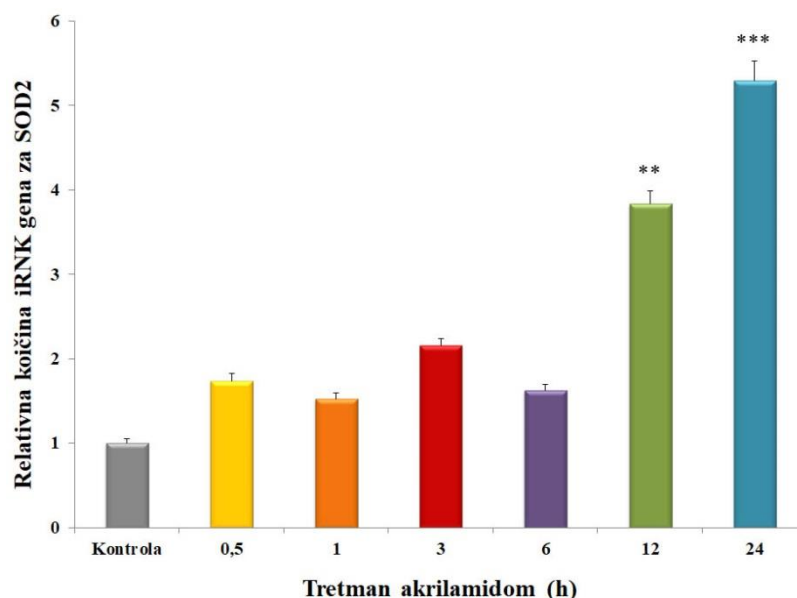
povećao nivo iRNK za iNOS 3,44 puta ($p < 0,05$), tretman od 12 h je povećao nivo transkripcije gena za iNOS 6,45 puta ($p < 0,01$), dok su tretmani od 1, 3, 6 i 24 h povećavali nivo iRNK za iNOS 10,58, 7,96, 7,55 i 10,23 puta ($p < 0,001$), respektivno, u poređenju sa kontrolom.

4.2.3.3. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu transkripciju gena za SOD1 i SOD2 u Rin-5F ćelijama

Tretman akrilamidom u koncentraciji IC_{50} je kod Rin-5F ćelija izazvao promene u relativne ekspresije gena za enzime SOD1 i SOD2 (Sl. 47; Sl. 48). Tretman akrilamidom u trajanju od 12 h i 24 h dovodi do skoka u transkripciji gena za SOD1 6,82 i 9,06 puta, respektivno, sa statističkom značajnošću u poređenju sa kontrolom ($p < 0,001$) (Sl. 47). Porast u sintezi iRNK gena za SOD2 u poređenju sa kontrolnim vrednostima ima statističku značajnost i kod tretmana od 12 h kada je 3,83 puta intenzivnija u poređenju sa kontrolom ($p < 0,01$) i kod tretmana od 24 h kada je 5,29 puta intenzivnija nego u kontrolnim ćelijama ($p < 0,001$) (Sl. 48).



Sl. 47. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu ekspresiju gena za SOD1 (srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h) na Rin-5F ćelije. Relativna količina iRNK gena za SOD1 analizirana je metodom PCR u realnom vremenu. Nivo ekspresije gena za SOD1 standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} . *** $p < 0,001$.



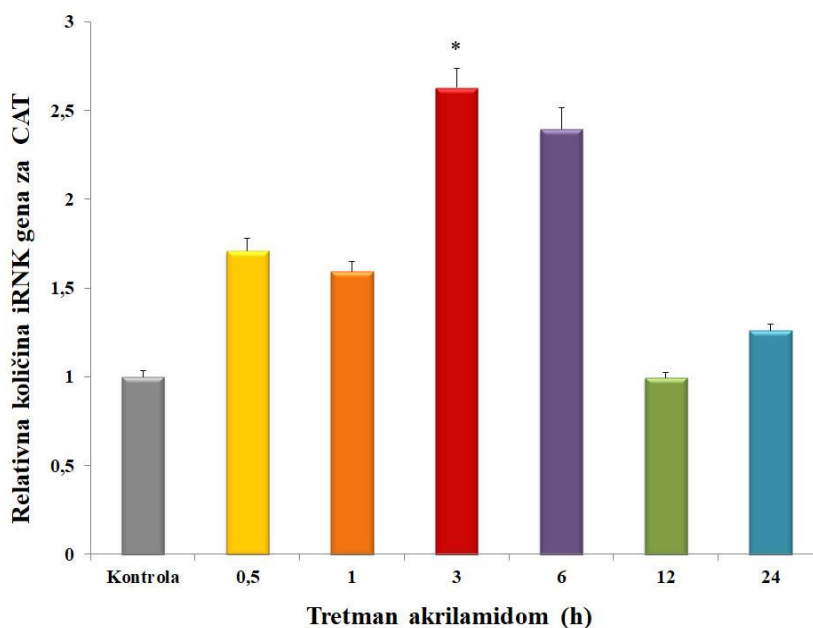
Sl. 48. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu ekspresiju gena za SOD2 (srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h) na Rin-5F ćelije. Relativna količina iRNK gena za SOD2 analizirana je metodom PCR u realnom vremenu. Nivo ekspresije gena za SOD2 standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} . Srednje vrednosti dobijene za akrilamidom tretirane ćelije su bile statistički značajno različite ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.3.4. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu transkripciju gena za CAT u Rin-5F ćelijama

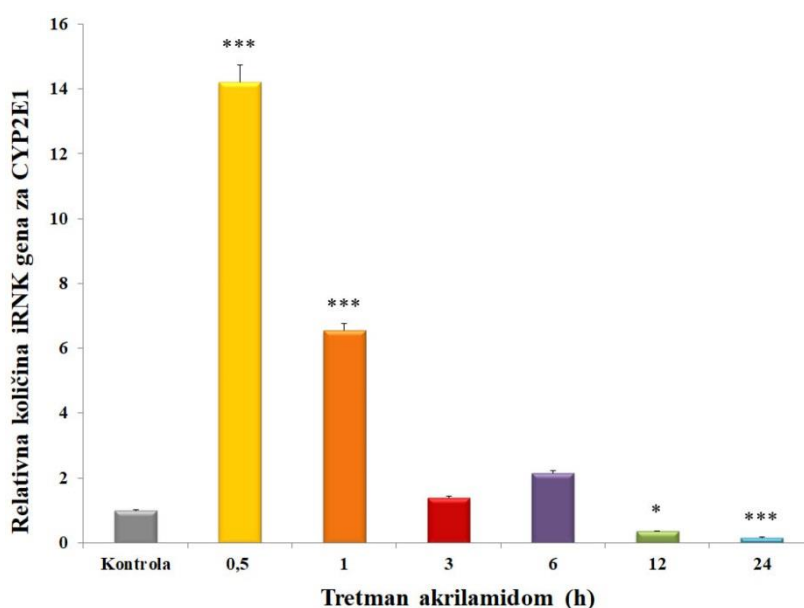
Analiza relativne ekspresije gena za CAT je pokazala statistički značajan porast samo u tretmanu akrilamidom koji traje 3 h kada je sinteza iRNK za CAT 2,62 puta intenzivnija u poređenju sa sintezom u kontrolnim ćelijama ($p < 0,05$) (Sl. 49).

4.2.3.5. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu transkripciju gena za CYP2E1 u Rin-5F ćelijama

Analiza relativne ekspresije gena za CYP2E1 u Rin-5F ćelijama tretiranim sa 10 mM akrilamida tokom različitih vremenskih perioda je pokazala statistički značajan porast sinteze iRNK nakon tretmana u trajanju od 0,5 i 1 h, 14,21 i 6,54 puta, u poređenju sa kontrolom ($p < 0,001$), respektivno, dok je smanjenje transkripcije uočeno nakon tretmana od 12 h (2,85 puta) ($p < 0,05$) i 24 h (6,25 puta) ($p < 0,001$) (Sl. 50).



Sl. 49. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu ekspresiju gena za CAT (srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h) na Rin-5F ćelije. Relativna količina iRNK gena za CAT analizirana je metodom PCR u realnom vremenu. Nivo ekspresije gena za CAT standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} . * $p < 0,05$.



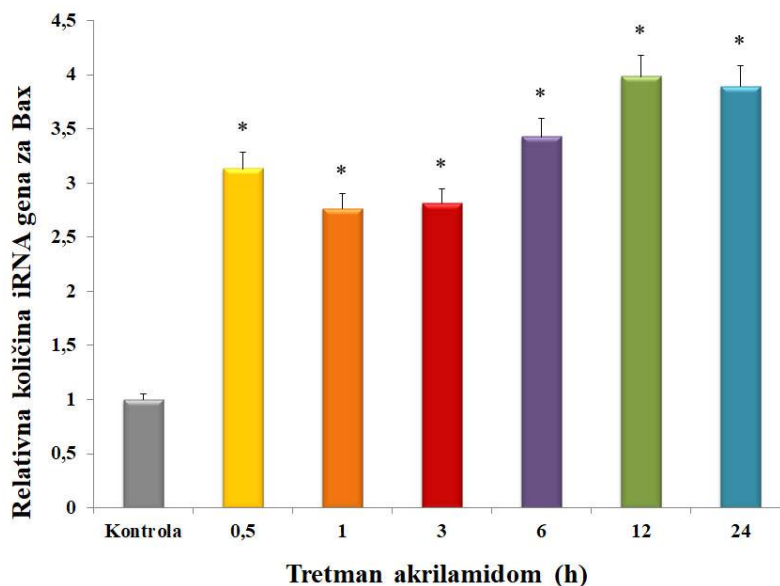
Sl. 50. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu ekspresiju gena za CYP2E1 (srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h) na Rin-5F ćelije. Relativna količina iRNK gena za CYP2E1 analizirana je metodom PCR u realnom vremenu. Nivo ekspresije gena za CYP2E1 standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} . * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

4.2.3.6. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu transkripciju gena za Bax i Bcl-2 u Rin-5F ćelijama

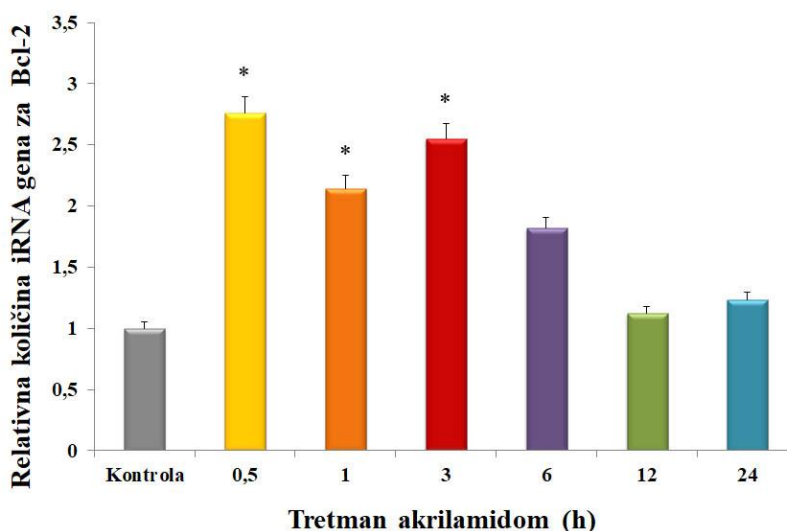
Analiza relativne ekspresije gena za Bax u Rin-5F ćelijama tretiranim sa 10 mM akrilamida tokom različitih vremenskih perioda je pokazala statistički značajan porast sinteze iRNK gena za

Bax tokom svih tretmana ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim ćelijama (Sl. 51). Tretmani tokom 0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h su povećali relativnu transkripciju iRNK za Bax 3,13, 2,76, 2,8, 3,42, 3,98 i 3,89 puta, respektivno.

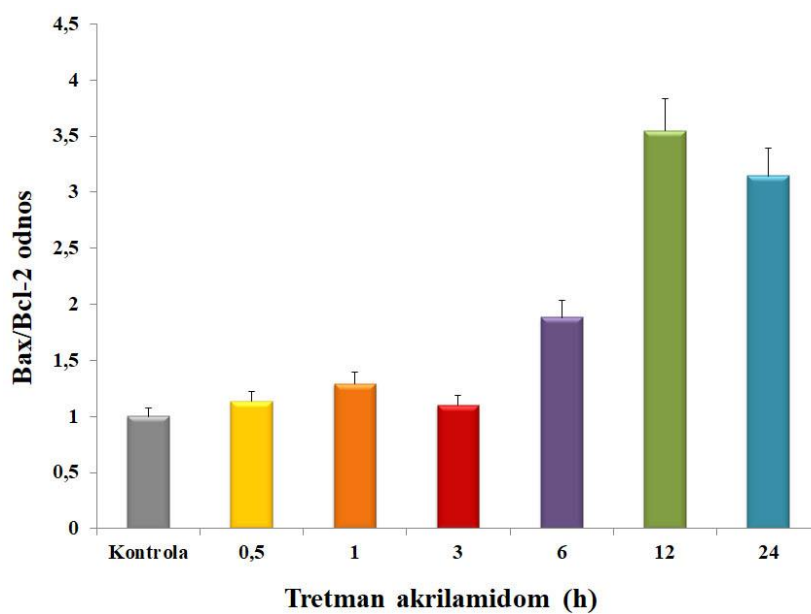
Relativna ekspresija gena za Bcl-2 u tretiranim Rin-5F ćelijama je takođe pokazala rast sa statističkom značajnošću samo tokom tretmana u trajanju od 0,5, 1 i 3 h, 2,75, 2,14 i 2,54 puta, respektivno, u poređenju sa kontrolnim ćelijama (Sl. 51).



Sl. 51. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu ekspresiju gena za Bax (srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h) na Rin-5F ćelije. Relativna količina iRNK gena za Bax analizirana je metodom PCR u realnom vremenu. Nivo ekspresije gena za Bax standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} . * $p < 0,05$.



Sl. 52. Uticaj tretmana akrilamidom na relativnu ekspresiju gena za Bcl-2 (srednja vrednost \pm standardna greška rezultata dobijenih iz tri nezavisna eksperimenta) nakon primene tretmana akrilamidom različite dužine (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h) na Rin-5F ćelije. Relativna količina iRNK gena za Bcl-2 analizirana je metodom PCR u realnom vremenu. Nivo ekspresije gena za Bcl-2 standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} . * $p < 0,05$.



Sl. 53. Uticaj tretmana akrilamidom na Bax/Bcl-2 odnos u Rin-5F ćelijama (srednja vrednost ± standardna greška) tretiranim sa 10 mM akrilamida tokom rastućih vremenskih perioda.

5. DISKUSIJA

Akrilamid je toksična supstanca koja zbog svoje hemijske strukture i reaktivnosti ima primenu u mnogim industrijskim i tehnološkim procesima, zbog čega je gotovo nezaobilazan faktor spoljne sredine savremenom čoveku. Zbog dokazanog prisustva akrilamida u namirnicama koje su u svakodnevnoj upotrebi (Tareke i sar., 2002) i duvanskom dimu (Bergmark, 1997), kao i činjenici da je jedan deo ljudske populacije izložen akrilamidu na radnom mestu, Svetska zdravstvena organizacija je inicirala sprovođenje detaljnih istraživanja u cilju sagledavanja sveobuhvatnih zdravstvenih efekata akrilamida, kako na pojedinačne organe i organske sisteme tako i na celokupni metabolizam (FAO/WHO, 2002).

Iz prethodnih studija koje su izučavale efekat akrilamida na žive sisteme je poznato da je akrilamid neurotoksikant kumulativnog karaktera (LoPachin i sar., 2002b; Friedman, 2003; Lehning i sar., 2003; LoPachin, 2004; Dybing i sar., 2005) i karcinogen (Friedman i sar., 1995) sa toksičnim efektom na reprodukciju i razvoj (Wise i sar., 1995; Wang i sar., 2010), dok je njegov efekat na pankreas, naročito na njegov endokrini deo, nedovoljno poznat.

Akrilamid može da uđe u organizam preko kože kontaktnim putem, inhalacijom, kao i oralnim putem, što utiče na njegovu bioraspodivnost, a samim tim i na efekte koje će imati na organizam (Friedman, 2003). Akrilamid unet oralnim putem prenosi se do svih tkiva, a s obzirom na to da prolazi kroz placentalnu barijeru (Sörgel i sar., 2002, Schettgen i sar. 2004, von Stedingk i sar., 2011) kao i da je detektovan u humanom mleku (Fohgelberg i sar., 2005), izloženost akrilamidu počinje još od intrauterinog razvoja i nastavlja se tokom neonatalnog i juvenilnog perioda.

5.1. Uticaj tretmana akrilamidom na Langerhansova ostrvca pankreasa juvenilnih mužjaka pacova soja Wistar

Kvalitativna, histološka, analiza Langerhansovih ostrvaca u tezi, na presecima pankreasa juvenilnih mužjaka pacova soja Wistar, tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, nije pokazala strukturne promene u arhitekturi Langerhansovih ostrvaca u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Tretman životinja sa obe doze akrilamida nije izazvao gotovo nikakvu promenu u broju Langerhansovih ostrvaca. Isto tako, tretman sa akrilamidom nije doveo do odstupanja u dijametru Langerhansovih ostrvaca kod tretiranih životinja u odnosu na kontrolne.

Langerhansova ostrvca su mikro-organi kompleksne organizacije, ključni u održavanju optimalnog nivoa glukoze u krvi. Važno je istaći da Langerhansova ostrvca samo pri intaktnoj strukturi obavljaju normalnu endokrinu funkciju (Morini i sar., 2006). Dok veličina samog pankreasa u velikoj meri zavisi od veličine organizma, kod sisara, bez obzira na vrstu, veličina Langerhansovih ostrvaca se kreće između 100 i 200 μm (Jo i sar., 2007). Činjenica da krupne životinjske vrste imaju sličnu veličinu Langerhansovih ostrvaca sa vrstama manjih dimenzija ide u prilog tvrdnji da postoji optimalna veličina ovog mikro-organa neophodna za njegovu normalnu funkciju (Kim i sar., 2009).

5.2. Uticaj tretmana akrilamidom na masu, funkciju i stereološke parametre α - i β -ćelija Langerhansovih ostrvaca

Masa β -ćelija može da se modifikuje u skladu sa promenama u metaboličkim zahtevima organizma, kako u fiziološkim uslovima, tako i u situaciji negativnog spoljašnjeg uticaja, u cilju

održavanja normoglikemije. Masa β -ćelija zavisi od tri osnovna faktora: frekvencije nastanka novih β -ćelija (replikacija i diferencijacija), promene u volumenu pojedinačnih β -ćelija (hipertrofija, hipotrofija i atrofija), i frekvencije smrti β -ćelija (Montanya i sar., 2000). Ravnoteža između ova tri faktora određuje da li će se masa β -ćelija povećati, ostanu na istom nivou, ili će se smanjiti. Montanya i sar. (2000) su u svojoj studiji pokazali da se replikacija β -ćelija kod zdravih pacova održava tokom celog života, s tim da se stopa replikacije smanjuje kako organizam stari.

Najčešće upotrebljavani agensi za izazivanje eksperimentalnog dijabetesa, aloksan i streptozotocin, svoje efekte ostvaruju smanjenjem mase β -ćelija (Lenzen, 2008). Naime, streptozotocin i aloksan dovode, pre svega, do signifikantnog pada u $Nv\beta$ (Szkudelski, 2001; Abunasef i sar., 2014, Chen i sar., 2015). Pored aloksana i streptozotocina, postoje indikacije da se i produkti Milardove reakcije u koje spada akrilamid, ubrajaju u supstance sa potencijalnim dijabetogenim efektom, zbog dokazanog negativnog efekta koji imaju na β -ćelije (Fabricio i sar., 2016).

Izostanak značajnijih promena u arhitekturi Langerhansovih ostrvaca kod juvenilnih mužjaka pacova subhronično tretiranih akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm najverovatnije ima nekoliko objašnjenja. Poznato je da su pacovi manje osetljivi na delovanje akrilamida od miševa, ali i od ljudi, što je verovatno u vezi sa toksikokinetikom akrilamida u organizmima različitih vrsta (Sumner i sar., 1992). Takođe, za endokrini pankreas je karakteristično da dobro kompenzuje funkcionalne nedostatke i da je u stanju da spreči promene u funkciji dok ne dođe do značajnog gubitka u mase β -ćelija (Butler i sar., 2003; Cnop i sar., 2005; Prentki i Nolan, 2006). Butler i sar. (2003) su analizirali uzorke pankreasa dobijene nakon hirurškog uklanjanja ili nakon autopsije, kod osoba sa predijabetesom, osoba sa dijabetesom tipa 2, kao i ljudi sa zdravim pankreasom. Ova studija je pokazala gubitak u masi β -ćelija od 40% kod grupe sa predijabetesom, i smanjenje od 63% u grupi sa dijabetesom tipa 2, u odnosu na β -ćelijsku masu kod zdravih pankreasa (Butler i sar., 2003). Prema Prentki i Nolan (2006), gubitak u β -ćelijskoj masi kod dijabetesa tipa 1 iznosi 70-80%. Rezultati teze su pokazali da tretman sa akrilamidom u dozi od 25 i 50 mg/kg tm, 5 puta nedeljno, tokom 3 nedelje, izaziva smanjenje u β -ćelijskoj masi koje je manje od 20%, o čemu će biti diskutovano kasnije u ovom poglavlju. Tretman koji je primenjen u ovom eksperimentu najverovatnije nije dovoljno dugo trajao da bi doveo do jasnih strukturnih promena na pankreasu, organu sa jednom od ključnih uloga u održavanju homeostaze organizma zbog koje ima izrazitu sposobnost kompenzacije negativnih uticaja.

Daljom analizom Langerhansovih ostrvaca, primenom stereoloških metoda, stekli smo detaljniji uvid u diskretne, mikrostrukturne, promene na endokrinom pankreasu, na nivou samih β - i α -ćelija o kojima će biti diskutovano kasnije.

Kod zdravih pacova, β -ćelijska masa pokazuje vrlo jaku korelaciju sa telesnom masom i starošću životinje (Montanya i sar., 2000). U normalnim fiziološkim uslovima masa β -ćelija raste tokom života (McEvoy, 1981). Kod pacova je pokazano povećanje mase β -ćelija od gotovo 8 puta između 1. i 20. meseca života (McEvoy, 1981). Kod mladih pacova uvećanje mase β -ćelija se ogleda kroz povećanje kako numeričke tako i volumenske gustine, dok je kod pacova u adultnom periodu za povećanje mase β -ćelija gotovo isključivo zaslužan rast volumenske gustine (Montanya i sar., 2000). Svako smanjenje ili stagniranje u nastanku novih β -ćelija, naročito kod juvenilnih jedinki gde bi ekspanzija u broju β -ćelija trebala da bude najveća, ukazuje na moguć patološki proces. Redukcija volumenske, numeričke i površinske gustine β -ćelija kod juvenilnih

mužjaka pacova tretiranih sa akrilamidom u ovoj tezi je pokazala dozno-zavisni karakter i ukazuje na smanjenje mase β -ćelija.

Iako smanjenje vrednosti $Vv\beta$ kod životinja tretiranih sa obe doze akrilamida u našem eksperimentu nije pokazalo statističku značajnost, uočen je dozno-zavisni obrazac umanjnja ove vrednosti. Sličan trend u redukciji stereoloških parametara β -ćelija je viđen u studijama koje su se bavile dijabetesom (Clark i sar., 1988; Sakuraba i sar., 2002; Cnop i sar., 2005; Pirmoradi i sar., 2016). Naime, Sakuraba i sar. (2002) su ukazali na redukciju u $Vv\beta$ u vrednosti od 22% kod pankreasa dijabetičara dobijenih procesom autopsije.

Kao što je već napomenuto, na β -ćelijsku masu pored promene u stopi ćelijske deobe i diferencijacije i promene u volumenu pojedinačnih β -ćelija, utiče i stopa ćelijske smrti (Montanya i sar., 2000). U tom smislu, oksidativni stres ima veoma važnu ulogu jer je poznato da oksidativni stres može da dovede do pojave ćelijske smrti, kako u vidu apoptoze (Grunnet i sar., 2009), tako i nekroze (Fehsel i sar., 2003; Collier i sar., 2006; Steer i sar., 2006;). U oba slučaja, kao rezultat se javlja znatan pad u broju ćelija. Rezultati teze su pokazali da je $Nv\beta$ veoma osetljiv parametar kod kojeg dolazi do dozno-zavisnog odgovora na tretman akrilamidom. Tretman sa obe doze akrilamida (25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm) je statistički značajno smanjio vrednost $Nv\beta$ u poređenju sa kontrolom. Sličan odgovor je pokazala i vrednost $Sv\beta$ koja, takođe, opada u dozno-zavisnom maniru i sa statističkom značajnošću kod oba tretmana u poređenju sa kontrolom. Clark i sar. (1988) su uočili statistički značajan pad u $Sv\beta$, u vrednosti od 24%, u post-mortem uzorcima pankreasa pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2. Pad u vrednostima $Nv\beta$ i $Sv\beta$ kao posledica tretmana akrilamidom, potencijalno dijabetogenom supstancom (Fabricio i sar., 2016) je u saglasnosti sa prethodnim studijama u kojima je pokazana citotoksičnost akrilamida za različite ćelije i tkiva (Yousef i El-Demerdash, 2006; Parzefal i sar., 2008; Lebda i sar., 2014).

Veliki broj studija koje su se bavile proučavanjem efekta akrilamida na biološke sisteme su pokazale da se u osnovi toksičnog dejstva akrilamida nalazi oksidativni stres (Yousef i El-Demerdash, 2006; Teodor i sar., 2011; Zamani i sar., 2017). Nalazi niza istraživanja ukazuju na dinamičku i funkcionalnu veza oksidativnog stresa sa ćelijskim volumenom i radom katjonskih jonskih kanala koji doprinose brzom promeni u volumenu ćelije kao odgovoru na promenjene fiziološke uslove (Saha i sar., 1993; Lang i sar., 1998; Schlenker i sar., 2000). Saha i sar. (1993), Koong i sar. (1993), Filipović i Reeves (1997) su pokazali da je jedan od prvih efekata oksidativnog stresa na ćeliju značajno smanjenje u ćelijskom volumenu. Saha i sar. (1993) su uočili pad u volumenu hepatocita kao odgovor na oksidativni stres, a sličan efekat je uočen i u A549 ćelijskoj liniji adenocarcinoma pluća (Koong i sar., 1993) i LLC-PK1 ćelijskoj liniji renalnog epitela (Filipović i Reeves, 1997). Sa druge strane, neke od studija su ukazale na porast u ćelijskom volumenu, koji je, najverovatnije, posledica adaptivnog odgovora ćelije na inicijalni gubitak u volumenu (Schlenker i sar., 2000; Barros i sar., 2001).

Promena u volumenu ćelije ima za posledicu promenu u velikom broju ćelijskih funkcija (Schlenker i sar., 2000), a regulacija ćelijskog volumena je u najužoj vezi sa permeabilnošću plazma membrane za jone. Pošto joni kroz membranu prolaze gotovo isključivo kroz jonske kanale, oksidativne promene na proteinima jonskih kanala se smatraju za najverovatniji mehanizam koji stoji u osnovi promene ćelijskog volumena prouzrokovanog oksidativnim stresom (Schlenker i sar., 2000). Rezultati disertacije ukazuju na značajno povišen nivo malondialdehida (MDA) nakon tretmana Rin-5F ćelijske linije β -ćelija pacova sa 10 mM akrilamidom tokom 1, 12 i 24 h, što, takođe, ide u prilog poremećenoj permeabilnosti plazma

membrane usled oksidativnog oštećenja njene strukture. Prethodne studije urađene na ćelijama jetre (Saha i sar., 1993), A549 ćelijskoj liniji adenocarcinoma pluća (Koong i sar., 1993) i LLC-PK1 ćelijskoj liniji renalnog epitela (Filipovic i Reeves, 1997) su pokazale da je mehanizam kojim dolazi do smanjenja u ćelijskom volumenu u vezi sa brzim gubitkom K^+ (Saha i sar., 1993). U mehanizmu lučenja insulina koji se javlja kao odgovor β -ćelija na prisustvo glukoze, kanali za K^+ imaju važnu ulogu (Prentki, 1996). Metabolizam glukoze preko piruvata i Acetil-CoA i naknadne mitohondrijalne oksidacije dovodi do povećanja ATP/ADP odnosa. Povišen nivo ATP rezultira zatvaranjem ATP-zavisnih K^+ -kanala što depolarizuje plazma membranu. Odgovor ćelije na depolarizaciju membrane nastalu usled zatvaranja kanala za K^+ je otvaranje Ca^{2+} -kanala i ulazak u ćeliju jona Ca^{2+} koji ima stimulatorni efekat na egzocitozu insulinskih granula. Štetni efekti supstanci koji bi na bilo koji način omeli metabolizam glukoze, ili uticali na funkcionalnost kanala za K^+ u β -ćelijama, automatski bi uticali na egzocitozu insulina u smislu njenog smanjenja ili povećanja (Caicedo 2013). Naši rezultati ukazuju na promenjen stepen egzocitoze insulina kod akrilamidom tretiranih juvenilnih mužjaka pacova. Pad u vrednosti parametara $V_{vc\beta}$ i $OD\beta$ čiji nivo stoji u direktnoj proporciji sa koncentracijom proteina (Owens i Poole, 1979; Ruifrok i Johnston, 2001; Varghese i sar., 2014), potencijalno ukazuje na pojačanu egzocitozu insulina kod pacova tretiranih sa akrilamidom.

Uprkos signifikantnom gubitku β -ćelija u našem eksperimentu, nije došlo do promene u koncentraciji glukoze u serumu. Analiza glukoze u serumu kod pacova tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm nije pokazala značajnu promenu u vrednosti u poređenju sa nivoom glukoze u serumu kod pacova iz kontrolne grupe. Dobijeni nalaz je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim prilikom ispitivanja nivoa glukoze u serumu tokom patogeneze dijabetesa (Butler i sar., 2003; Prentki i Nolan, 2006). Pokazano je da se kod pacova (Prentki i Nolan, 2006) i čoveka (Butler i sar., 2003; Prentki i Nolan, 2006) normoglikemija održava tokom cele početne faze bolesti, a hiperglikemija se javlja kao simptom tek pošto je izgubljeno 70-80% β -ćelija kod dijabetesa tipa 1, i 41-63% β -ćelija kod dijabetesa tipa 2. Pored toga, hiperglikemija se javila tek prilikom parcijalne pankreatomije od 95% kod glodara (Bonner-Weir i sar., 1983), i redukcije u β -ćelijskoj masi od 50% u eksperimentalnom dijabetesu izazvanom tretmanom sa STZ kod babuna (McCulloch i sar., 1991). Procenat u redukciji numeričke gustine β -ćelija u našem eksperimentu je bio 18,71% kod životinja tretiranih sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm i 19,93% kod životinja tretiranih sa akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm. Dakle, preostalih 81,29% i 80,07% β -ćelija kod životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm je očigledno bilo dovoljno za očuvanje normoglikemije kod životinja obe eksperimentalne grupe. Pored toga, osobina β -ćelija da su veoma prilagodljive različitim metaboličkim zahtevima se ogleda i u njihovoj sposobnosti da spreče pojavu dijabetesa čak i u ekstremnim uslovima (Montanya, 2014). U osnovi mehanizma koji dovodi do kompenzatorne reakcije β -ćelija mogu da budu dva različita procesa: povećanje β -ćelijske mase (Steil i sar., 2001) i pojačana sekrecija β -ćelija (Khan i sar., 1993). Upravo je gubitak u broju β -ćelija, koji se uočava i u rezultatima teze, jedan od najčešćih uzroka koji vodi ka ekstenzivnom kompenzatornom oslobađanju insulina iz preostalih β -ćelija, da bi se održala normoglikemija (Prentki i Nolan, 2006; Cerf i sar., 2013). To je u saglasnosti sa uočenim nepromenjenim nivoom glukoze u krvi pacova tretiranih sa obe doze akrilamida. Pored toga, pad u optičkoj gustini insulina u β -ćelijama pankreasa životinja koje su tretirane sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm i pad u optičkoj gustini insulina u β -ćelijama pankreasa životinja koje su tretirane sa akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm, sa statističkom signifikantnošću u poređenju sa ekspresijom

insulina u β -ćelijama kontrolnih životinja, ukazuje na potencijalnu povećanu egzocitozu insulina, budući da je optička gustina u direktnoj vezi sa količinom proteina u citoplazmi (Ruifrok i sar., 2001; Vaghese i sar., 2014). Ovoj pretpostavci doprinosi i dozno-zavisni pad, kako u volumenu citoplazme, $V_{vc\beta}$, tako i u ukupnom volumenu β -ćelija, $V_{v\beta}$.

Nukleo-citoplazmatski odnos β -ćelija u Langerhansovim ostrvcima pacova tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 i 50 mg/kg tm nije pokazao značajnu promenu u vrednosti u poređenju sa kontrolnim životinjama. Diskretan dozno-zavisni pad u vrednosti nukleo-citoplazmatskog odnosa β -ćelija kod tretiranih životinja bi mogao da ukaže na blago smanjenje u nivou sintetičkih procesa u β -ćelijama, čime bi, delimično, mogao da se objasni pad u vrednosti OD β . Ipak, kada se uzme u obzir visoka signifikantnost u padu vrednosti OD β kod životinja tretiranih sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm ($p < 0,01$) i 50 mg/kg tm ($p < 0,001$) u poređenju sa kontrolom, proces koji je prvenstveno doprineo održanoj normoglikemiji je, najverovatnije, pojačana egzocitoza insulinskih granula.

Alfa-ćelije su se pokazale kao rezistentnija populacija endokrinih ćelija pankreasa na toksični efekat akrilamida, u odnosu na β -ćelije. Poznato je da α -ćelije ostaju zaštićene od toksičnog efekta koji stvara metabolički stres, dok, pod istim uslovima, β -ćelije umiru procesom apoptoze (Wali i Thomas, 2015). Pored toga što ostaju zaštićene, kod dijabetesa tipa 1 (Li i sar., 2000; Guardado-Mendoza i sar., 2009; Takeda i sar., 2012) kao i kod dijabetesa tipa 2 (Clark i sar., 1988; Sakuraba i sar., 2002; Yoon i sar., 2003; Iki i Pour, 2007) je zabeležena proliferacija i hipertrofija α -ćelija. To je značajan podatak budući da se i akrilamid smatra potencijalno dijabetogenom supstancom (Fabricio i sar., 2016).

U rezultatima disertacije se uočava da je $V_{v\alpha}$ kod životinja tretiranih sa akrilamidom pokazala porast u odnosu na kontrolne vrednosti. Taj porast je kod životinja tretiranih sa nižom dozom akrilamida (25 mg/kg tm) iznosio 21,3 %. Kod životinja tretiranih sa višom dozom akrilamida (50 mg/kg tm), porast u vrednosti $V_{v\alpha}$ u odnosu na kontrolne životinje je iznosio 14,6%. Vrednosti $V_{v\alpha}$ za obe grupe tretiranih životinja nisu bile statistički značajna u poređenju sa kontrolom. Zabeleženi rast u nivou $V_{v\alpha}$ je u skladu sa rezultatom do kojeg su došli Sakuraba i sar. (2002), koji pokazuje porast u nivou $V_{v\alpha}$ za oko 20% u humanim pankreasima pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2.

Promena $S_{v\alpha}$ kod tretiranih životinja je pokazala sličan odgovor. Kod juvenilnih mužjaka pacova tretiranih sa nižom dozom akrilamida dolazi do nesignifikantnog porasta u vrednosti $S_{v\alpha}$ u poređenju sa kontrolom, da bi prilikom tretmana sa jačom dozom došlo do blagog pada površinske gustine α -ćelija, koja i dalje ostaje viša od kontrolne vrednosti. Do sličnog rezultata su došli i Clark i sar. (1988), koji su uočili statistički značajan porast u $S_{v\alpha}$, od 58%, u post-mortem uzorcima pankreasa pacijenata obolelih od dijabetesa tipa 2. U saglasnosti sa ovim je i nalaz Li i sar. (2000) koji su pokazali 2-3 puta veću vrednost $S_{v\alpha}$ kod pacova tretiranih sa STZ, u poređenju sa kontrolnim.

Uočeno povećanje volumena alfa ćelija nakon izlaganja akrilamidu može biti posledica oksidativnog stresa, pošto, kao što je već komentarisano ranije, pokazano je da se jedan od mehanizama citotoksičnosti akrilamida zasniva na izazivanju oksidativnog stresa u ćelijama na koje deluje (Yousef i El-Demerdash, 2006; Parzefal i sar., 2008). Schlenker i sar. (2000) su na HTC hepatoma ćelijskoj liniji pacova pokazali da nakon inicijalnog pada u volumenu ćelija usled indukovano oksidativnog stresa, sledi porast u ćelijskom volumenu zbog promene u permeabilnosti membrane za katjone, koja postaje, gotovo, 100 puta propustljivija. Veoma je karakteristično da tokom oksidativnog stresa različiti tipovi ćelija imaju visok nivo

intracelularnog Ca^{2+} i nizak nivo ATP. Ovi metabolički uslovi pogoduju aktivaciji i otvaranju neselektivnih kanala za katjone što je adaptivni odgovor ćelije na smanjeni volumen. Zbog visokog koncentracijskog gradijenta, joni Na^{+} ulaze u ćeliju, zajedno sa molekulima vode što ima za posledicu povećanje ćelijskog volumena (Schlenker i sar., 2000; Barros i sar., 2001; Simon i sar., 2002). Membrana životinjskih ćelija je veoma propustljiva za vodu i svaki disbalans u intracelularnoj i ekstracelularnoj osmolarnosti se kompenzuje prolaskom vode kroz membranu što ima za rezultat promenu u ćelijskom volumenu (Lang i sar., 1998).

Rezultati teze pokazuju značajno povećanje u vrednosti $N_{v\alpha}$ kod životinja koje su dobijale akrilamidni tretman u nižoj dozi. U skladu sa tim je i blago povišena vrednost $V_{v\alpha}$ kod životinja tretiranih sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm, koja bi mogla da ukaže na potencijalnu proliferativnu aktivnost α -ćelija s obzirom na to da je veličina nukleusa u direktnoj proporciji sa proliferativnom aktivnošću ćelije (Smolle i sar., 1989). Proliferacija α -ćelija u uslovima kada je evidentan gubitak u broju β -ćelija može da se objasni činjenicom da α -ćelije mogu procesom transdiferencijacije da pređu u β -ćelije (Chung i Levine, 2010; Thorel i sar., 2010). Rezultati ove studije pokazuju signifikantan porast u $N_{v\alpha}$ kod životinja koje su primale akrilamid u dozi od 25 mg/kg tm, ali redukciju u broju α -ćelija kod životinja tretiranih sa akrilamidom u dozi od 50 mg/kg tm, koja, uprkos tome, ostaje viša od kontrolne vrednosti. Sličan odnos brojnosti α - i β -ćelija, kao u ovom eksperimentu, je uočen u studiji gde je dijabetes kod pacova izazvan višestrukim tretmanima sa niskim dozama STZ (Li i sar., 2000). Naime, STZ je uticao na postepeno smanjenje u brojnosti β -ćelija, dok su α -ćelije imale različit odgovor u zavisnosti od dužine trajanja STZ tretmana. Kraći tretman (14-21 dan) je doveo do signifikantnog porasta u broju α -ćelija, dok je nastavak tretmana (28 dana) doveo do redukcije u njihovom broju, gotovo do kontrolnih vrednosti (Li i sar., 2000). Povišena optička gustina ćelija imunopozitivnih na glukagon, OD_{α} , konstatovana u disertaciji, takođe može da sugerise porast u broju α -ćelija Langerhansovih ostrvca. Ipak, postoje studije koje pokazuju da je za konverziju α -ćelija u β -ćelije potreban gotovo potpuni gubitak populacije β -ćelija (Nir i sar., 2007; Chung i sar., 2010; Thorel i sar., 2010). Iako je redukcija $N_{v\beta}$ i $S_{v\beta}$ bila statistički značajna, gubitak β -ćelija u eksperimentu ove disertacije nije bio izražen u meri u kojoj je taj gubitak bio u pomenutim studijama u kojima je uočen fenomenom konverzije α - u β -ćelije. Stepen gubitka β -ćelija koji je neophodan da bi se aktivirao proces konverzije α - u β -ćelije, kao i konkretan signal koji pokreće proces transdiferencijacije tek treba da bude utvrđen. Postoje indikacije da su upalni procesi važan faktor koji izaziva konverziju α - u β -ćelije (Wang i sar., 2007; Chung i Levine, 2010; Zaret i White, 2010). Ovo ukazuje na činjenicu da postoji više od jednog mogućeg signala koji dovode do inicijacije procesa transdiferencijacije α -ćelija u β -ćelije, a ne samo ablacija β -ćelija.

Povišena vrednost OD_{α} uočena u rezultatima disertacije može da ukaže na potencijalno nakupljanje glukagona u α -ćelijama. Kvantifikacija OD_{α} je pokazala dozno-zavisni porast kod pacova tretiranih akrilamidom, s time da je samo porast u grupi koja je tretirana višom dozom statistički značajan u poređenju sa kontrolom. Ova tvrdnja je u saglasnosti sa pretpostavkom da se insulin intenzivno sekretuje iz β -ćelija, i nepromenjenim nivoom glukoze u serumu od oko 7 mmol/l kako u kontrolnoj tako i u obe eksperimentalne grupe.

Postoji više mehanizama koji regulišu sekreciju glukagona. Poznato je da veliki broj produkata sekrecije susednih endokrinih ćelija Langerhansovih ostrvaca, u koje spadaju insulin (Greenbaum i sar., 1991), Zn^{2+} (Ishihara i sar., 2003), somatostatin (Cejvan i sar., 2003) i γ -aminobuterna kiselina (GABA) (Wendt i sar., 2004), kao parakrini faktori imaju sposobnost da

inhibiraju lučenje glukagona (Briant i sar., 2016). Ipak, najznačajniji parakrini inhibični efekat među njima ima insulin (Jain i Lammert, 2009). Studije mikrovaskularizacije Langerhansovih ostrvaca su pokazale da se α -ćelije nalaze “nizvodno” od β -ćelija pa su izložene sekretovanom insulinu (Samols i sar., 1988). Pored insulina, glukoza je veoma efikasan inhibitor glukagonske sekrecije (Takahashi i sar., 2006). Glukoza najefikasnije inhibira sekreciju glukagona pri koncentraciji glukoze od 7 mmol/l (Vieira i sar., 2007), što je u rezultatima teze vrednost koncentracije glukoze u serumu kako kontrolnih, tako tretiranih životinja. Blago dozno-zavisno povećanje u vrednosti $V_{vc\alpha}$ je u skladu sa rezultatom da u tretmanu akrilamidom dolazi do akumulacije glukagonskih sekretornih granula u citoplazmi.

Metabolizam glukoze u α -ćelijama generiše signale koji inhibišu sekreciju glukagona, dok isti ti signali, kao što je već diskutovano, u β -ćelijama pojačavaju sekreciju insulina (Takahashi i sar., 2006). Pri povišenoj ekstracelularnoj koncentraciji glukoze, visok intracelularni ATP/ADP odnos rezultuje zatvaranjem ATP-zavisnih K^+ kanala, kao i kod β -ćelija. Međutim, blokada ATP-zavisnih K^+ kanala kod α -ćelija dovodi do kaskade događaja koji sprečavaju ulazak Ca^{2+} u ćeliju, a samim tim i sekreciju glukagona (Quesada i sar., 2008). Pored toga, postoje indicije da glukoza može da suprimira sekreciju glukagona i preko inhibicije struje Ca^{2+} jona koja je nezavisna od mehanizma koji uključuje ATP-zavisne kanale za K^+ (Vieira i sar., 2007).

5.3. Efekat tretmana akrilamidom na pojavu oksidativnog i nitrozativnog stresa u ćelijama endokrinog pankreasa i Rin-5F ćelijskoj liniji

Kao što je detaljno opisano u poglavlju 1.3. Uvoda disertacije, reaktivne molekulske vrste mogu da postoje u vidu slobodnih radikala, ali i neradikalnih molekula koji su jaka oksidaciona sredstva ili lako prelaze u radikalni oblik (Valko i sar., 2007; Halliwell i Gutteridge, 2015). Kada nastanak ROS i RNS prevaziđe kapacitet intracelularne enzimske i neenzimske antioksidativne zaštite, dolazi do različitog stepena oštećenja ili do destrukcije ćelija usled toksičnog dejstva reaktivnih radikalnih i neradikalnih molekula na ćelijske strukture kao što su DNK, lipidi ćelijske membrane i proteini. Nitrozativni stres nastaje kao posledica prekomerne produkcije RNS, prvenstveno azot monoksida (NO^{\cdot}), dok je za pojavu oksidativnog stresa odgovorno remećenje ravnoteže između stope formiranja i uklanjanja ROS. Interakcija ROS i RNS sa ćelijskim biomolekulima rezultuje poremećajem ćelijskog metabolizma, što može da vodi u ćelijsku smrt procesom nekroze ili apoptoze (Halliwell i Gutteridge, 2015). Sve je više literaturnih podataka koji ukazuju na to da su oksidativni i nitrozativni stres direktno, ili indirektno, odgovorni za niz akutnih i hroničnih oboljenja (Halliwell, 2001; Dalle-Donne i sar., 2003; Stocker i Keaney, 2004; Klaunig i Kamendulis, 2004; Dalle-Donne i sar., 2005).

Uvid u potencijalni efekat oksidativnog i nitrozativnog stresa na ćeliju možemo da dobijemo iz analize biomarkera izolovanih iz različitih tkiva. Biomarkeri su ćelijski indikatori fiziološkog stanja ćelije i promena koje nastaju usled patoloških procesa (Dalle-Donne i sar., 2006). Produkti oksidacije koji se koriste kao najčešći biomarkeri povišenog prisustva i aktivnosti ROS su produkti lipidne peroksidacije, prisustvo redukovano GSH, kao i prisustvo slobodnih $-SH$ grupa (Griffiths i sar., 2002; Halliwell i Whiteman, 2004; Davies i sar., 2005; Dalle-Donne i sar., 2005). Iako se nitrozativni stres dovodi u vezu sa delovanjem RNS, a oksidativni stres sa prvenstvenim delovanjem ROS, veoma je teško odvojiti ova dva ćelijska stanja jer se sinteza i delovanje RNS i ROS u velikoj meri podudaraju i međusobno uslovljavaju.

Za β -ćelije je karakteristična relativno niska ekspresija antioksidativnih enzima, kada se uporede sa ćelijama ostalih tkiva (Grankvist i sar., 1981). Zbog toga su β -ćelije posebno osjetljive na dejstvo ROS i RNS (Tiedge i sar., 1997; Kajimoto i Kaneto, 2004). Lenzen i sar. (1996) su pokazali da je ekspresija antioksidativnih enzima u jetri, mozgu, bubrezima, plućima, skeletnim mišićima, srčanom mišiću, nadbubrežnoj žlezdi i hipofizi viša nego u ćelijama Langerhansovih ostrvaca. Takođe, ćelije Langerhansovih ostrvaca imaju i nizak potencijal reparacije oksidativnih oštećenja na DNK, u poređenju sa ćelijama jetre (Modak i sar., 2009). Iz literature je poznato da oksidativni stres može da dovede do insulinske rezistencije (Memisogullari i sar., 2003), dok i oksidativni i nitrozativni stres mogu da dovedu do pojave dijabetesa (Maritim i sar., 2002). U tom smislu, jedan od ciljeva ove disertacije je bio da se utvrdi da li tretman sa akrilamidom izaziva pojavu oksidativnog i nitrozativnog stresa u endokrinom pankreasu, pre svega u β -ćelijama, pogotovo kada se uzme u obzir činjenica da su β -ćelije osjetljive na delovanje produkata Milardove reakcije, među kojima akrilamid zauzima važno mesto (Elmhiri i sar., 2014; Fabricio i sar., 2016).

U ovoj tezi analiziran je uticaj akrilamida na ekspresiju antioksidativnih enzima SOD1, SOD2, i CAT, kao i enzima iNOS i CYP2E1 u ćelijama Langerhansovih ostrvaca nakon tretmana juvenilnih mužjaka pacova soja Wistar sa akrilamidom u dozi od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm. Pošto β -ćelije predstavljaju najbrojniji ćelijski tip u endokrinom pankreasu (>80%) (Liu i Habener, 2009), korišćena je Rin-5F ćelijska linija insulinoma beta-ćelija pankreasa za proučavanje potencijalnog citotoksičnog efekta akrilamida i njegovog efekta na parametre oksidativnog stresa. Analizirana je aktivnost ukupne SOD i CAT, prisustvo odabranih biomarkera oksidativnog stresa (nivo redukovanog GSH, nivo MDA, nivo slobodnih -SH grupa u proteinima i prisustvo nitrata) i transkripcija gena za SOD1, SOD2, CAT, CYP2E1, Bax, Bcl-2, iNOS u Rin-5F ćelijama nakon izlaganja ovih ćelija 10 mM akrilamidom (IC_{50}) tokom različitih vremenskih intervala.

5.3.1. Efekat tretmana akrilamidom na nivo NO_2^- i ekspresiju iNOS

Uticaj tretmana akrilamidom na prisustvo enzima iNOS u ćelijama endokrinog pankreasa je u ovoj tezi određivano kvantifikacijom optičke gustine ćelija imunopozitivnih na iNOS (OD_{iNOS}), kao i analizom transkripcije gena za iNOS u insulin-produkujućim Rin-5F ćelijama. Takođe, ispitan je uticaj tretmana akrilamidom na prisustvo nitrita (NO_2^-) u Rin-5F ćelijama. Količina prisutnog nitrita (NO_2^-), govori o prisutnom NO^{\cdot} , a time jasno ukazuje na aktivnost enzima iNOS koji ga sintetiše. Nitriti nastaju oksidacijom endogeno stvorenog NO^{\cdot} , tako da se koncentracija NO_2^- uzima kao pouzdan indikator stvaranja NO^{\cdot} . Istovremeno, NO_2^- joni mogu da ponovo pređu u NO^{\cdot} , zbog čega služe kao rezervoar NO^{\cdot} radikala u ćeliji (Giustarini i sar., 2004).

Prisustvo iNOS je karakteristično za gotovo sve tipove ćelija (Šoškić i sar., 2011), ali do ekspresije ovog proteina ne dolazi u fiziološkim uslovima već je najčešće u vezi sa različitim patološkim procesima (Morris i Billiar, 1994). I rezultati u ovoj tezi pokazuju da je nivo ekspresije gena za iNOS u kontrolnim Rin-5F ćelijama, kao i optička gustina ovog enzima u Langerhansovim ostrvcima kontrolnih životinja na niskom nivou. Kao posledica toga, i nivo prisutnog NO_2^- kod netretiranih Rin-5F ćelija je zanemarljiv što ukazuje na veoma nisku aktivnost iNOS.

Veoma čest signal za sintezu iNOS su citokini (Aktan, 2004). Proinflamatorni citokini kao što su interleukin-1 β (IL-1 β), faktor nekroze tumora- α (TNF- α) i interferon- γ (IFN- γ) imaju citotoksični efekat na β -ćelije pankreasa (Cerf, 2013). Hronična izloženost pankreasnih β -ćelija interleukinu IL-1 β dovodi do pojačane ekspresije iNOS, što ima za rezultat visoku produkciju NO \cdot koji ometa intracelularni transfer elektrona i inhibira sintezu ATP-a u mitohondrijama. Pad nivoa ATP-a u ćeliji uzrokuje disfunkciju β -ćelija pankreasa i inhibiciju sekrecije insulina (Corbett i sar., 1992; Takamura i sar., 1998; Darvile i Eizirik, 1998; Tomas i sar., 2002; Arafat i sar., 2007; Yang i sar., 2010; Keklikoglu i Akinci, 2013). S obzirom na činjenicu da akrilamid inicira porast nivoa TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-10 u plazmi tretiranih pacova (Alturfan i sar., 2012), analiza ekspresije i aktivnosti iNOS u β -ćelijama pacova nosi bitnu informaciju o efektu akrilamida na funkciju β -ćelija. Pored citokina, na povišenu sintezu iNOS pozitivno utiče i oksidativni stres (Šoškić i sar., 2011).

Azot oksid (NO \cdot) je ćelijski signalni molekul prisutan kod svih kičmenjaka. Neophodan je za odvijanje normalnih fizioloških procesa u različitim tkivima, pa tako i u pankreasu. Uprkos tome, nivo NO \cdot koji je viši od fiziološkog predstavlja ozbiljan problem jer su β -ćelije pojačano osjetljive na dejstvo NO \cdot zbog slabe antioksidativne zaštite (Spinass, 1999). Iako se NO \cdot često opisuje kao visoko toksični molekul, postoje indicije da je najveći broj citotoksičnih efekata koji se pripisuju NO \cdot posledica delovanja peroksinitrita (ONOO $^-$) koji nastaje u reakciji između NO \cdot i O $_2^{\cdot-}$ (Pacher i sar., 2007).

Reakcija nastanka ONOO $^-$ ne zahteva prisustvo enzima, i odvija se brzinom od 16 – 20 x 10 9 M $^{-1}$ · s $^{-1}$ (Nauser i Koppenol, 2002). Brzina reakcije kojom SOD uklanja O $_2^{\cdot-}$ je oko 2 x 10 9 M $^{-1}$ · s $^{-1}$ (Pacher i sar., 2007). To znači da će, ako su mitohondrije izložene relativno visokom nivou NO \cdot , doći do nastanka visoke koncentracije ONOO $^-$ i pored delovanja SOD enzima, jer je reakcije nastanka ONOO $^-$ daleko efikasnija od dismutacije O $_2^{\cdot-}$ od strane SOD.

Veoma važan aspekt citotoksičnosti ONOO $^-$ je njegova sposobnost da dovede do lipidne peroksidacije ćelijske membrane, lipozoma i lipoproteina, uklanjanjem atoma vodonika iz polinezasićenih masnih kiselina (Pacher i sar., 2007). U produkte lipidne peroksidacije spadaju lipidni hidroperoksi-radikali, konjugovani dieni i aldehidi, među kojima je veoma značajan malon-dialdehid (MDA) (Denicola i Radi, 2005). U prilog pretpostavci da u našem eksperimentu dolazi do nastanka ONOO $^-$ ide i nalaz da se u Rin-5F ćelijama, tretiranim sa 10 mM akrilamidom tokom 1, 12 i 24 h, uočava porast u nivou MDA.

Kako se iNOS aktivira najčešće tokom patoloških procesa (Morris i Billiar, 1994), tako i NO \cdot nastao dejstvom iNOS može da bude uključen u patološka stanja u koja spada i dijabetes, i da vodi ka uništenju ćelije u kojoj je sintetisan, što je jedan od osnovnih razloga pojave sekundarnih komplikacija kod dijabetičara (Kröncke i sar., 1998). Nakon kratkih i dugih tretmana Rin-5F ćelija sa 10 mM akrilamidom, ekspresija gena za iNOS u našem eksperimentu je veoma značajno porasla u odnosu na ekspresiju u kontrolnim ćelijama. Rezultati ove teze, takođe, pokazuju da tretman juvenilnih mužjaka pacova soja Wistar sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm izaziva dozno-zavisni porast u imunoreaktivnosti endokrinih ćelija Langerhansovih ostrvaca na iNOS. Statistička značajnost u porastu OD_{iNOS} je uočena u oba tretmana u poređenju sa kontrolnim životinjama. Ovaj nalaz je u skladu sa nalazom na moždanom tkivu gde je, takođe, pokazano da subhronični tretman akrilamidom ima pozitivan efekat na sintezu iNOS (Kim, 2005).

Kao merilo aktivnosti iNOS u Rin-5F ćelijama u ovom istraživanju je analizirano prisustvo stvorenog NO \cdot , merenjem koncentracije NO $_2^-$ u uzorku. Kontrolne Rin-5F ćelije su sadržale

neznatan nivo NO_2^- , što ukazuje na nizak nivo NO^{\cdot} , a time i na slabu aktivnost iNOS. To je saglasno sa literaturnim podacima koji pokazuju da su fiziološke doze NO^{\cdot} niske i da nastaju dejstvom konstitutivnih NOS (eNOS i nNOS) koje su konstantno prisutne u zdravim ćelijama (Alderton i sar., 2001; Aktan, 2004). Tretman sa 10 mM akrilamidom je doveo do veoma značajnog skoka u aktivnosti iNOS u Rin-5F ćelijama tokom kratkotrajnih tretmana, što se ogledalo kroz nagli skok koncentracije NO_2^- koja je imala svoj pik tokom tretmana od 1 h, ali se visok nivo NO_2^- zadržao tokom svih vremenskih intervala tretmana i imao je visoku statističku značajnost u poređenju sa kontrolom. Taj nalaz je u saglasnosti sa analizom ekspresije gena za iNOS koja je pokazala da kratkotrajni, kao i dugotrajni tretmani Rin-5F ćelija sa 10 mM akrilamidom dovode do signifikantnog porasta nivoa iRNK za iNOS, pri čemu se pikovi ekspresije dešavaju posle 1 h i 24 h.

Pokazano je da pojačana ekspresija iNOS u endokrinim ćelijama pankreasa zbog povećane sinteze NO^{\cdot} dovodi do disfunkcije α - i β -ćelija i pada u sekreciji insulina (Corbett i sar., 1993; Rabinovitch i sar., 1996; Alderton i sar., 2001; Bedoya i sar., 2012; Muhammed i sar., 2012; Eckersten i sar., 2012), pri čemu samo NO^{\cdot} poreklom od iNOS ima negativni efekat na β -ćelije (Eckersten i Henningsson, 2012; Keklikoglu i Akinci, 2013). Rezultati ove teze pokazuju smanjenu OD β insulina u β -ćelijama. Smanjena OD β može da bude posledica smanjene sinteze, ali i pojačane egzocitoze insulina. Normoglikemija uočena kod životinja tretiranih sa obe doze akrilamida ukazuje da je pojačana egzocitoza insulina najverovatniji razlog dozno-zavisnog pada OD β . Rezultati ove teze po prvi put pokazuju da akrilamid može da indukuje ekspresiju gena za iNOS, i da je to povećanje praćeno povećanjem aktivnosti datog enzima u β -ćelijama pankreasa što može da bude u vezi sa daljim dijabetogenm efektom. Iz literature je poznato da postoji *species*-specifična razlika u stepenu osetljivosti β -ćelija prema NO^{\cdot} -indukovanoj toksičnosti. Humane β -ćelije su relativno otporne na delovanje NO^{\cdot} , dok su β -ćelije pacova veoma osetljive na efekat NO^{\cdot} (Eizirik i sar., 1994).

Pokazano je da glukagon ima inhibitorni efekat na ekspresiju iNOS u β -ćelijama (Belin i sar., 1999). Naši rezultati ukazuju na retenciju glukagona u α -ćelijama pod dejstvom akrilamida čime je, najverovatnije, sprečeno moguće inhibitorno dejstvo glukagona na sintezu iNOS. To je jedan od potencijalnih razloga intenzivnog skoka u ekspresiji iNOS u tretmanu pacova dozom akrilamida od 50 mg/kg tm prilikom kojeg je i retencija glukagona uočljivija. Proinflamatorni citokin IL-1 β može da izazove sintezu velike količine NO^{\cdot} u β -ćelijama glodara, kao i ćelijskim kulturama β -ćelija (Corbett i sar., 1992) što je značajno u tretmanu akrilamidom zbog činjenice da ova toksična supstanca izaziva porast u nivou intracelularnog IL-1 β (Alturfan i sar., 2012).

Langerhansova ostrvca su veoma bogato vaskularizovana gustom kapilarnom mrežom čiji glavni zadatak je da obezbedi efikasnu sekreciju hormona koji se sintetišu u ćelijama endokrinog pankreasa u krvotok (Eberhard i Lammert, 2009). Azot-oksidi su ključni regulatori vaskularne homeostaze u organizmu (Gladwin i sar., 2004). Pored NO^{\cdot} , i NO_2^- ima ulogu vazodilatatora pri visokim fiziološkim koncentracijama (Giustarini i sar., 2004). U našem eksperimentu se uočava dozno-zavisni porast u dilataciji kapilara Langerhansovih ostrvaca kod pacova tretiranih sa akrilamidom. Vazodilatatorna uloga NO_2^- pri višim fiziološkim koncentracijama može da bude direktna, ali i da se manifestuje kroz prelazak NO_2^- u NO^{\cdot} u *in vivo* uslovima (Giustarini i sar., 2004).

5.3.2. Efekat tretmana akrilamidom na antioksidativne enzime

Smanjena aktivnosti sistema antioksidativne ćelijske zaštite je jedan od glavnih uzroka nastanka oksidativnog stresa. Zato je jedan od ciljeva ove teze bio da se odredi da li tretman akrilamidom menja aktivnost i ekspresiju antioksidativnih enzima SOD i CAT u endokrinim ćelijama pankreasa. Mnoge dosadašnje studije su pokazale da u osnovi citotoksičnosti akrilamida stoji oksidativni stres (Yousef i El-Demerdash, 2006; Parzefal i sar., 2008; Lebda i sar., 2014). Tretman akrilamidom je izazvao signifikantan pad u aktivnosti antioksidativnih enzima u mozgu i jetri embriona pileta (Venkataswamy i sar., 2013), i testisima pacova (Elghaffar, 2015). Zbog toga je u ovoj tezi merena aktivnost ukupne SOD, kao i aktivnost CAT u kontrolnim Rin-5F ćelijama i Rin-5F ćelijama tretiranim sa akrilamidom u dozi od 10 mM tokom različitih vremenskih intervala.

Supeoksid dismutaza i CAT imaju centralnu ulogu u enzimatskoj odbrani ćelije od kisoničnih radikala, što potvrđuje i njihovo ubikvitarno prisustvo u aerobnim organizmima (García Martínez i sar., 1995; Peskin, 1997). Beta-ćelije i insulin-produkujuće ćelijske linije imaju adekvatnu ekspresiju SOD enzima, međutim, nivo fiziološke ekspresije CAT je na značajno nižem nivou u odnosu na ćelije drugih tkiva (Mehmeti i sar., 2011). Zbog toga je za β -ćelije karakteristično da akumuliraju H_2O_2 na koji su visoko osetljive (Lenzen, 2008).

Regulacija ekspresije antioksidativnih enzima u uslovima oksidativnog stresa nije predvidiva i može da varira u zavisnosti od toga koji slobodni radikal preovlađuje u datom momentu. Pokazano je da aktivnost i ekspresija CAT na nivou proteina i mRNA, mogu da budu sniženi (Cvetkovic i sar., 1998), povišeni (Yoshioka i sar., 1990) i nepromenjeni (Nath i sar., 1996) tokom oksidativnog stresa. Aktivnost SOD tokom oksidativnog stresa takođe može da varira. U slučaju kada je oksidativni stres izazvan povišenim nivoom $O_2^{\cdot-}$, aktivnost SOD je povišena (Hazneci i sar., 2005), ali je aktivnost CAT tada smanjena (Halliwell i Gutteridge, 2015). To je u skladu sa rezultatima Kono i Fridovich (1982), koji su ukazali na inhibitorno delovanje $O_2^{\cdot-}$ anjona na aktivnost CAT. Važi i obrnuto, kada je nivo H_2O_2 visok, aktivnost CAT je na visokom nivou, dok aktivnost SOD pada zbog supresivnog efekta koji H_2O_2 ima na aktivnost izoforme Cu,Zn-SOD, SOD1 (Sampson i Beckman, 2001).

U ovoj tezi, subhronični tretman juvenilnih mužjaka pacova soja Wistar sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm nije doveo do signifikantne promene u imunoreaktivnosti ćelija Langerhansovih ostrvaca na SOD1, SOD2 i CAT.

Tretman Rin-5F ćelija sa 10 mM akrilamidom doveo je do signifikantnog porasta u katalaznoj aktivnosti nakon tretmana u trajanju od od 1 h, dok je 12 h nakon tretmana aktivnost katalaze značajno opala. Zbog niskog afiniteta prema peroksidima, CAT je najefikasnija prilikom visokih koncentracija H_2O_2 (Pamplona i Costantini, 2011). Zbog toga, skok u enzimskoj aktivnosti CAT tokom tretmana od 1 h može da ukazuje na nagli porast koncentracije H_2O_2 . To je u saglasnosti sa našim rezultatom za aktivnost ukupne SOD kod koje nakon 1 h tretmana sa 10 mM akrilamidom dolazi do statistički značajnog pada u aktivnosti (Sampson i Beckman, 2001). Pad u aktivnosti SOD u našem eksperimentu je uočen i nakon tretmana od 12 i 24 h, što je u saglasnosti sa Zhu i sar. (2008) koji su pokazali da akrilamid smanjuje aktivnost SOD u nervnom sistemu tretiranih pacova.

Pokazano je da inhibicija aktivnosti SOD do koje dolazi kod pacova tretiranih sa akrilamidom može, takođe, da se dovode u vezu i sa nivoom GSH (Pigeolet i sar., 1990). Naime, nizak nivo GSH, koji je uočen i u našem eksperimentu, nema dovoljan kapacitet da konjugacijom neutrališe

H₂O₂, zbog čega nivo H₂O₂ raste i deluje na SOD negativnom povratnom spregom. Istovremeno, pored dismutacije superoksida, SOD1 ima i peroksidaznu aktivnost za koju su Hodgson i Fridovich (1975) pokazali da inhibira dismutaznu i peroksidaznu aktivnost ovog enzima. Vodoni peroksid direktno inhibira aktivnost enzima SOD1 (Uchida i Kawakishi, 1994).

5.3.3. Efekat tretmana akrilamidom na transkripciju gena za antioksidativne enzime

Ekspresija gena za CAT u Rin-5F ćelijama tretiranim 10 mM akrilamidom nije pokazala značajnu razliku u odnosu na kontrolnu vrednost, sa izuzetkom tretmana od 3 h kada je došlo do značajnog porasta u transkripciji iRNK. Iako je regulacija ekspresije gena za CAT kompleksna, porast u transkripciji gena za CAT u našem eksperimentu može da se dovede u vezu sa povišenom vrednosti H₂O₂ i veoma intenzivnom katalaznom aktivnosti tokom tretmana od 1 h posle kojeg se pojavila potreba za pojačanom transkripcijom iRNK za ovaj enzim.

Tretman Rin-5F ćelija sa 10 mM akrilamidom u našem eksperimentu nije pokazao značajni porast u ekspresiji gena za SOD1 i SOD2, tokom kratkotrajnih tretmana. Međutim, tretmani od 12 i 24 h su doveli do signifikantnog skoka u transkripciji ovih gena. Transkripcija gena za SOD1 i SOD2 je strogo regulisana kao odgovor na različite intracelularne i ekstracelularne stimulse (Zelko i sar., 2002). Pokazano je da na nivo iRNK za SOD1 pozitivno utiču H₂O₂ (Yoo i sar., 1999) i NO[•] (Frank i sar., 2000), a citokini su se pokazali kao veoma dobri aktivatori transkripcije gena za SOD2 (Zelko i sar., 2002). U transkripciji oba gena, važanu ulogu ima regulacija pomoću transkripcionog faktora NF-κB (Zelko i sar., 2002; Grdović i sar., 2012). S obzirom na činjenicu da je NF-κB aktivator transkripcije gena za SOD1 (Rojo i sar., 2004) i SOD2 (Zelko i sar., 2002), a sam NF-κB se aktivira u prisustvu akrilamida (Liu i sar., 2015), može se pretpostaviti da NF-κB indukuje ekspresiju gena za SOD1 i SOD2 u β-ćelijama nakon dugotrajnog izlaganja akrilamidu.

5.3.4. Efekat tretmana akrilamidom na slobodne –SH grupe i redukovani GSH

Visok intracelularni sadržaj čini proteine veoma dostupnim za interakciju sa prisutnim ROS/RNS. Proteini reaguju sa 50-75% nastalih reaktivnih molekulskih vrsta (Davies i sar., 2005). Oksidativno oštećenje proteina ima vrlo značajne posledice *in vivo* kako samo po sebi, zbog remećenja funkcije receptora, enzima i transportnih proteina, tako i zbog mogućnosti da doprinese sekundarnom oštećenju drugih biomolekula. Inaktivacija enzima za reparaciju oštećenja na DNK ima važan efekat na dalju ćelijsku vijabilnost (Halliwell i Gutteridge, 2015). Sve amino kiseline reaguju sa ROS i RNS, ali je cistein najpodložniji ovoj reakciji (Stadtman i Berlett, 1997; Davies, 2005). Cistein poseduje tiolnu (-SH) funkcionalnu grupu, i zbog toga ima izuzetno važnu ulogu u unutarćelijskim oksido-redukcionim procesima.

Zbog visoke intracelularne koncentracije u fiziološkim uslovima, GSH lako stupa u reakciju sa H₂O₂ i O₂^{•-} što rezultuje oksidacijom GSH i nastankom GSSG molekula (Winterbourn i Metodiewa, 1994). U studiji Winterbourn i Metodiewa (1994) je pokazano da GSH direktno reaguje sa O₂^{•-} anjonom, što ima za rezultat pad u nivou redukovanog GSH. Teramoto i sar. (1995) su ukazali na negativnu korelaciju između koncentracije O₂^{•-} anjona i koncentracije unutarćelijskog GSH. Zbog toga je jedan od mogućih razloga pada u koncentraciji redukovanog

GSH u našem eksperimentu njegova direktna reakcija sa ROS nastalim usled tretmana akrilamidom.

Tretman Rin-5F ćelija sa 10 mM akrilamidom tokom različitih vremenskih intervala u eksperimentu ove teze je pokazao statistički značajan pad u nivou redukovanog GSH, tokom svih tretmana, osim tretmana od 0,5 h. Pad u nivou redukovanog GSH je imao dozno-zavisni manir završno sa tretmanom od 12 h koji pokazuje najnižu vrednost GSH u poređenju sa kontrolom. Kod tretmana od 24 h je došlo do blagog porasta u nivou GSH, međutim, ta vrednost je statistički značajno ispod kontrolnog nivoa. To je u skladu sa rezultatima studija Yousef i El-Demerdash (2006) i Catalgol i sar. (2009) koji su pokazali da akrilamid smanjuje nivo redukovanog GSH i time indirektno dovede do oksidativnog stresa i pojačane produkcije ROS.

Jedna od veoma značajnih osobina GSH je da reaguje sa različitim elektrofilnim supstancama, fiziološkim metabolitima (estrogen, melanin, prostaglandini i leukotrijeni) i ksenobioticima, sa kojima formira merkaptturnu kiselinu u reakciji koju katališe glutation S-transferaza (Fang i sar., 2002). Akrilamid kao α -, β -nezasićeni elektrofilni molekul reaguje sa ćelijskim nukleofilima koji imaju -SH, -NH ili -OH reaktivnu grupu. Zbog toga, akrilamid lako reaguje sa GSH i formira GSH-S-konjugate, što je početni korak u biotransformaciji nukleofila u merkaptturnu kiselinu, ali i reakcija koja smanjuje unutarćelijski nivo GSH (Fang i sar., 2002; Settels i sar., 2008).

Na pad u nivou slobodnog GSH u velikoj meri utiče i njegova konjugacija sa glicidamidom, metabolitom akrilamida, (Settels i sar., 2008). Pored toga što učestvuje u redukciji H_2O_2 , GSH se konjuguje sa NO^\cdot (Lushchak, 2014).

Veliki broj proteina sadrži cistein u manjoj ili većoj meri, pa pored GSH, u regulaciji metabolizma ROS, veoma važnu ulogu igraju i proteini (Di Simplicio i sar., 2003). Oksidacija -SH grupe cisteina je najčešća oksidativna modifikacija proteina. Proteini sa slobodnom -SH grupom u redukovanom obliku (P-SH) prisutniji od mešovityh disulfidnih molekulskih kompleksa kao što je glutation-proteinski kompleks (GSSP) (Rossi i sar., 1995). Međutim, u uslovima oksidativnog stresa, dolazi do značajnog pada u slobodnim proteinskim -SH grupama (Frijhoff i sar., 2015).

Rezultati ove teze su u saglasnosti sa tvrdnjom da se u uslovima oksidativnog stresa uočava pad u nivou slobodnih -SH grupa. Tretman sa 10 mM akrilamidom u Rin-5F ćelijama je doveo do pada u nivou slobodnih -SH grupa koji je imao statističku značajnost samo tokom tretmana u trajanju od 3 i 6 h. Dugotrajni tretman sa 10 mM akrilamida nije doveo do signifikantne promene u nivou slobodnih -SH grupa u Rin-5F ćelijama poređenju sa kontrolom.

Pored akrilamida i ROS, i NO^\cdot je biološki elektrofil koji stvara reverzibilne adukte sa sulfhidrilnim, tiolatnim (-SH) grupama na proteinima u procesu S-nitrozilacije (LoPachin i Gavin, 2012). NO^\cdot i akrilamid imaju sličan inhibitorski efekat na funkciju proteina pa se proteom osetljiv na NO^\cdot u velikoj meri preklapa sa proteomom osetljivim na akrilamid (LoPachin i sar., 2004; Barber i sar., 2007). Pošto je NO^\cdot signalni put karakterističan za gotovo sve tipove ćelija (Hess i sar., 2005), jasno je da će i akrilamid imati tiolatne akceptore u najvećem broju tkiva (Barber i sar., 2007). U fiziološkim uslovima, NO^\cdot i njegovi metaboliti reaguju sa različitim jedinjenjima koja poseduju redukovanu -SH grupu, i formiraju nestabilne komplekse (Heales i Bolaños, 2002). Rezultati ove teze ukazuju na povećanje koncentracije NO_2^- u Rin-5F ćelijama posle aplikacije akrilamida, što ukazuje na učešće NO^\cdot u toksičnom dejstvu akrilamida. S obzirom na to da NO^\cdot reaguje sa slobodnim tiolima, prekomerno stvaranje NO^\cdot može uticati na smanjenje koncentracije GSH u ovim eksperimentalnim uslovima. Rezultati ove disertacije upravo ukazuju na to, jer je tokom svih vremenskih intervala trajanja tretmana akrilamidom, u

Rin-5F ćelijama nivo NO_2^- bio statistički veoma značajno povišen u odnosu na kontrolu, a nivo intracelularnog GSH statistički značajno smanjen u odnosu na kontrolu. Tretman akrilamidom je i u testisima doveo i do povišenog nivoa NO^\cdot i pada u nivou GSH (Elghaffar i sar., 2015). Svi ovi rezultati ukazuju na to da snižavanje nivoa GSH nakon akrilamidnog tretmana ima ulogu u toksičnosti akrilamida (Lamy i sar., 2008).

Još jedan podatak koji govori u prilog padu u koncentraciji slobodnog redukovanog GSH i slobodnih $-\text{SH}$ grupa u proteinima posle akrilamidnog tretmana je da akrilamid preko aktivacije transkripcionog faktora $\text{NF-}\kappa\text{B}$, za koji je pokazano da u mikroglijalnim ćelijama BV-2 izaziva pojačanu ekspresiju gena za iNOS, dovodi i do povišenog nivoa NO^\cdot (Liu i sar., 2015). Povišeni NO^\cdot , zatim, dovodi do S-nitrozilacije, kako je već diskutovano (LoPachin i Gavin, 2012). Još jedan važan podatak koji je u vezi sa konjugacijom toksikanata sa intracelularnim GSH je da se odvija efikasnije kod juvenilnih u odnosu na adultne životinje (Allameh i sar., 1997).

5.3.5. Efekat tretmana akrilamidom na pojavu lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija je oksidativna degradacija polinezasićenih masnih kiselina i jedan je od najčešćih ishoda unutarćelijskih promena nastalih delovanjem slobodnih kiseoničnih radikala (Yin i sar., 2011). Ćelijska membrana predstavlja najosetljivije mesto za delovanje ROS jer su rezidue polinezasićenih masnih kiselina fosfolipida, koje su konstituenti ćelijske membrane, veoma podložne oksidaciji. Zbog visokog prisustva u svakoj ćeliji, polinezasićene masne kiseline su vrlo su pristupačne nastalim ROS. Kao što je već komentarisano, lipidna peroksidacija je lančani proces čiji krajnji produkt su, između ostalog, i MDA koji se smatraju primarnim biomarkerima lipidnog oštećenja od strane slobodnih radikala tokom oksidativnog stresa (Valko i sar., 2007). Za razliku od slobodnih radikala koji reaguju sa biomolekulom koji se nalazi u njihovoj neposrednoj blizini, svega nekoliko nanometara od mesta nastanka radikalskog molekula, aldehidi nastali od lipidnih peroksida lako difunduju kroz membranu i mogu kovalentno da modifikuju bilo koji protein u citoplazmi ili u nukleusu, daleko od mesta njihovog nastanka (Negre-Salvayre i sar., 2008).

U fiziološkim uslovima ili u uslovima niskog stepena lipidne peroksidacije (subtoksični uslovi), ćelije održavaju metaboličku homeostazu preko konstitutivnih antioksidativnih odbrambenih mehanizama kojim stimulišu ekspresiju i aktivnost antioksidativnih proteina i tako se prilagođavaju na stresni odgovor. Sa druge strane, u uslovima lipidne peroksidacije koja je srednjeg ili visokog stepena (toksični uslovi) stepen oksidativnog oštećenja prevazilazi reparacioni kapacitet ćelije koja tada podleže nekrozi ili apoptozi (Ayala i sar., 2014).

Povećana produkcija slobodnih radikala i H_2O_2 i porast u intenzitetu lipidne peroksidacije su karakteristični za životinje koje su izložene delovanju akrilamida (Awad i sar., 1998; Park i sar., 2002). Nivo MDA u Rin-5F ćelijama je imao značajan porast u poređenju sa kontrolom u tretmanima od 1, 12 i 24 h. Do sličnog nalaza o skoku u koncentraciji MDA kod oralno tretiranih pacova sa akrilamidom su došli i Yousef i El-Demerdash (2006), kao i Elghaffar i sar. (2015) koji su pokazali da tretman adultnih mužjaka pacova sa akrilamidom u dozama od 25 i 100 mg/kg tm pojačava lipidnu peroksidaciju u testisima. Do ovog nalaza, da raste nivo MDA u testisima pacova nakon akrilamidnog tretmana, su došli i Abd El-Halim i Mohamed (2012). U skladu sa time su i rezultati koji pokazuju povećanu koncentraciju MDA u različitim delovima mozga pacova intraperitonealno tretiranih sa akrilamidom, što je nalaz koji jasno ukazuje na pojačanu lipidnu peroksidaciju (Kopanska i sar., 2015). Istovremeno, i rezultati istraživanja Al-

Serwi i Ghoneim (2015) pokazuju da akrilamid statistički značajno povećava nivo MDA u poprečno prugastoj muskulaturi jezika pacova.

Jedan od razloga porasta MDA je značajan pad u nivou redukovanog GSH (Srivastava i sar., 1983). Značajno smanjenje nivoa GSH usled konjugacije sa akrilamidom je dokazano *in vivo* (Martensson i sar., 1990) i *in vitro* (Park i sar., 2002). Nivo MDA pokazuje statistički značajan porast u mozgu, plućima, bubrezima, jetri i testisima kod pacova tretiranih sa akrilamidom u poređenju sa kontrolom, uz istovremeni statistički značajni pad u nivou GSH (Alturfan i sar., 2012). I rezultati ove teze pokazuju da je tretman sa 10 mM akrilamidom u Rin-5F ćelijama doveo do statistički značajnog pada intracelularnog GSH. To je u saglasnosti sa studijama Younes i Siegers (1980) i Srivastava i sar. (1983), kod kojih je tretman pacova sa akrilamidom u dozama od 25, 75 i 100 mg/kg tm imao za rezultat smanjenje intracelularnog GSH i pojavu oksidativnog stresa u homogenatu jetre.

U uslovima niskog prisustva, intracelularni GSH nije u mogućnosti da kompenzuje oksidativne promene nastale delovanjem slobodnih radikala (Srivastava i sar., 1983). Takođe, deo apsorbovanog akrilamida se metaboliše oksigenacijom dvostruke veze pomoću enzima CYP2E1 do glicidamida. Budući da i glicidamid poseduje elektrofilnu reaktivnost, i on lako stupa u reakciju sa -SH grupom u GSH što izaziva još veći pad u koncentraciji ovog antioksidativnog molekula (Calleman i sar., 1990; Bergmark i sar., 1993). Ovim se otvara mogućnost za još intenzivniju lipidnu peroksidaciju pa akrilamid može da dovede do oksidativnog stresa kako direktnim delovanjem, tako i nakon metabolisanja u glicidamid pomoću CYP2E1 (LoPachin i sar., 2008).

Visok nivo NO[•] u Rin-5F ćelijama tretiranim akrilamidom u ovoj tezi i značajni skok u aktivnosti ukupne SOD prilikom tretmana od 6 h koji je najverovatnije posledica porasta u koncentraciji O₂⁻, mogu da dovedu do intenzivne produkcije ONOO⁻ za koji je poznato da ima ključnu ulogu u nastanku lipidne peroksidacije (Pacher i sar., 2007).

5.4. Efekat tretmana akrilamidom na aktivnost i ekspresiju CYP2E1 enzima

Pankreasne β-ćelije su metabolički veoma aktivne i pošto je endokrini pankreas bogato vaskularizovan, izložene su mnogim hemijskim supstancama iz krvi (Eberhard i Lammert, 2009). Kako je citohrom P450 sistem uključen u metabolizam niza ksenobiotika, ekspresija ove superfamilije enzima u β-ćelijama pankreasa ima velikog značaja u fiziološkim, ali i patološkim procesima u β-ćelijama (Lees Murdock i sar., 2004). Enzimi iz familije P450 se u najvećoj koncentraciji nalaze u tkivu jetre, međutim, evidentno je da se ekspimiraju i u mnogim ekstrahepatičnim tkivima, između ostalog, i u pankreasu gde je ekspresija CYP2E1 izoforme, kod pacova, inducibilna (Norton i sar., 1998). CYP2E1 je jedan od nekoliko enzima iz familije P450 za koje se zna da su odgovorni za metabolizam i bio-aktivaciju niza egzogenih supstanci, uključujući i akrilamid (Nixon i sar., 2014). Pored konjugacije sa GSH, drugi važan način metabolizma akrilamida je oksidativna transformacija do glicidamida u reakciji koju katališe CYP2E1 (Parzefall, 2008).

Tretman sa akrilamidom u dozi od 10 mM u istraživanju u okviru teze je pokazao da akrilamid ima značajan uticaj na ekspresiju gena za CYP2E1 u insulin-produkujućim Rin-5F ćelijama u poređenju sa kontrolom. Tretirane ćelije su odmah veoma intenzivno reagovala na akrilamidni tretman pa je već posle izloženosti od 0,5 h došlo do statistički veoma značajnog skoka u stepenu

transkripcije gena za CYP2E1. S obzirom na to da se enzim CYP2E1 veoma slabo eksprimira u β -ćelijama u fiziološkim uslovima, što su potvrdili i naši rezultati, jasno je da je ovaj veliki skok u transkripciji posmatranog gena direktna posledica tretmana i potrebe da se akrilamid eliminiše iz ćelije. To je u saglasnosti sa istraživanjem u kojem je uočen kvantitativni porast u iRNK za CYP2E1 u spermatoцитama tretiranim sa akrilamidom (Nixon i sar., 2014). Inicijalni skok u transkripciji gena za CYP2E1 kod tretiranih ćelija je održao visoku statističku značajnost i tokom tretmana od 1 h. Intenzitet transkripcije gena za –CYP2E1 (*cyp2e1*) se približio kontrolnoj vrednosti tokom tretmana od 3 i 6 h, dok kod tretmana od 12 i 24 h dolazi do značajnog pada u odnosu na kontrolu. To je u skladu sa dozno-zavisnom redukcijom OD_{CYP2E1} u ćelijama Langerhansovih ostrvaca nakon subhroničnog tretmana sa akrilamidom u dozama od 25 i 50 mg/kg tm.

Nalaz ove disertacije da akrilamidni tretman dovodi do koncentracijski-zavisnog pada u transkripciji *cyp2e1* u Rin-5F ćelijama, kao i do pada u optičkoj gustini ćelija imunopozitivnih na CYP2E1 u endokrinom pankreasu je u saglasnosti sa literaturnim podacima koji pokazuju da akrilamid smanjuje ekspresiju i aktivnost CYP2E1 enzima (Tareke i sar., 2002; El-Bohi i sar., 2011). Tretman akrilamidom signifikantno smanjuje nivo CYP2E1 proteina u ćelijama jetre u dozno-zavisnom maniru i redukuje nivo iRNK za CYP2E1 enzim (El-Bohi i sar., 2011). Naši rezultati su u saglasnosti i sa nalazom da aktivnost CYP2E1 enzima u *in vitro* uslovima opada pri koncentracijama akrilamida ≥ 10 mM (Awad i sar., 1998) budući da je tretman Rin-5F ćelija u kojima je merena transkripcija ovog enzima u ovoj tezi iznosio 10 mM.

Do smanjene ekspresije CYP2E1 proteina i iRNK u ovoj tezi dolazi, najverovatnije, zbog citotoksičnosti novonastalog glicidamida. Tokom tretmana akrilamidom u trajanju od 0,5 i 1 h, došlo je do porasta transkripcije *cyp2e1* u Rin-5F ćelijama što bi moglo da dovede do naglog porasta koncentracije glicidamida. Za molekule glicidamida je poznato da poseduju i do 40% viši afinitet za vezivanje za molekul DNK od molekula akrilamida (Dearfield i sar., 1995). El-Bohi i sar. (2011) su *in vivo* eksperimentom na pacovima koji su peroralno primali akrilamid u dozama od 50 i 100 mg/kg tm pokazali značajno uvećanje broja jednolančanih prekida na molekulu DNK u hepatocitima. Ovakvo delovanje glicidamida može direktno da naruši strukturu DNK, što ima za posledicu pad u transkripciji i sintezi proteina (Dearfield i sar., 1995). U tom smislu, smanjenje količine CYP2E1 enzima može da bude posledica direktne citotoksičnosti glicidamida, koja inhibicijom transkripcije *cyp2e1* u β -ćelijama pankreasa, izaziva redukciju nivoa njegove iRNK i time izaziva pad nivoa CYP2E1 proteina.

5.5. Efekat tretmana akrilamidom na transkripciju gena za Bcl-2 i Bax

Oksidativni stres nije jedini uzrok ćelijske smrti. Pokazano je da pojačano prisustvo citokina IL-1 β u β -ćelijama, kao posledica delovanja akrilamida (Alturfan i sar., 2012), može da rezultuje pojavom ćelijske smrti po tipu apoptoze (Grunnet i sar., 2009) ili nekroze (Fehsel i sar., 2003; Steer i sar., 2006; Collier i sar., 2006). Međutim, apoptoza nije glavni mehanizam smrti β -ćelija koji nastupa kao odgovor na pro-inflamatorne citokine (Fehsel i sar., 2003; Steer i sar., 2006; Collier i sar., 2006). Naime, pro-inflamatorni citokini povećavaju koncentraciju prisutnog iNOS enzima čime dovode do pojačane sinteze i nakupljanja NO $^{\cdot}$ u β -ćelijama (Corbett i sar., 1992), a nastali NO $^{\cdot}$ inhibira formiranje apoptotskog kompleksa neophodnog za aktivaciju kaspaza, koje su pokretači apoptoze (Melino i sar., 2000). Kao što je prethodno diskutovano, rezultati ove disertacije su pokazali dozno-zavisni porast u ekspresiji iNOS u Langerhansovim ostrvcima

životinja tretiranih sa akrilamidom, kao i veoma visok nivo NO_2^- , anjona koji nastaje daljom oksidacijom NO^\cdot u Rin-5F ćelijama nakon aplikacije akrilamida.

Jedan od bitnih parametara koji ukazuje na to u kojoj meri je ćelija osetljiva na apoptozu je odnos između Bax i Bcl-2 proteina (Mehmeti i sar., 2011). Bcl-2 je familija citoplazmatskih proteina koji regulišu apoptozu. Dve glavne grupe ovih proteina su Bcl-2 i Bax, i imaju suprotne funkcije. Bcl-2 je antiapoptotski protein, dok Bax ima proapoptotsku funkciju (Mehmeti i sar., 2011). Za ćeliju koja je u procesu apoptoze je karakteristično da odnos između pro- i antiapoptotskih proteina iz Bcl-2 familije (Bax/Bcl-2 odnos), raste (Kikuchi i sar., 2002). Rezultati ove teze su pokazali značajan porast u transkripciji gena za Bax u svim tačkama tretmana u poređenju sa kontrolom, međutim, tretman Rin-5F ćelija sa akrilamidom je doveo i do značajnog porasta u ekspresiji gena za Bcl-2 tokom tretmana od 0,5, 1 i 3 h. Zbog toga, odnos Bax/Bcl-2 u istraživanju u okviru disertacije nije pokazao gotovo nikakvu razliku u odnosu na kontrolnu vrednost tokom tretmana od 0,5, 1 i 3 h. Ovi rezultati idu u prilog pretpostavci da apoptoza nije dominantan tip ćelijske smrti β -ćelija prilikom kratkotrajnog akrilamidnog tretmana. Sa druge strane, tretman sa akrilamidom u trajanju od 12 i 24 h je doveo do skoka u vrednosti odnosa Bax/Bcl-2 u Rin-5F ćelijskoj liniji i mogao bi da ukaže na potencijalnu pojavu apoptoze u β -ćelijama nakon duže izloženosti ćelija dejstvu akrilamida. Tako da bi i u našim tretmanima pad u numeričkoj gustini β -ćelija usled dejstva akrilamida, koji je pokazan u *in vivo* eksperimentu mogao biti uzrokovan apoptozom ovih ćelija.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja uticaja akrilamida u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm na endokrini pankreas juvenilnih mužjaka laboratorijskih pacova soja Wistar, u skladu sa postavljenim ciljevima, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. subhronični peroralni tretman nije izazvao promene u histološkoj građi endokrinog pankreasa, kao ni u broju i dijametru Langerhansovih ostrvaca tretiranih pacova;
2. stereološka analiza α - i β -ćelija Langerhansovih ostrvaca tretiranih pacova je ukazala na značajano dozno-zavisno smanjenje vrednosti $Nv\beta$ i $Sv\beta$, dok vrednosti $Vv\beta$, $Vvn\beta$, $Vvc\beta$ i $N\beta/C\beta$ nisu značajno promenjene. Tretman nižom dozom akrilamida statistički značajano povećava vrednost $Nv\alpha$, dok se kod životinja tretiranih višom dozom, vrednost ovog parametra ne razlikuje značajno u poređenju sa kontrolom. Vrednosti $Vv\alpha$, $Sv\alpha$, $Vvn\alpha$, $Vvc\alpha$, $N\alpha/C\alpha$ se ne razlikuju značajno od vrednosti ovih parametara kod kontrolnih životinja, bez obzira na korišćenu dozu;
3. evaluacijom ekspresije insulina, glukagona, iNOS, CAT, SOD1, SOD2 i CYP2E1 u Langerhansovim ostrvcima uočeno je značajno, kao i dozno-zavisno smanjenje vrednosti optičke gustine ćelija imunopozitivnih na insulin i CYP2E1. Ista analiza je pokazala signifikantno dozno-zavisno povećanje vrednosti optičke gustine imunopozitivnih ćelija na glukagon i iNOS, dok vrednost optičke gustine ćelija imunopozitivnih na enzime CAT, SOD1 i SOD2 nije značajno promenjena;
4. nivo glukoze u serumu nije značajno promenjen kod tretiranih pacova.

Na osnovu rezultata dobijenih nakon tretmana Rin-5F ćelijske linije akrilamidom, u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, moguće je izvesti sledeće zaključke:

1. akrilamid smanjuje vijabilnost Rin-5F ćelijske linije insulinoma β -ćelija u koncentracijski-zavisnom maniru;
2. tretman sa 10 mM akrilamidom tokom rastućih vremenskih intervala pokazuje da akrilamid u Rin-5F ćelijskoj liniji značajno povećava nivo MDA nakon tretmana u trajanju od 1, 12 i 24 h, kao i nivo NO_2^- u svim tačkama tretmana (0,5, 1, 3, 6, 12, 24 h). Akrilamid u koncentraciji od 10 mM signifikantno smanjuje nivo redukovanog GSH nakon tretmana od 1, 3, 6, 12 i 24 h, kao i nivo slobodnih -SH grupa nakon tretmana od 3 i 6 h. Isti tretman značajno pojačava aktivnost CAT nakon tretmana od 1 h, međutim, tretman u trajanju od 12 h značajno smanjuje aktivnost ovog enzima. Akrilamidni tretman signifikantno smanjuje aktivnost SOD nakon 1, 12 i 24 h, dok tretman od 6 h značajno pojačava aktivnost enzima SOD;
3. akrilamid u koncentraciji od 10 mM tokom različitih vremenskih intervala utiče na promene u relativnoj ekspresiji gena za insulin, iNOS, SOD1, SOD2, CAT, CYP2E1, Bax i Bcl-2. Pomenuti tretman signifikantno povećava transkripciju gena za:
 - a. iNOS i Bax u svim tačkama tretmana (0,5, 1, 3, 6, 12, 24 h),
 - b. SOD1 i SOD2 nakon tretmana od 12 i 24 h,
 - c. CAT nakon tretmana od 3 h,
 - d. CYP2E1 nakon tretmana od 0,5 i 1 h,
 - e. Bcl-2 nakon tretmana od 0,5, 1 i 3 h.

Tretman 10 mM akrilamidom značajno smanjuje relativnu ekspresiju gena za CYP2E1 nakon tretmana u trajanju od 12 i 24 h, dok ne dovodi do značajne promene u relativnoj ekspresiji gena za insulin.

Opšti zaključak

Akrilamid je toksična supstanca koja pokazuje jasan efekat kako na mikrostrukturne karakteristike endokrinog pankreasa na nivou α - i β -ćelija, tako i na ekspresiju insulina, glukagona, iNOS, CAT, SOD1, SOD2 i CYP2E1 u ćelijama Langerhansovih ostrvaca pankreasa. Pored efekta koji je pokazan na animalnom modelu, *in vitro* analiza tretmana akrilamidom je pokazala citotoksični efekat ove supstance na Rin-5F ćelijsku liniju insulinoma β -ćelija. U disertaciji je pokazano da akrilamid pomera redoks-status Rin-5F ćelija u smeru oksidacije. Rezultati teze pokazuju da dolazi do promene u transkripciji gena za iNOS, SOD1, SOD2, CAT, CYP2E1, Bax i Bcl-2 u Rin-5F ćelijama, kao odgovor na delovanje ovog toksičnog monomera. Rezultati dobijeni u tezi ukazuju da je endokrini pankreas, nedvosmisleno, jedno od ciljnih tkiva akrilamida, i da je, zbog toga, veoma poželjno da se unos akrilamida u organizam svede na najmanju moguću meru.

7. LITERATURA

- Abd El-Halim SS, Mohamed MM (2012) Garlic powder attenuates acrylamide-induced oxidative damage in multiple organs in rat. *JASR*. 8: 168-173.
- Abelli L, Ferri GL, Astolfi M, Conte B, Geppetti P, Parlani M, Dahl D, Polak JM, Maggi CA (1991) Acrylamide-induced visceral neuropathy: evidence for the involvement of capsaicin-sensitive nerves of the rat urinary bladder. *Neuroscience*. 41(1): 311-321.
- Abunasef SK, Amin HA, Abdel-Hamid GA (2014) A histological and immunohistochemical study of beta cells in streptozotocin diabetic rats treated with caffeine. *Folia Histochem Cytobiol*. 52(1): 42-50.
- Adler I, Ingwersen I, Kliesch U, el Tarras A (1988) Clastogenic effects of acrylamide in mouse bone marrow cells. *Mutat Res*. 206(3): 379-385.
- Adler ID, Baumgartner A, Gonda H, Friedman MA (2000) 1-Amino-benzotriazole inhibits acrylamide-induced dominant lethal effects in spermatids of male mice. *Mutagenesis*. 15(2): 133-136.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 105: 121-126.
- Aktan F (2004) iNOS mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 75(6): 639-653.
- Al-Serwi RH, Ghoneim FM (2015) The impact of vitamin E against acrylamide induced toxicity on skeletal muscles of adult male albino rat tongue: Light and electron microscopic study. *JMAU*. 3(3): 137-147.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 357(Pt 3): 593-615.
- Allam A, El-Ghareeb AA, Abdul-Hamid M, Baikry A, Sabri MI (2011) Prenatal and perinatal acrylamide disrupts the development of cerebellum in rat: biochemical and morphological studies. *Toxicol Ind Health*. 27(4): 291-306.
- Allameh A, Vansoun EY, Zarghi A (1997) Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mech. Ageing Dev*. 95(1- 2), 71-79.
- Alonso LC, Yokoe T, Zhang P, Scott DK, Kim SK, O'Donnell CP, Garcia-Ocaña A (2007) Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication. *Diabetes*. 1792-1801.
- Alturfan EI, Beceren A, Şehirli AÖ, Demiralp ZE, Şener G, Omurtag GZ (2012) Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Turk J Vet Anim Sci*. 36(4): 438-445.
- Amrein TM, Bachmann S, Noti A, Biedermann M, Barbosa MF, Biedermann-Brem S, Grob K, Keiser A, Realini P, Escher F, Amadó R (2003) Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: a comparison of cultivars and farming systems. *J Agric Food Chem*. 51(18): 5556-5560.
- Anđelković Z, Somer Lj, Perović M, Avramović V, Milenkova Lj, Kostovska N, Petrović A (2001) Histološka građa organa. *Bonafides*, Niš, Srbija.
- Arafat HA, Katakam AK, Chipitsyna G, Gong Q, Vancha AR, Gabbeta J, Dafoe DC (2007) Osteopontin protects the islets and beta-cells from interleukin-1 beta-mediated cytotoxicity through negative feedback regulation of nitric oxide. *Endocrinology*. 148(2): 575-584.
- Ashkenazi A (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2(6): 420-430.
- Awad ME, Abdel-Rahman MS, Hassan SA (1998) Acrylamide toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. In Vitro*. 12: 699-704
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014: 360438.
- Aydin B (2017) Effects of argan oil on the mitochondrial function, antioxidant system and the activity of NADPH-generating enzymes in acrylamide treated rat brain. *Biomed Pharmacother*. 87: 476-481.
- Bansal P, Wang Q (2008) Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295(4): E751-761.
- Barber DS, Hunt JR, Ehrich MF, Lehning EJ, LoPachin RM (2001) Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing. *Neurotoxicology*. 22(3): 341-353.

- Barber DS, Stevens S, LoPachin RM (2007) Proteomic analysis of rat striatal synaptosomes during acrylamide intoxication at a low dose rate. *Toxicol Sci.* 100(1): 156-167.
- Barros LF, Hermosilla T, Castro J (2001) Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 130(3): 401-409.
- Baum M, Fauth E, Fritzen S, Herrmann A, Mertes P, Merz K, Rudolphi M, Zankl H, Eisenbrand G (2005) Acrylamide and glycidamide: genotoxic effect in V79-cells and human blood. *Mutat Res.* 580(1-2): 61-69.
- Bedoya FJ, Salguero-Aranda C, Cahuana GM, Tapia-Limonchi R, Soria B, Tejedo JR (2012) Regulation of pancreatic beta-cell survival by nitric oxide: clinical relevance. *Islets.* 4(2): 108-118.
- Belin VD, Mabley JG, James RF, Swift SM, Clayton HA, Titheradge MA, Green IC (1999) Glucagon decreases cytokine induction of nitric oxide synthase and action on insulin secretion in RIN5F cells and rat and human islets of Langerhans. *Cytokine.* 11(8): 585-592.
- Benninger RK, Zhang M, Head WS, Satin LS, Piston DW (2008) Gap junction coupling and calcium waves in the pancreatic islets. *Biophys J.* 95(11): 5048-5061.
- Bergmark E (1997) Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chem Res Toxicol.* 10(1): 78-84.
- Bergmark E, Calleman CJ, Costa LG (1991) Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 111(2): 352-363.
- Bergmark E, Calleman CJ, Fengsheng HE, Costa LC (1993) Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 120(1): 45- 54.
- Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J (2000) Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol.* 190(2): 117-125.
- Biedermann M, Grob K (2003) Model studies on acrylamide formation in potato, wheat flour and corn starch, ways to reduce acrylamide contents in bakery ware. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene.* 94: 406-422.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidative defence. *World Allergy Organ J.* 5(1): 9-19.
- Boettcher MI, Bolt HM, Drexler H, Angerer J (2006) Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Arch Toxicol.* 80(2): 55-61.
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2(10): 907-916.
- Bologna LS, Andrawes FF, Barvenik FW, Lentz RD, Sojka RE (1999) Analysis of residual acrylamide in field crops 37(7): 240-244.
- Bonner-Weir S, Trent DF, Weir GC (1983) Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *J Clin Invest.* 71(6): 1544-1553.
- Bonner-Weir S, Weir GC (2005) New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol.* 23(7): 857-861.
- Bortner CD, Cidlowski JA (1998) A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 56(12): 1549-1559.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Brat DJ, Brimijion S (1993) Acrylamide and glycidamide impair neurite outgrowth in differentiating N1E.115 neuroblastoma without disturbing rapid bi-directional transport of organelles observed by video microscopy. *J Neurochem.* 60(6): 2145-2152.
- Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu YJ, Mulvaney-Musa J, Schermerhorn T, Straub SG, Yajima H, Sharp GW (2002) Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes.* 51(1): S83-90.
- Bray RC, Cockle SA, Fielden EM, Roberts PB, Rotillio G, Calabrese L (1974) Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem J.* 139(1): 43-48.
- Brelje TC, Parsons JA, Sorenson RL (1994) Regulation of islet beta-cell proliferation by prolactin in rat islets. *Diabetes.* 43(2): 263-273.
- Bresson D, Togher L, Rodrigo E, Chen Y, Bluestone JA, Herold KC, von Herrath M (2006) Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. *J Clin Invest.* 116(5): 1371-1381.
- Briant L, Salehi A, Vergari E, Zhang Q, Rorsman P (2016) Glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Ups J Med Sci.* 121(2): 113-119.

- Brunner T, Mueller C (2003) Apoptosis in disease: about shortage and excess. *Essays Biochem.* 39: 119-130.
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310.
- Buetler TM, Eaton DL (1992) Glutathione S-transferases: Amino acid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 10(2): 181-203.
- Buettner GR (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 300(2): 535-543.
- Bulteau AL, Pianamente S, Jornea L, Dur A, Lesuisse E, Camadro JM, Auchère F (2012) Changes in mitochondrial glutathione levels and protein thiol oxidation in $\Delta yfh1$ yeast cells and the lymphoblasts of patients with Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta.* 1822(2): 212-225.
- Burek JD, Albee RR, Beyer JE, Bell TJ, Carreon RM, Morden DC, Wade CE, Hermann EA, Gorzinski SJ (1980) Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery. *J Environ Pathol Toxicol.* 4(5-6): 157-182.
- Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, Butler PC (2010) Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia.* 53(10): 2167-2176.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* 52(1): 102-110.
- Butterfield DA, Sultana R (2011) Methionine-35 of $A\beta(1-42)$: Importance for oxidative stress in Alzheimer disease. *J Amino Acids.* 2011: 198430.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A (2006) The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(7): 2334-2339.
- Caicedo A (2013) Paracrine and autocrine interactions in the human islet: more than meets the eye. *Semin Cell Dev Biol.* 24(1): 11-21.
- Calabrese V, Scapagnini G, Giuffrida Stella AM, Bates TE, Clark JB (2001) Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res.* 26(6): 739-764.
- Calleman CJ (1996) The metabolism and pharmacokinetics of acrylamide: Implications for mechanisms of toxicity and human risk. *Drug Metab Rev.* 28(4): 527-590.
- Calleman CJ, Bergmark E, Costa LG (1990) Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation. *Chem Res Toxicol.* 3(5): 406-412.
- Calleman CJ, Stern LG, Bergmark E, Costa LG (1992) Linear versus nonlinear models for hemoglobin adduct formation by acrylamide and its metabolite glycidamide: implications for risk estimation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1(5): 361-368.
- Cao J, Liu Y, Jia L, Jiang LP, Geng CY, Yao XF, Kong Y, Jiang BN, Zhong LF (2008) Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging. *J Agric Food Chem.* 56(24): 12059-12063.
- Castle L (1993) Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polyacrylamide gel. *J Agric Food Chem.* 41(8): 1261-1263.
- Catalgol B, Ozhan G, Alpertunga B (2009) Acrylamide-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Hum Exp Toxicol.* 28(10): 611-617.
- Cejvan K, Coy DH, Efendic S (2003) Intra-islet somatostatin regulates glucagon release via type 2 somatostatin receptors in rats. *Diabetes.* 52(5): 1176-1181.
- Cerf ME (2013) Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4: 37.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR (2005) *Biochemistry.* Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Chance B, Seis H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59(3): 527-605.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 29(3-4): 323-333.
- Chapin RE, Fail PA, George JD, Grizzle TB, Heindel JJ, Harry GJ, Collins BJ, Teague J (1995) The reproductive and neural toxicities of acrylamide and three analogues in Swiss mice, evaluated using continuous breeding protocol. *Fundam Appl Toxicol.* 27(1): 9-24.

- Chaudhry MQ, Cotterill J, Watkins R, Price N (2006) The potential of molecular modeling for the prediction of toxicity of compounds generated during heat treatment of foods. In: *Acrylamide and Other Hazardous Compounds in Heat-Treated Foods*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 61(2): 192-208.
- Chen EP, Bittner HB, Davis RD, Van Trigt P, Folz RJ (1998) Physiologic effects of extracellular superoxide dismutase ransgene overexpression on myocardial function after ischemia and reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 115(2): 450-458.
- Chen T, Gao J, Xiang P, Chen Y, Ji J, Xie P, Wu H, Xiao W, Wei Y, Wang S, Lan L, Ji H, Yan T (2015) Protective effect of platycodin D on liver injury in alloxan-induced diabetic mice via regulation of Treg/Th17 balance. *Int Immunopharmacol.* 26(2): 338-348.
- Cheng SB, Liu HT, Chen SY, Lin PT, Lai CY, Huang YC (2017) Changes of oxidative stress, glutathione, and its dependent antioxidant enzyme activities in patients with hepatocellular carcinoma before and after tumor resection. *PLoS One.* 12(1): e0170016.
- Chung CH, Hao E, Piran R, Keinan E, Levine F (2010) Pancreatic beta-cell neogenesis by direct conversion from mature alpha-cells. *Stem Cells.* 28(9): 1630-1638.
- Chung CH, Levine F (2010) Adult pancreatic alpha-cells: a new source of cells for beta-cell regeneration. *Rev Diabet Stud.* 7(2): 124-131.
- Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR, Tumer RC (1988) Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res.* 9(4): 151-159.
- Claus A, Weisz GM, Schieber A, Carle R (2006) Pyrolytic acrylamide formation from purified wheat gluten and gluten-supplemented wheat bread rolls. *Mol Nutr Food Res.* 50(1): 87-93.
- Cnop M, Hughes SJ, Igoillo-Esteve M, Hoppa MB, Sayyed F, van de Laar L, Gunter JH, de Koning EJ, Walls GV, Gray DW, Johnson PR, Hansen BC, Morris JF, Pipeleers-Marichal M, Cnop I, Clark A (2010) The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modeling of lipofuscin accumulation. *Diabetologia.* 53(2): 321-330.
- Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL (2005) Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes.* 54 Suppl 2: S97-107.
- Collier JJ, Fueger PT, Hohmeier HE, Newgard CB (2006) Pro- and antiapoptotic proteins regulate apoptosis but do not protect against cytokine-mediated cytotoxicity in rat islets and beta-cell lines- *Diabetes.* 55(5): 1398-1406.
- Collombat P, Hecksher-Sørensen J, Serup P, Mansouri A (2006) Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mech Dev.* 123(7): 501-512.
- Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster JR Jr, McDaniel ML (1993) Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(5): 1731-1735.
- Corbett JA, Wang JL, Hughes JH, Wolf BA, Sweetland MA, Lancaster JR Jr, McDaniel ML (1992) Nitric oxide and cyclic GMP formation induced by interleukin 1beta in islets of Langerhans. Evidence for an effector role of nitric oxide in islet dysfunction. *Biochem J.* 287:229-35.
- Costa LG, Deng H, Calleman CJ, Bergmark E (1995) Evaluation of the neurotoxicity of glycidamide, an epoxide metabolite of acrylamide: behavioral, neurochemical and morphological studies. *Toxicology.* 98(1-3): 151-161.
- Creagh EM (2014) Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signaling pathways. *Trends Immunol.* 35(12): 631-640.
- Crofton KM, Padilla S, Tilson HA, Anthony DC, Raymer JH, MacPhail RC (1996) The impact of dose-rate on the neurotoxicity of acrylamide: the interaction of administered dose, target tissue concentrations, tissue damage, and functional effects. *Toxicol Appl Pharmacol.* 139(1): 163-176.
- Cvetkovic T, Vlahovic P, Pavlovic D, Kocic G, Jevtovic T, Djordjevic VB (1998) Low catalase activity in rats with ureteral ligation: relation to lipid peroxidation. *Exp Nephrol.* 6:74-77.

- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 52(4): 601-623.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 329(1-2): 23-38.
- Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2005) Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 24(1): 55-99.
- Darville MI, Eizirik DL (1998) Regulation by cytokines of the inducible nitric oxide synthase promoter in insulin-producing cells. *Diabetologia.* 41:1101-1108.
- Davies MJ (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta.* 1703(2): 93-109.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324(Pt 1): 1-18.
- Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Sega GA, Brusick DJ (1995) Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat Res.* 330(1-2): 71-99.
- Denicola A, Radi R (2005) Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology.* 208:273–288.
- Di Simplicio P, Franconi F, Frosali S, Di Giuseppe D (2003) Thiolation and nitrosation of cysteins in biological fluids and cells. *Amino Acids.* 25(3-4): 323-339.
- Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr (1997) Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med.* 337(6): 408-416.
- Doerge DR, Young JF, McDaniel LP, Twaddle NC, Chruchwell MI (2005) Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fisher 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 208(3): 199-209.
- Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature.* 429(6987): 41-46.
- Đorđević D, Nikolić J, Stefanović V (1998) Ethanol interactions with other cytochrome P450 substrates including drugs, xenobiotics, and carcinogens. *Pathol Biol (Paris).* 46(10): 760-770.
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82(1): 47-95.
- Dunai Z, Bauer PI, Mihalik R (2011) Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects. *Pathol Oncol Res.* 17(4): 791-800.
- Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P (2009) Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 11(13): 1050-1062.
- Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TR, Lalljie SP, Müller DJ, Olin S, Petersen BJ, Schlatter J, Scholz G, Scimeca JA, Slimani N, Törnqvist M, Tuijelaars S, Verger P (2005) Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem Toxicol.* 43(3): 365-410.
- Eberhard D, Lammert E (2009) The pancreatic beta-cell in the islet and organ community. *Curr Opin Genet Dev.* 19(5): 469-475.
- Eckersten D, Henningsson R (2012) Nitric oxide (NO) – production and regulation of insulin secretion in islets of freely fed and fasted mice. *Regul Pept.* 174(1-3): 32-37.
- Eizirik DL, Pipeleers DG, Ling Z, Welsh N, Hellertröm C, Andersson A (1994) Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(20): 9253-9256.
- El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, Young AJ (2004) Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys.* 430(1): 37-48.
- El-Bohi KM, Moustafa GG, El sharkawi NI, Sabik LME (2011) Acrylamide-induced genotoxic, biochemical and pathological perturbations in male rats liver. *J Am Sci.* 7(1): 1092-1096.
- El-Sayyad HI, El-Gammal HL, Habak LA, Abdel-Galil HM, Fernando A, Gaur RL, Ouhtit A (2011) Structural and ultrastructural evidence of neurotoxic effects of fried potato chips on rat postnatal development. *Nutrition.* 27(10): 1066-1075.
- Elayat AA, El-Naggar MM, Tahir M (1995) An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J Anat.* 186(3): 629-637.
- Elghaffar SKA, Fiedan IO, Ahmed EA, Omar HEDM (2015) Acrylamide induced testicular toxicity in rats: protective effect of garlic oil. *Biomarkers J.* 2(1): 5.

- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82(1): 70-77.
- Elmhiri G, Barella LF, Vieau D, Camous S, Mathias PC, Abdennebi- Najar L (2014) Acute exposure to a precursor of advanced glycation end products induces a dual effect on the rat pancreatic islet function. *Int J Endocrinol.* 2014:378284.
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4): 495-516.
- Elroy-Stein O, Bernstein Y, Groner Y (1986) Overproduction of human Cu-Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *EMBO J.* 5(3): 615-622.
- Environmental Protection Agency (EPA) (2010) Toxicological review of acrylamide. In support of summary information on the integrated risk information systems (IRIS). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- EU Commission (1998) Council directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*, L330, 32-54.
- Exton JH (1987) Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. *Diabetes Metab Rev.* 3(1): 163-183.
- Fabricio G, Ananda M, Chango A, De Freitas Mathias PC (2016) Environmental contaminants and pancreatic beta-cells. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 8(3): 257-263.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 148(7): 2207-2216.
- Fang YZ, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 18(10): 872-879.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization, World Health Organization) (2002) Consultation on the Health Implication of Acrylamide in Food. Geneva, Switzerland. Available from: www.who.int/fsf.
- Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Kröncke KD (2003) Necrosis is the predominant type of islet cell death during development of insulin-dependent diabetes mellitus in BB rats. *Lab Invest.* 83(4): 549-559.
- Fennell TR, Friedman MA (2005) Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Adv Exp Med Biol.* 561: 109-116.
- Fennell TR, Sumner SC, Snyder RW, Burgess J, Spicer R, Bridson WE, Friedman MA (2005) Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol Sci.* 85(1): 447-459.
- Ferguson SA, Garey J, Smith ME, Twaddle NC, Doerge DR, Paule MG (2010) Prewaning behaviors, developmental landmarks, and acrylamide and glycidamide levels after pre- and postnatal acrylamide treatment in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 32(3): 373-382.
- Filipović DM, Reeves WB (1997) Hydrogen peroxide activates glibenclamide-sensitive K⁺ channels in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol.* 272(2 Pt 1): C737-743.
- Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S (1995) Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes.* 44(3): 249-256.
- Fohgelberg P, Rosén J, Hellenäs KE, Abramsson-Zetterberg L (2005) The acrylamide intake via some common baby food for children in Sweden during their first year of life – an improved method for analysis of acrylamide. *Food Chem Toxicol.* 43(6): 951-959.
- Franco R, Cidlowski JA (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ.* 16(10): 1303-1314.
- Frank S, Kämpfer H, Podda M, Kaufmann R, Pfeilschifter J (2000) Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem J.* 346(Pt 3): 719-728.
- Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG (2009) Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener.* 4:47.
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64: 97-112.
- Friedman M (1996) Food browning and its prevention: an overview. *J Agric Food Chem.* 44(3): 631-653.
- Friedman M (2003) Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem.* 51(16): 4504-4526.
- Friedman M, Levin CE (2008) Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *J Agric Food Chem.* 56(15): 6113-6140.

- Friedman MA, Duak LH, Stedham MA (1995) A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam Appl Toxicol.* 27(1): 95-105.
- Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress (2015) *Antioxid Redox Signal.* 23(14):1144-1170.
- Fu Z, Gilbert ER, Liu D (2013) Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 9(1): 25-53.
- Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide Dismutases: Role i redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 15(6): 1583-1606.
- Gamboa da Costa G, Churchwell MI, Hamilton LP, Von Tungeln LS, Beland FA, Marques MM, Doerge DR (2003) DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem Res Toxicol.* 16(10): 1328-1337.
- García Martínez P, Winston GW, Metash-Dickey C, O'Hara SCM, Livingstone DR (1995) Nitrofurantoin-stimulated reactive oxygen species production and genotoxicity in digestive gland microsomes and cytosol of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Toxicol Appl Pharma.* 131: 332-341.
- Garcia-Ocaña A, Takane KK, Syed MA, Philbrick WM, Vasavada RC, Stewart AF (2000) Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia. *J Biol Chem.* 275(2): 1226-1232.
- Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO (1954) Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science.* 119(3097): 623-626.
- Ghanayem BI, Witt KL, Kissling GE, Tice RR, Recio L (2005) Absence of acrylamide-induced genotoxicity in CAP2E1-null mice. Evidence consistent with a glycidamide-mediated effect. *Mutat Res.* 578(1-2): 284-297.
- Ghorbel I, Elwej A, Fendri N, Minf H, Jamoussi K, Boudawara T, Kamon NG, Zeghal N (2017) Olive oil abrogates acrylamide induced nephrotoxicity by modulating biochemical and histological changes in rats. *Renal Failure.* 39(1): 236-245.
- Ghorbel I, Maktouf S, Fendri N, Jamoussi K, Chaabouni SE, Boudawara T, Zeghal N (2016) Co-exposure to aluminium and acrylamide disturbs expression of metallothionein, proinflammatory cytokines and induces genotoxicity: biochemical and histopathological changes in the kidney of adult rats. *Environ Toxicol.* 31(9): 1044-1058.
- Ghorbel I, Maktouf S, Kallel C, Ellouze Chaabouni S, Boudawara T, Zeghal N (2015) Disruption of erythrocyte antioxidant defence system, hematological parameters, induction of pro-inflammatory cytokines and DNA damage in liver of co-exposed rats to aluminium and acrylamide. *Chem Biol Interact.* 236: 31-40.
- Ghosh A, Kanthasamy A, Joseph J, Anantharam V, Srivastava P, Dranka BP, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG (2012) Anti-inflammatory and neuroprotective effects of an orally active apocynin derivative in pre-clinical models of Parkinson-s disease. *J Neuroinflammation.* 9: 241.
- Girma KB, Lorenz V, Blaurock S, Edelmann FT (2005) Coordination Chemistry of Acrylamide: 1. Cobalt(II) Chloride Complexes with Acrylamide-Synthesis and Crystal Structures. *Z Anorg Allg Chem.* 630(8): 1419-1422.
- Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I (2004) S-Glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med.* 8:201–12.
- Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP (2004) The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blod flow regulation. *Free Radic Biol Med.* 36(6): 707-717.
- Gomberg M (1900) An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *J Am Chem Soc.* 22:757–771.
- Gorecki M, Beck Y, Hartman JR, Fischer M, Weiss L, Tochner Z, Slavin S, Nimrod A (1991) Recombinant human superoxide dismutases: production and potential therapeutical uses. *Free Radic Res Commun.* 12-13 Pt 1: 401-410.
- Granath F, Törnqvist M (2003) Who knows whether acrylamide in food is hazardous to humans? *JNCI.* 95(12): 842-843.
- Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB (1981) CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J.* 199: 393-398.

- Grant CM, Quinn KA, Dawes IW (1999) Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 19(4): 2650-2656.
- Granvolg M, Jezussek M, Koehler P, Schleberle P (2004) Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes – a minor but potent precursor in acrylamide formation. *J Agric Food Chem.* 52(15): 4751-4757.
- Grdović N, Dinić S, Arambašić J, Mihailović M, Uskoković A, Marković J, Poznanović G, Vidović S, Zeković Z, Mujić A, Mujić I, Vidaković M (2012) The protective effect of a mix of *Lactarius deterrimus* and *Castanea sativa* extracts on streptozotocin-induced oxidative stress and pancreatic β -cell death. *British Journal of Nutrition.* 108:1163-1176.
- Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 305(5684): 626-629.
- Greenbaum CJ, Havel PJ, Taborsky GJ Jr, Kladd LJ (1991) Intra-islet insulin permits glucose to directly suppress pancreatic A cell function. *J Clin Invest.* 88(3): 767-773.
- Griffiths HR, Møller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hoberg AM, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella A, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB (2002) Biomarkers. *Mol Aspects Med.* 23(1-3): 101-208.
- Grune T, Merker K, Sanding G, Davies KJ (2003) Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 305(3): 709-718.
- Grunnet LG, Aikin R, Tonnesen MF, Paraskevas S, Blaabjerg L, Størling J, Rosenberg L, Billestrup N, Maysinger D, Mandrup-Poulsen T (2009) Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells. *Diabetes.* 58(8): 1807-1815.
- Guardado-Mendoza R, Davalli AM, Chavez AO, Hubbard GB, Dick EJ, Majluf-Cruz A, Tene-Perez CE, Goldschmidt L, Hart J, Perego C, Comuzzie AG, Tejero ME, Finzi G, Placidi C, La Rosa S, Capella C, Halff G, Gastaldelli A, DeFronzo RA, Folli F (2009) Pancreatic islet amyloidosis, beta-cell apoptosis, and alpha-cell proliferation are determinants of islet remodeling in type-2 diabetic baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(33): 13992-13997.
- Guengerich FP (2008) Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol.* 21(1): 70-83.
- Hagmar L, Wirfalt E, Paulsson B, Törnqvist M (2005) Differences in hemoglobin levels of acrylamide in the general population with respect dietary intake, smoking habits and gender. *Mutat Res.* 580(1-2): 157-165.
- Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18(9): 685-716.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141(2): 312-322.
- Halliwell B, Gutteridge JM (2015) *Free radicals in biology and medicine*, 5th ed. Oxford: Oxford University Press.
- Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142(2): 231-255.
- Hamdy SM, Bakeer HM, Eskander EF, Sayed ON (2012) Effect of acrylamide on some hormones and endocrine tissues in male rats. *Hum Exp Toxicol.* 31(5): 483-491.
- Hampton MB, Fadeel B, Orrenius S (1998) Redox regulation of the caspases during apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.* 854: 328-335.
- Hampton MB, Orrenius S (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 414(3): 552-556.
- Hao E, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Lakey JR, Geron I, Monosov EZ, Barcova M, Mercola M, Levine F (2006) Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. *Nat Med.* 12(3): 310-316.
- Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Horing B, Drexler H (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 91(3): 7A-11A.
- Hasanin NA, Sayed NM, Ghoneim FM, Al-sherif SA (2017) Histological and ultrastructure study of the testes of acrylamide exposed adult male albino rat and evaluation of the possible protective effect of vitamin E intake. *JMAU.* In Press.
- Hashimoto K, Tanii H (1985) Mutagenicity of acrylamide and its analogues in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res.* 158(3): 129-133.

- Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM (2016) Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chem Rev.* 116(5): 3029-3085.
- Hazneci E, Karabulut AB, Oztürk C, Batçioğlu K, Doğan G, Karaca S, Eşrefoğlu M (2005) A comparative study of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and nitrate levels in vitiligo patients. *Int J Dermatol.* 44(8): 636-640.
- Heales SJ, Bolaños JP (2002) Impairment of brain mitochondrial function by reactive nitrogen species: the role of glutathione in dictating susceptibility. *Neurochem Inter.* 40(6): 469-474.
- Hegedűs C, Lakatos P, Kiss-Szikszai A, Patonay T, Gergely S, Gregus A, Bai P, Haskó G, Szabó É, Virág L (2013) Cytoprotective dibenzoylmethane derivatives protect cells from oxidative stress-induced necrotic cell death. *Pharmacol Res.* 72: 25-34.
- Hellerström C, Andersson A, Groth CG, Sandler S, Jansson L, Korsgren O, Swenne I, Petersson B, Tollemar J, Tydén G (1988) Experimental pancreatic transplantation in diabetes. *Diabetes Care.* 11(1): 45-53.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407(6805): 770-779.
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(2): 150-166.
- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* 23(10): 2134-2145.
- Hillar Klandorf and Knox Van Dyke (2012) Oxidative and Nitrosative Stresses: Their Role in Health and Disease in Man and Birds, Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects. InTech. Available from: <https://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-molecular-mechanisms-and-biological-effects/oxidative-and-nitrosative-stresses-their-role-in-health-and-disease-in-man-and-birds>
- Hinchman CA, Ballatori N (1994) Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. *J Toxicol Environ Health.* 41(4): 387-409.
- Hodgson EK, Fridovich I (1975) The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry.* 14(24): 5294-5299.
- Hoffman JR, Im J, Kang J, Maresh CM, Kraemer WJ, French D, Nioka S, Kime R, Rundell KW, Ratamess NA, Faigenbaum AD, Chance B (2007) Comparison of low- and high-intensity resistance exercise on lipid peroxidation: role of muscle oxygenation. *J Strength Cond Res.* 21(1): 118-122.
- Hogervorst JG, Baars BJ, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2010) The carcinogenicity of dietary acrylamide intake: a comparative discussion of epidemiological and experimental animal research. *Crit Rev Toxicol.* 40(6): 485-512.
- Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2009) Dietary acrylamide intake and brain cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18(5): 1663-1666.
- Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2007) A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(11): 2304-2313.
- Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2009) Lung cancer risk in relation to dietary acrylamide intake. *J Natl Cancer Inst.* 101(9): 651-662.
- Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van der Brandt PA (2008) Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder and prostate cancer. *Am J Clin Nutr.* 87(5): 1428-1438.
- Houbracken I, Bouwens L (2010) The quest for tissue stem cells in the pancreas and other organs, and their application in beta-cell replacement. *Rev Diabet Stud.* 7(2): 112-123.
- Hull RL, Kodama K, Utzschneider KM, Carr DB, Prigeon RL, Kahn SE (2005) Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia.* 48(7): 1350-1358.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1994) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Acrylamide. Some industrial chemicals. Lyon, France. 60: 389-433.
- Iki K, Pour PM (2007) Distribution of pancreatic endocrine cells including IAPP-expressing cells in non-diabetic and type 2 diabetic cases. *J Histochem Cytochem.* 55: 111-118.

- Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera PL, Willheim CB (2003) Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol.* 5(4): 330-335.
- Jähne B (1997) Practical handbook on image processing for scientific applications. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Jain R, Lammert E (2009) Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab.* 11(4): 159-167.
- Jiang G, Zhang BB (2003) Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284(4): E671-678.
- Jiang L, Cao J, An Y, Geng C, Qu S, Jiang L, Zhong L (2007) Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicol In Vitro.* 21(8): 1486-1492.
- Jo J, Choi MY, Koh DS (2007) Size distribution of mouse Langerhans islets. *Biophys J.* 93(8): 2655-2666.
- Johnson KA, Gorzinski KM, Bobner KM, Campbell RA, Wolf MA, Friedman RW (1986) Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fisher 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 85(2): 154-168.
- Kadry AM, Friedman MA, Abdel-Rahman MS (1999) Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 7(2): 127-133.
- Kahn SE, McCulloch DK, Porte D (1997) Insulin secretion in the normal and diabetic human. In: *International Textbook of Diabetes Mellitus (2nd ed)* John Wiley & Sons, New York.
- Kajimoto Y, Kaneto H (2004) Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* 1011: 168-176.
- Kaneto H, Kawamori D, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Yamasaki Y (2005) Oxidative stress and pancreatic beta-cell dysfunction. *Am J Ther.* 12(6): 529-533.
- Keklikoglu N, Akinci S (2013) The role of iNOS in beta cell destruction in diabetes. *Oxid Antioxid Med Sci.* 2(4): 251-254.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26(4): 239-257.
- Khan MA, Devis CA, Foley GI, Friedman MA, Hansen LG (1999) Changes in thyroid gland morphology after acute acrylamide exposure. *Toxicol Sci.* 47(2): 151-157.
- Khan SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward WK, Beard JC, Palmer JP (1993) Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes.* 42(11): 1663-1672.
- Kikuchi Y, Nonoguchi H, Machida K, Wakamatsu S, Koga H, Tomita K (2002) Regulation of the apoptosis-related genes, Bax and Bcl-2, in the early stage of diabetes mellitus. *Nephrology.* 7(6): 294-302.
- Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M (2009) Islet architecture: a comparative study. *Islets.* 1(2): 129-136.
- Kim K (2005) Effect of subchronic acrylamide exposure on the expression of neuronal and inducible nitric oxide synthase in rat brain. *J Biochem Mol Toxicol.* 19(3): 162-168.
- Kitahara Y, Okuyama K, Ozawa K, Fujii T (2012) Thermal decomposition of acrylamide from polyacrylamide. *J Therm Anal Calorim.* 110(1).
- Klaunig JE, Kamendulis LM (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44: 239-267.
- Knaap AG, Kramers PG, Voogd CE, Bergkamp WG, Groot MG, Langebroek PG, Mout HC, van der Stel JJ, Verharen HW (1988) Mutagenic activity of acrylamide in eucariotic systems but not in bacteria. *Mutagenesis.* 3(3): 263-268.
- Kono Y, Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem.* 257(10): 5751-5754.
- Koong AC, Giaccia AJ, Hahn GM, Saad AH (1993) Activation of potassium channels by hypoxia and reoxygenation in the human lung adenocarcinoma cell line A549. *J Cell Physiol.* 156(2): 341-347.
- Kopanska M, Lukač N, Kapusta E, Formicki G (2015) Acrylamide influence on activity of acetylcholinesterase, thiol groups, and malondialdehyde content in the brain of swiss mice. *J Biochem Molecular Toxicology.* 29(10): 472-478.
- Kröncke K-D, Fehsel K, Kolb-Bachofen V (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol.* 113(2): 147-156.

- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.* 171(9): 4672-4679.
- Lamy E, Völkel Y, Ros PH, Kassie F, Mersch-Sundermann V (2008) Ethanol enhanced the genotoxicity of acrylamide in human, metabolically competent HepG2 cells by CYT2E1 induction and glutathione depletion. *Int J Hyg Environ Health.* 211(1-2): 74-81.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 78(1): 247-306.
- Lardon J, Huyens N, Rooman I, Bouwens L (2004) Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas. *Virchows Arch.* 444(1): 61-65.
- Lash LH (2006) Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact.* 163(1-2): 54-67.
- Lebda M, Gad S, Gaafar H (2014) Effects of lipoic acid on acrylamide induced testicular damage. *Mater Sociomed.* 26(3): 208-212.
- Lebda MA, Gad SB, Rashed RR (2015) The effect of lipoic acid on acrylamide-induced neuropathy in rats with reference to biochemical, hematologic, and behavioral alterations. *Pharm Biol.* 53(8): 1207-1213.
- Lehning EJ, Balaban CD, Ross JF, LoPachin RM (2002) Acrylamide neuropathy. II. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in brainstem and spinal cord. *Neurotoxicology.* 24(1): 109-123.
- Lehning EJ, Balaban CD, Ross JF, LoPachin RM (2003) Acrylamide neuropathy. II. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in brainstem and spinal cord. *Neurotoxicology.* 24(1): 109-123.
- Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO (2008) Insulin signaling in the pancreatic beta-cell. *Annu Rev Nutr.* 28: 233-251.
- Lenzen S (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 51(2): 216-226.
- Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M (1996) Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 20(3): 463-466.
- Leung YM, Ahmed I, Sheu L, Gao X, Hara M, Tsushima RG, Diamant NE, Gasiano HY (2006) Insulin regulates islet alpha-cell function by reducing KATP channel sensitivity to adenosine 5'-triphosphate inhibition. *Endocrinology.* 147(5): 2155-2162.
- Levine F, Itkin-Ansari P (2008) Beta-cell regeneration: neogenesis, replication or both? *J Mol Med (Berl).* 86(3): 247-258.
- Li Z, Karlsson FA, Sandler S (2000) Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. *J Endocrinol.* 165(1): 93-99.
- Limon-Pacheco, J. and Gonshebbatt, M.E. (2009) The Role of Antioxidants and Antioxidant-Related Enzymes in Protective Responses to Environmentally Induced Oxidative Stress. *Mutation Research,* 674, 137-147.
- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 443(7113): 787-795.
- Lipinski B (2011) Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2011: 809696.
- Liu J, García-Cardena G, Sessa WC (1995) Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry.* 34(38): 12333-12340.
- Liu Z, Habener JF (2009) Stromal cell-derived factor-1 promotes survival of pancreatic beta cells by the stabilization of beta-catenin and activation of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2). *Diabetologia.* 52(8): 1589-1598.
- Liu Z, Song G, Zou C, Liu G, Wu W, Yuan T, Liu X (2015) Acrylamide induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in BV-2 microglial cells. *Free Radic Med.* 84: 42-53.
- Lledías F, Rangel P, Hansberg W (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem.* 273(17): 10630-10637.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4(8): 118-126.
- LoPachin RM (2004) The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology.* 25(4): 617-630.

- LoPachin RM, Decaprio AP (2005) Protein adduct formation as a molecular mechanism in neurotoxicity. *Toxicol Sci.* 86(2): 214-225.
- LoPachin RM, Gavin T (2012) Molecular mechanism of acrylamide neurotoxicity: lessons learned from organic chemistry. *Environ Health Perspect.* 120(12): 1650-1657.
- LoPachin RM, Ross JF, Lehning EJ (2002a) Nerve terminals as the primary site of acrylamide action: a hypothesis. *Neurotoxicology.* 23(1): 43-59.
- LoPachin RM, Ross JF, Reid ML, Das S, Mansukhani S, Lehning EJ (2002b) Neurological evaluation of toxic axonopathies in rats: acrylamide and 2,5-hexanedione. *Neurotoxicology.* 23(1): 95-110.
- Lu SC (2000) Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul.* 36: 95-116.
- Lushchak VI (2014) Classification of oxidative stress based on its intensity. *Excli J.* 13:922-937.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15: 323-350.
- Mannaa F, Abdel-Wahhab MA, Ahmed HH, Park MH (2006) Protective role of Panax ginseng extract standardized with ginsenoside Rg3 against acrylamide-induced neurotoxicity in rats. *J Appl Toxicol.* 26(3): 198-206.
- Mannervik B, Axelsson K (1980) Role of cytoplasmic thioltransferase in cellular regulation by thiol-disulphide interchange. *Biochem J.* 190(1): 125-130.
- Manson J, Brabec MJ, Buelke-Sam J, Carlson GP, Chapin RE, Favor JB, Fischer LJ, Hattis D, Lees PSJ, Perreault-Darney S, Rutledge J, Smith TJ, Tice RR, Working P (2005) NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of acrylamide. *Birth Defects Res B.* 74(1): 17-113.
- Maritim A, Dene BA, Sanders RA, Watkins JB 3rd (2002) Effects of beta-carotene on oxidative stress in normal and diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 16(4): 203-208.
- Marsh GM, Lucas LJ, Youk AO, Shall LC (1999) Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occup Environ Med.* 56(3): 181-190.
- Marsh GM, Youk AO, Buchanich JM, Kant IJ, Swaen G (2007) Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: updated follow up. *J Occup Environ Med.* 49(1): 82-85.
- Martensson J, Jain A, Meister A (1990) Glutathione is required for intestinal function. *Proc Nat Acad Sci.* 87: 175-179.
- Martins S, Jongen W, van Boekel M (2000) A review of Maillard reaction in food and implication to kinetic modeling. *Trends Food Sci Technol.* 11(9-10): 364-373.
- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J (2005) Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity.* 22(3): 355-370.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 16(10): 577-586.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32(8): 595-603.
- McCord JM, Day ED Jr (1978) Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett* 86: 139-142.
- McCord JM, Fridovich I (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 243(21): 5753-5760.
- McCulloch DK, Kahn SE, Schwartz MW, Koerker DJ, Palmer JP (1991) Effect of nicotinic acid-induced insulin resistance on pancreatic B cell function in normal and streptozotocin-treated baboons. *J Clin Invest.* 87(4): 1395-1401.
- McEvoy RC (1981) Changes in the volumes of the A-, B- and D-cell populations in the pancreatic islets during the postnatal development of the rat. *Diabetes.* 30(10): 813-817.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Biol.* 5(4): a008656.
- Medema JP, Toes RE, Scaffidi C, Zheng TS, Flavell RA, Melief CJ, Peter ME, Offringa R, Krammer PH (1997) Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol.* 27(12): 3492-3498.
- Mehmeti I, Lenzen S, Lortz S (2011) Modulation of Bcl-2-related protein expression in pancreatic beta cells by pro-inflammatory cytokines and its dependence on the antioxidative defence status. *Mol Cell Endocrinol.* 332(1-2): 88-96.

- Mei N, Guo L, Tseng J, Dial SL, Liao W, Manjanatha MG (2008) Gene expression changes associated with xenobiotic metabolism pathways in mice exposed to acrylamide. *Environ Mol Mutagen.* 49(9): 741-745.
- Melino G, Catani MV, Corazzari M, Guerrieri P, Bernassola F (2000) Nitric oxide can inhibit apoptosis or switch it into necrosis. *Cell Mol Life Sci.* 57(4): 612-622.
- Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I (2003) Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct.* 21:291-296.
- Menge BA, Tannapfel A, Belyaev O, Drescher R, Müller C, Uhl W, Schmidt WE, Meier JJ (2008) Partial pancreatectomy in adult humans does not provoke beta-cell regeneration. *Diabetes.* 57(1): 142-149.
- Miettinen PJ, Ustinov J, Ormio P, Gao R, Palgi J, Hakonen E, Juntti-Berggren L, Berggren PO, Otonkoski T (2006) Downregulation of EGF receptor signaling in pancreatic islets causes diabetes due to impaired postnatal beta-cell growth. *Diabetes.* 55(12): 3299-3308.
- Modak MA, Parab PB, Ghaskadbi SS (2009) Pancreatic islets are very poor in rectifying oxidative DNA damage. *Pancreas.* 38(1): 23-29.
- Montanya E (2014) Insulin resistance compensation: not just a matter of beta-cells? *Diabetes.* 63(3): 832-834.
- Montanya E, Nacher V, Biarnés M, Soler J (2000) Linear correlation between β -cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats role of β -cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes.* 49(8): 1341-1346.
- Morini S, Braun M, Onori P, Cicalese L, Elias G, Gaudio E, Rastellini C (2006) Morphological changes of isolated rat pancreatic islets: a structural, ultrastructural and morphometric study. *J Anat.* 209(3): 381-392.
- Morris SM Jr, Billiar TR (1994) New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 266: E829-39.
- Mrak RE, Griffin WS (2005) Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging.* 26(3): 349-354.
- Mucci LA, Adami HO, Wolk A (2006) Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. *Int J Cancer.* 118(1): 169-173.
- Mucci LA, Dickman PW, steinek G, Adami H-O, Augustsson K (2003) Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder. Absence of an association in a population- based study in Sweeden. *Br J Cancer.* 88(1): 84-89.
- Mucci LA, Lindblad P, Steineck G, Adami HO (2004) Dietary acrylamide and cancer risk renal cell cancer. Short Report. *Int J Cancer.* 109(5): 774-776.
- Muhammed SJ, Lundquist I, Salehi A (2012) Pancreatic beta-cell dysfunction, expression of iNOS and the effect of phosphodiesterase inhibitors in human pancreatic islets of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 14(11): 1010-1019.
- Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA (2002) Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat Disord.* 8(6): 385-387.
- Nair P, Lu M, Petersen S, Askenazi A (2014) Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. *Methods Enzymol.* 544: 99-128.
- Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D (1996) Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int.* 50(3): 1032-1043.
- Nauser T, Koppenol H (2002) The rate constant of the reaction of superoxide with nitrogen monoxide: approaching the diffusion limit. *J Phys Chem.* 106(16): 4084-4086.
- Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R (2007) Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol.* 153(1): 6-20.
- Nir T, Melton DA, Dor Y (2007) Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest.* 117(9): 2553-2561.
- Nixon BJ, Katen AL, Stanger SJ, Schjenken JE, Nixon B, Roman SD (2014) Mouse spermatocytes express CYP2E1 and respond to acrylamide exposure. *PLoS One.* 9(5): e94904.
- Nixon BJ, Stanger SJ, Nixon B, Roman SD (2012) Chronic exposure to acrylamide induces DNA damage in male germ cells of mice. *Toxicol Sci.* 129(1): 135-145.
- Norton ID, Apte MV, Haber PS, McCaughan GW, Pirola RC, Wilson JS (1998) Cytochrome P4502E1 is present in rat pancreas and is induced by chronic ethanol administration. *Gut.* 42(3): 426-430.

- NTP-ATSDR (National Toxicology Program, US Department Of Health and Human Services Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology and Environmental Medicine/Applied Toxicology) (2012) Toxicological profile for acrylamide. 1600 Clifton Road NE Mailstop F-62 Atlanta, Georgia 30333.
- OEHHA (Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency) (2005) Characterization of acrylamide intake from certain foods. <https://oehha.ca.gov/media/downloads/crn/acrylamideintakereport.pdf>
- Ogawa B, Ohishi T, Wang L, Takahashi M, Tanlai E, Hayashi H, Mitsumori K, Shibutani M (2011) Disruptive neuronal development by acrylamide in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure in rats. *Arch Toxicol.* 85(8): 987-994.
- Olesen PT, Olsen A, Frandsen H, Frederiksen K, Overvad K, Tjønneland A (2008) Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish diet, cancer and health study. *Int J Cancer.* 122(9): 2094-2100.
- Oliveira NG, Pingarilho M, Martins C, Fernandes AS, Vaz S, Martins V, Rueff J, Gaspar JF (2009) Cytotoxicity and chromosomal aberrations induced by acrylamide in V79 cells: role of glutathione modulators. *Mutat Res.* 676(1-2): 87-92.
- Oltvai ZN, Milliamn CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 74(4): 609-619.
- Omurtag GZ, Tozan A, Şehirli AÖ, Şener G (2008) Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. *J Pineal Res.* 44(4):432-438.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 12(5): 913-922.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 87(1): 315-424.
- Pamplona R, Costantini D (2011) Molecular and structural antioxidant defences against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 301(4): R843-863.
- Pan X, Zhu L, Lu H, Wang D, Lu Q, Yan H (2015) Melatonin attenuates oxidative damage induced by acrylamide in vitro and in vivo. *Oxid Med Cell Longev.* 2015: 703709.
- Park HR, Kim MS, Kim SJ, Park M, Kong KH, Kim HS, Kwack SJ, Kang TS, Kim SH, Kim HS, Lee J (2010) Acrylamide induces cell death in neural progenitor cells and impairs hippocampal neurogenesis. *Toxicol Lett.* 193(1): 86-93.
- Park J, Kamendulis LM, Friedman MA; Klaunig JE (2002) Acrylamide-induced cellular transformation. *Toxicol Sci.* 65(2): 177-183.
- Parzefall W (2008) Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food Chem Toxicol.* 46(4): 1360-1364.
- Paulsson B, Kotova N, Grawe J, Henderson A, Granath F, Golding B, Törnqvist M (2003) Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutat Res.* 535(1): 15-24.
- Pelucchi C, Galeone C, Talamini R, Negri E, Polesel J, Serraino D, La Vecchia C (2011) Dietary acrylamide and pancreatic cancer risk in an Italian case-control study. *Int J Cancer.* 128(8): 1910-1915.
- Pennisi M, Malaguamera G, Puglisi V, Vinciguerra L, Vacante M, Malaguarnera M (2013) Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers. *Int J Environ Res Public Health.* 10(9): 3843-3854.
- Peskin AV (1997) Cu,Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: A review. *Biosci Rep* 17(1): 85-89
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 4(2): 89-96.
- Phillips BW, Hentze H, Rust WL, Chen QP, Chipperfield H, Tan EK, Abraham S, Sadasivam A, Soong PL, Wang ST, Lim R, Sun W, Colman A, Dunn NR (2007) Directed differentiation of human embryonic stem cell into the pancreatic endocrine lineage. *Stem Cells Dev.* 16(4): 561-578.
- Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev.* 51(3): 283-297.
- Pirmoradi L, Noorafshan A, Safaee A, Dehghani GA (2016) Quantitative assessment of proliferative effects of oral vanadium on pancreatic islet volumes and beta cell numbers of diabetic rats. *Iran Biomed J.* 20(1): 18-25.

- Platt N, da Silva RP, Gordon S (1998) Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells, *Trends Cell Biol.* 8(9): 365-372.
- Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS (2006) Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr.* 136(4): 873-876.
- Portela-Gomes GM, Stridsberg M, Grimelius L, Oberg K, Janson ET (2000) Expression of the five different somatostatin receptor subtypes in endocrine cells of the pancreas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 8(2): 126-132.
- Porter NA, Caldwell SE, Mills KS (1995) Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids.* 30(4): 277-290.
- Prasad SN, Muralidhara (2013) Neuroprotective efficacy of eugenol and isoeugenol in acrylamide-induced neuropathy in rats: behavioral and biochemical evidence. *Neurochem Res.* 38(2): 330-345.
- Prasad SN, Muralidhara (2014) Protective effects of geraniol (a monoterpene) in a diabetic neuropathy rat model: attenuation of behavioral impairments and biochemical perturbations. *J Neurosci Res.* 92(9): 1205-1216.
- Prentki M (1996) New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol.* 134(3): 272-286.
- Prentki M, Nolan CJ (2006) Islet β cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 116(7): 1802-1812.
- Qader SS, Ekelund M, Andersson R, Obermuller S, Salehi A (2003) Acute pancreatitis, expression of inducible nitric oxide synthase and defective insulin secretion. *Cell Tissue Res.* 313(3): 271-279.
- Qin Z, Reszka KJ, Fukai T, Weintraub NL (2008) Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Transl Res.* 151(2): 68-78.
- Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A (2008) Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol.* 199(1): 5-19.
- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC (1996) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: identification of iNOS-expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets. *Endocrinology.* 137(5): 2093-2099.
- Raju J, Roberts J, Sondagar C, Kapal K, Aziz SA, Caldwell D, Mehta R (2013) Negligible colon cancer risk from food-borne acrylamide exposure in male F344 rats and nude (*nu/nu*) mice-bearing human colon tumor xenografts. *PLoS One.* 8(9): e73916.
- Rankin MM, Kushner JA (2009) Adaptive beta-cell proliferation is severely restricted with advanced age. *Diabetes.* 58(6): 1365-1372.
- Reed JC (2006) Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.* 13(8): 1378-1386.
- Rendic S, Carlo FJ (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev.* 29(1-2): 413-580.
- Requena JR, Levine RL, Stadtman ER (2003) Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids.* 25(3-4): 221-226.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 49(11): 1603-1616.
- Rice JM (2005) The carcinogenicity of acrylamide. *Mutat Res.* 580(1-2): 3-20.
- Robin LP, Cianci S (2007) Ask the Regulators: Acrylamide, Furan, and the FDA. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/Acrylamide/ucm194482.htm>.
- Rodriguez-Diaz R, Abdulreda MH, Formoso AL, Gans I, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A (2011) Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell Metab.* 14(1): 45-54.
- Rodriguez-Ramiro I, Ramos S, Bravo L, Goya L, Martin MA (2011) Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *J Nutr Biochem.* 22(12): 1186-1194.

- Rojo A, Salinas M, Martin D, et al. (2004) Regulation of Cu/ Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidyl- inositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kB. *J Neurosc.* 24(33): 7324-7334.
- Rose RC, Bode AM (1993) Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* 7(12): 1135-1142.
- Ross MH, Kaye GI, Wojciech P (2002) *Histology: A text and atlas.* 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Rossi R, Cardaioli E, Scaloni A, Amiconi G, Di Simplicio P (1995) Thiol groups in proteins as endogenous reductants to determine glutathione-protein mixed disulphides in biological systems. *Biochim Biophys Acta.* 1243(2): 230-238.
- Ruifork AC, Johnston DA (2001) Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol.* 23(4): 291-299.
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM (2007) Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 9(1): 49-89.
- Saha N, Schreiber R, vom Dahl S, Lang F, Gerok W, Häussinger D (1993) Endogenous hydroperoxide formation, cell volume and cellular K⁺ balance in perfused rat liver. *Biochem J.* 296(Pt 3): 701-707.
- Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S (2002) Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese type II diabetic patients. *Diabetologia.* 45(1): 85-96.
- Samols E, Stagner JJ, Ewart RB, Marks V (1988) The order of islet microvascular cellular perfusion is B-A-D in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest.* 82(1): 350-353.
- Sampson JB, Beckman JS (2001) Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu,Zn superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys.* 392(1): 8-13.
- Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S (1997) Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Diabetes.* 46(10): 1736-1741.
- Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 30(11): 1191-1212.
- Schettgen T, Kütting B, Horing M, Beckmann MW, Weiss T, Drexler H, Angerer J (2004) Trans-placental exposure of neonates to acrylamide – a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health.* 77(3): 213-216.
- Schettgen T, Weiss T, Drexler J, Angerer A (2003) A first approach to estimate the internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany. *Int J Environ Health.* 206(1): 9-14.
- Schlenker T, Feranchak AP, Schwake L, Stremmel W, Roman RM, Fitz JG (2000) Functional interactions between oxidative stress, membrane Na(+) permeability, and cell volume in rat hepatoma cells. *Gastroenterology.* 118(2): 395-403.
- Schoenwolf G, Bleyl S, Brauer P, Francis-West P (2014) *Larsen's human embryology.* 5th edition. Churchill Livingstone, London, UK.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 267(16): 4904-4911.
- Schulz MR, Hertz-Picciotto I, van Wijngaarden E, Hernandez JC, Ball LM (2001) Dose-response relation between acrylamide and pancreatic cancer. *Occup Environ Med.* 58(9): 609.
- Sega GA, Generoso EE, Brimer PA (1990) Acrylamide exposure induces a delayed unscheduled DNA synthesis in germ cells of male mice that is correlated with the temporal pattern of adduct formation in testis DNA. *Environ Mol Mutagen.* 16(3): 137-142.
- Selvakumar K, Bavithra S, Ganesh L, Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Arunakaran J (2013) Polychlorinated biphenyls induced oxidative stress mediated neurodegeneration in hippocampus and behavioral changes of adult rats: anxiolytic-like effects of quercetin. *Toxicol Lett.* 222(1): 45-54.
- Settels E, Bernauer U, Palavinskas R, Klaffke HS, Gundert-Remy U, Appel KE (2008) Human CYP2E1 mediates the formation of glycidamide from acrylamide. *Arch Toxicol.* 82(10): 717-727.
- Shah AA, Sinha AA (2013) Oxidative stress and autoimmune skin disease. *Eur J Dermatol.* 23(1): 5-13.

- Shelby MD, Cain KT, Cornett CV, Generoso WM (1987) Acrylamide: induction of heritable translocation in male mice. *Environ Mutagen.* 9(4): 363-368.
- Shinomol GK, Raghunath N, Bharath MM, Muralidhara (2013) Prophylaxis with *Bacopa monnieri* attenuates acrylamide induced neurotoxicity and oxidative damage via elevated antioxidant function. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 13(1): 3-12.
- Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, Macdonald N, Clewell H, Allen B, Van Landingham C (2006) Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Crit Rec Toxicol.* 36(6-7): 481-608.
- Siems WG, Grune T, Schwendel A (1995) Adenine nucleotide levels and lipid peroxidation at hypoxia and reoxygenation in different cell types. U: Purine and pyrimidine metabolism in man VIII. *Advances in experimental medicine and biology*, vol 370. Springer, Boston, MA.
- Sies H (1985) Oxidative stress: Introductory remarks. U: Oxidative stress. Academic press, London.
- Simic MG, Jovanovic SV (1986) Free radical mechanisms of DNA base damage. In: Simic MG, Grossman L, Upton AC (eds) *Mechanisms of DNA damage and repair*. Plenum, New York, pp 39–50.
- Simon F, Varela D, Riveros A, Eguiguren AL, Stutzin A (2002) Non-selective cation channels and oxidative stress-induced cell swelling. *Biol Res.* 35(2): 215-222.
- Skipper PL, Tannenbaum SR (1990) The role of protein adducts in the study of chemical carcinogenesis. *Prog Clin Biol Res.* 340C: 301-310.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases -2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 14(2): 281-292.
- Smith EA, Prues SL, Oehme FW (1996) Environmental degradation of polyacrylamides. 1. Effects of artificial environmental conditions: temperature, light, and pH. *Ecotoxicol Environ Saf.* 35(2): 121-135.
- Smith EA, Prues SL, Oehme FW (1997) Environmental degradation of polyacrylamides. II. Effects of environmental (outdoor) exposure. *Ecotoxicol Environ Saf.* 37(1): 76-91.
- Smith GD, Pangborn WA, Blessing RH (2003) The structure of T6 human insulin at 1.0 Å resolution. *Acta Crystallogr Biol Crystallogr.* 59(3): 474-482.
- Smolle J, Hofmann-Wellenhof R, Soyer HP, Stettner H, Kerl H (1989) Nuclear size and shape parameters correlate with proliferative activity in cutaneous melanocytic tumors. *J Invest Dermatol.* 93(1): 178-182.
- Sobel W, Bond GG, Parsons TW, Brenner FE (1986) Acrylamide cohort mortality study. *Br J Ind Med.* 43(11): 785-788.
- Solomon JJ, Fedyk J, Mukai F, Segal A (1985) Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Res.* 45(8): 3465-3470.
- Sorenson RL, Brelje TC (1997) Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res.* 29(6): 301-307.
- Sörgel F, Weissenbacher R, Kizing-Schippers M, Hofmann A, Illauer M, Skott A, Landersdorfer C (2002) Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental breast milk transfer in humans. *Chemotherapy.* 48(6): 267-274.
- Šoškić SS, Dobutović BD, Sudar EM, Obradović MM, Nikolić DM, Đorđević JD, Radak ĐJ, Mikhailidis DP, Isenović ER (2011) Regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and its potential role in insulin resistance, diabetes and heart failure. *Open Cardiovasc Med J.* 5: 153-163.
- Spinas GA (1999) The dual role of nitric oxide in islet beta-cells. *News Physiol Sci.* 14: 49-54.
- Srivastava SP, Das M, Seth PR (1983) Enhancement of lipid per-oxidation in rat liver on acute exposure to styrene and acrylamide. A consequence of glutathione depletion. *Chemico-Biol. Int.* 45: 373–380.
- Stadler RH, Blank I, Varga M, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Riediker S, (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature.* 419(6906): 449-450.
- Stadtman ER (2004) Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem.* 11(9): 1105-1112.

- Stadtman ER, Berlett BS (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol.* 10(5): 485-494.
- Stark G (1991) The effect of ionizing radiation on lipid membranes. *Biochem Biophys Acta.* 1071(2): 103-122.
- Steer SA, Scarim AL, Chambers KT, Corbett JA (2006) Interleukin-1 stimulates beta-cell necrosis and release of the immunological adjuvant HMGB1. *PLoS Med.* 3(2): e17.
- Steil GM, Trivedi N, Jonas JC, Hasenkamp WM, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC (2001) Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280(5): E788-796.
- Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RM (1999) NF-kappaB/Rel activation in cerulean pancreatitis. *Gastroenterology.* 116(2): 420-430.
- Stennicke HR, Salvesen GS (1998) Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta.* 1387(1-2): 17-31.
- Stocker R, Keaney JF Jr (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 84(4): 1381-1478.
- Sumner SC, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzalez F, Ghanayam BI (1999) Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem Res Toxicol.* 12(11): 1110-1116.
- Sumner SC, MacNeela JP, Fennell TR (1992) Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]Acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Res Toxicol.* 5:81-89.
- Sumner SC, Selvaraj L, Nauhaus SK, Fennell TR (1997) Urinary metabolites from F344 rats and B6C3F1 mice coadministered acrylamide and acrylonitrile for 1 or 5 days. *Chem Res Toxicol.* 10(10): 1152-1160.
- Sunash-Babu P, Alshatwi AA, Ignacimuthu S (2014) Beneficial antioxidative and antiperoxidative effect of Cinnamaldehyde protect Streptozotocin-induced pancreatic β -cell damage in Wistar rats. *Biomol Ther (Seoul).* 22(1): 47-54.
- Suri A, Calderon B, Esparza TJ, Frederick K, Bittner P, Unanue ER (2006) Immunological reversal of autoimmune diabetes without hematopoietic replacement of beta cells. *Science.* 311(5768): 1778-1780.
- Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell.* 103(4): 645-654.
- Švob M (1974) *Histološke i histohemijske metode.* "Svjetlost", Sarajevo.
- Swenne I, Eriksson U (1982) Diabetes in pregnancy: islet cell proliferation in the fetal rat pancreas. *Diabetologia.* 23(6): 525-528.
- Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 50(6): 537-546.
- Takahashi R, Ishihara H, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, Takei D, Katagiri H, Endou H, Oka Y (2006) Cell type-specific activation of metabolism reveals that beta-cell secretion suppresses glucagon release from alpha-cells in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290(2): E308-316.
- Takamura T, Kato I, Kimura N, Nakazawa T, Yonekura H, Takasawa S, Okamoto H (1998) Transgenic mice overexpressing type 2 nitric-oxide synthase in pancreatic beta cells develop insulin-dependent diabetes without insulinitis. *J Biol Chem.* 273(5): 2493-2496.
- Takeda Y, Fujita Y, Honjo J, Yanagimachi T, Sakagami H, Takiyama Y, Makino Y, Abiko A, Kieffer TJ, Haneda M (2012) Reduction of both ceta cell death and alpha cell proliferation by dipeptidyl peptidase-4 inhibition in a streptozotocin-induced model of diabetes in mice. *Diabetologia.* 55(2): 404-412.
- Tamari Y, Nawata H, Inoue E, Yoshimura A, Yoshii H, Kashino G, Seki M, Enomoto T, Watanabe M, Tano K (2013) Protective roles of ascorbic acid in oxidative stress induced by depletion of superoxide dismutase in vertebrate cells. *Free Radic Res.* 47(1): 1-7.
- Tareke E, Rydberg P, Eriksson S, Törnqvist M (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem.* 50(17): 4998-5006.
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M (2000) Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chem Rws Toxicol.* 13(6): 517-522.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(3): 231-241.

- Teodor V, Cuciureanu M, Filip C, Zamosteanu N, Cuciureanu R (2011) Protective effects of selenium on acrylamide toxicity in the liver of the rat. Effects on the oxidative stress. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 115(2): 612-618.
- Teramoto S, Fukuchi Y, Uejima Y, Shu CY, Orimo H (1995) Superoxide anion formation and glutathione metabolism of blood in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochem Mol Med*. 55(1): 66-70.
- Thomas CE, Jackson RL, Ohlweiler DF, Ku G (1994) Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J Lipid Res*. 35(3): 417-427.
- Thorel F, Népote V, Avril I, Kohono K, Desgaz R, Chera S, Herrera PL (2010) Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature*. 464(7292): 1149-1154.
- Tiedge M, Stephan L, Drinkgern J, Lenzen S (1997) Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defence. *Diabetes*. 46(11): 1733-1742.
- Timbrell JA, Marrs TC (2009) Biotransformation of xenobiotics. U: General, Applied and Systems Toxicology. John Wiley and Sons, Inc. Published online.
- Tomas E, Lin YS, Dagher Z, Saha A, Luo Z, Ido Y, Ruderman N (2002) Hyperglycemia and insulin resistance: possible mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 967: 43-51.
- Törnqvist M, Fred C, Haglund J, Helleberg H, Paulsson B, Rydberg P (2002) Protein adducts: Quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. *J Chromatogr B* 778(1-2): 279-308.
- Törnqvist M, Hindsø Landin H (1995) Hemoglobin adducts for in vivo dose monitoring and cancer risk estimation. *J Occup Environ Med*. 37: 1077-1085.
- Traber MG, Atkinson J (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*. 43(2): 4-15.
- Tschen SI, Dhawan S, Gurlo T, Bhushan A (2009) Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes*. 58(6): 1312-1320.
- Uchida K, Kawakishi S (1994) Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H₂O₂. Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine 118. *J Biol Chem*. 269(4): 2405-2410.
- Uhlig S, Wendel A (1992) The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sci*. 51(14): 1083-1094.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(1): 44-84.
- Valko M, Rhodes CJ, Monocol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *160(1): 1-40*.
- Van Landingham CB, Lawrence GA, Shipp AM (2004) Estimates of lifetime-absorbed daily doses from the use of personal-care products containing polyacrylamide: a Monte Carlo analysis. *Risk Anal*. 24(3): 603-619.
- Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A (2014) IHC profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS ONE* 9(5): e96810.
- Venkatasubbaiah K, Venkataswamy D, Sandhya D, Suresh K, Rao KJ (2014) Acrylamide induced oxidative stress in rat and chick embryonic liver tissues. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 4(06): 2791-2798.
- Venkataswamy M, Divya K, Pallavi C, Thyaga Raju K (2013) Characterization of glutathione-S-transferases-suppression of antioxidant enzymes by acrylamide in developing chick embryonic brain. *Int J Pharm Bio Sci*. 4(3): (B) 668-677.
- Venkatesh S, Deecaraman M, Kumar R, Shamsi MB, Dada R (2009) Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. *Indian J Med Res*. 129(2): 127-137.
- Vieira E, Salehi A, Gylfe E (2007) Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia*. 50(2): 370-379.
- von Stedingk H, Vilckström AC, Rydberg P, Pedersen M, Nielsen JK, Segerbäck D, Knudsen LE, Törnqvist M (2011) Analysis of hemoglobin adducts from acrylamide, glycidamide,

- and ethylene oxide in paired mother/cord blood samples from Denmark. *Chem Res Toxicol.* 24(11): 1957-1965.
- Wali JA, Thomas HE (2015) Pancreatic alpha cells hold the key to survival. *EBioMedicine.* 2(5): 368-369.
- Wang H, Huang P, Lie T, Li J, Hutz RJ, Li K, Shi F (2010) Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reprod Toxicol.* 29(2): 225-230.
- Wang RN, Klöppel G, Bouwens L (1995) Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia.* 38(12): 1405-1411.
- Watters D (1999) Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol.* 77(3): 263-271.
- Weibel E.R. (1979) Practical methods for biological morphometry. U: Stereological methods. Academic Press. London, UK.
- Weir GC, Bonner-Weir S (2013) Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann N Y Acad Sci.* 1281: 92-105.
- Wells WW, Xu DP (1994) Dehydroascorbate reduction. *J Bioenerg Biomembr.* 26(4): 369-377.
- Wendt A, Birnir B, Buschard K, Gromada J, Salehi A, Sewing S, Rorsman P, Braun M (2004) Glucose inhibition of glucagon secretion from rat alpha-cells is mediated by GABA released from neighboring beta-cells. *Diabetes.* 53(4): 1038-1045.
- WHO (World Health Organization). (1996). Acrylamide. Guidelines for drinking-water quality. Geneva, WHO 2, 541-547.
- Wilcox G (2005) Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* 26(2): 19-39.
- Williams MA (1977) Quantitative methods in biology. U: Practical Methods in Electron Microscopy, vol. 6., Amsterdam: North-Holland.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC (2007) Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science.* 315(5813): 856-859.
- Winterbourn CC, Metodiewa D (1994) The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys.* 314(2): 284-290.
- Winterbourn CC (1995) Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett.* 82-83: 969-974.
- Wise LD, Gordon LR, Sper KA, Duchai DM, Morissey RE (1995) Developmental neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprague-Dowley rats. *Neurotoxicol Teratol.* 17(2): 189-198.
- Wood LG, Gibson PG, Garg ML (2003) Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J.* 21(1): 177-186.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton J, Turner N (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 134(3): 489-492.
- Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol.* 142(1): 67-77.
- Xu X, D'Hoker J, Stangé G, Bonn e S, De Leu N, Xiao X, Van de Castele M, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, Bouwens L, Scharfmann R, Gradwohl G, Heimberg H (2008) Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell.* 132(2): 197-207.
- Yang HJ, Lee SH, Jin Y, Choi JH, Han CH, Lee MH (2005b) Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *J Vet Sci.* 6(2): 103-109.
- Yang HJ, Lee SH, Jin Y, Choi JH, Han DU, Chae C, Lee MH, Han CH (2005a) Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reprod Toxicol.* 19(4): 527-534.
- Yang J, Chi Y, Burkhardt BR, Guan Y, Wolf BA (2010) Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev.* 68(5): 270-279.
- Yasuhara A, Tanaka Y, Hengel M, Shibamoto T (2003) Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *J Agric Food Chem.* 51(14): 3999-4003.
- Yaylayan VA, Wnorowski A, Locas CP (2003) Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J Agric Food Chem.* 51(6): 3999-4003.
- Yener Y, Kalipci E, Oztas H, Aydin AD, Yildiz H (2013) Possible neoplastic effects of acrylamide on rat exocrine pancreas. *Biotech Histochem.* 88(1): 47-53.

- Yilmaz BO, Yildizbayrak N, Aydin Y, Erkan M (2017) Evidence of acrylamide- and glycidamide-induced oxidative stress and apoptosis in Leydig and Sertoli cells. *Hum Exp Toxicol.* 36(12): 1225-1235.
- Yin H, Xu L, Porter NA (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 111(10): 5944-5972.
- Yoo HY, Chang MS, Rho HM (1999) The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem.* 274(34): 23887-23892.
- Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S (2003) Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(5): 2300-2308.
- Yoshioka T, Bills T, Moore-Jarrett T, Greene HL, Burr IM, Ichikawa I (1990) Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney Int.* 38:282-288.
- Yost FJ Jr, Fridovich I (1973) An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 248(14): 4905-4908.
- Younes M, Siegers C-P (1980) Lipid peroxidation as a consequence of glutathione depletion in rat and mouse liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 27: 119-128.
- Yousef MI, El-Demerdash FM (2006) Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology.* 219(1-3): 133-141.
- Zamani E, Shokrzadeh M, Ziar A, Abedian-Kenari S, Shaki F (2017) Acrylamide attenuated immune tissues function via induction of apoptosis and oxidative stress: protection by l-carnitine. *Hum Exp Toxicol.* 1: 960327117741753.
- Zaret KS, White MF (2010) Diabetes forum: Extreme makeover of pancreatic alpha-cells. *Nature.* 464(7292): 1132-1133.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 33(3): 337-349.
- Zenick H, Hope E, Smith MK (1986) Reproductive toxicity associated with acrylamide treatment in male and female mice. *J Toxicol Environ Health.* 17(4): 457-472.
- Zhang L, Xu Y, Li Y, Bao T, Gowd V, Chen W (2017) Protective property of mulberry digest against oxidative stress – a potential approach to ameliorate dietary acrylamide-induced cytotoxicity. *Food Chem.* 230: 306-315.
- Zhang Y, Ren Y, Zhang Y (2009) New research developments on acrylamide: analytical chemistry, formation mechanisms, and mitigation recipes. *Chem Rev.* 109(9): 4375-4397.
- Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA (2008) In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature.* 455(7213): 627-632.
- Zhu YJ, Zeng T, Zhu YB, Yu SF, Wang QS, Zhang LP, Guo X, Xie KQ (2008) Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat. *Neurochem Res.* 33(11): 2310-2317.
- Ziegler U, Groscurth P (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 19: 124-128.
- Zimmermann KC, Green DR (2001) How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 108(4 Suppl): S99-103.
- Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GP, Villagran MD (2003) Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J Agric Food Chem.* 51(16): 4782-4787.

BIOGRAFIJA

Milena Stošić je rođena 9. 12. 1979. godine u Novom Sadu. Prirodno-matematički fakultet, Univerziteta u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog, završila je 2006. godine sa prosečnom ocenom 8,69. Diplomski rad pod naslovom: „Delovanje atrazina na Lajdigove ćelije i intersticijum testisa” uradila je u laboratoriji za histologiju i embriologiju, Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu i odbranila ga 26. 9. 2006. godine sa ocenom 10. Master akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, završila je 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,29. Završni rad pod naslovom: „Mikrobiološke karakteristike procednih voda nekih komunalnih deponija u Srbiji“ uradila je u laboratoriji za mikrobiologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i odbranila ga 29. 10. 2009. godine sa ocenom 10. Doktorske studije upisuje na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, gde je u laboratoriji za histologiju i embriologiju, Departmana za biologiju i ekologiju, uradila eksperimentalni deo doktorske teze pod rukovodstvom docenta dr Jelene Marković, a u okviru projekata „Akutni i hronični efekti akrilamida na kožu i organe digestivnog sistema“ finansirano od strane Pokrajinskog sekretarijata za visoko obrazovanje i naučnoistraživačku delatnost AP Vojvodine (114-451-933/ 2015-03), i “Razvoj i primena naprednih hromatografskih spektrometrijskih metoda za analizu ksenobiotika i puteva njihove razgradnje u biotskim i abiotskim uzorcima” finansirano od strane Minitarstva prosvete i nauke Republike Srbije (172050).

Zvanje asistent stiče 2012. godine na Fakultetu tehničkih nauka, Univerziteta u Novom Sadu, gde je angažovana u izvođenju praktične nastave na predmetima: Inženjerska hemija, Hemija u mašinstvu i Biohemijski i mikrobiološki principi.

Trenutno je istraživač na Projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj pod nazivom: „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu”, evidencioni broj: III 46009. Takođe, kao istraživač je učestvovala na kratkoročnom Projektu Ministarstva za poljoprivredu, šumarstvo i vodoprivredu: “Poljoprivredne i ekonomske aktivnosti u funkciji očuvanja biodiverziteta i unapređenja poljoprivrede“, na Projektu Pokrajinskog sekretarijata za zaštitu životne sredine i održivi razvoj Autonome Pokrajine Vojvodina: „Preliminarna kvalitativna i kvantitativna analiza procednih voda i gasova sa deponija u cilju uspostavljanja kontinualnog monitoringa“, kao i na međunarodnom Projektu NATO programa: Nauka za mir i sigurnost, pod nazivom „Drinking Water Quality Risk Assessment and Prevention in Novi Sad municipality, Srbija“.

Milena Stošić je do danas objavila 4 rada u časopisima od međunarodnog značaja, ima 22 saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima i po jedan rad u časopisima kategorija M51, M52 i M53.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Autor: AU	Milena Stošić
Mentor: MN	dr Jelena Marković, docent, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad
Naslov rada: NR	Uticaj tretmana akrilamidom na endokrini pankreas pacova
Jezik publikacije: JP	Srpski / latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski
Zemlja publikacije: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja: 7 / stranica: 125 / slika: 53 / tabela: 3 / referenci: 477)
Naučna oblast: NO	Biologija
Naučna disciplina ND	Histologija sa embriologijom
Predmetna odrednica / ključne reči: PO	akrilamid, Langerhansova ostrvca, pankreas, insulin, glukagon, iNOS, CYP2E1, SOD1, SOD2, CAT, oksidativni

	stres
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad, Republika Srbija
Važna napomena VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Akrilamid je toksična hemijska supstanca koja je već dugi niz godina prisutna u životnoj sredini, jer se kao važan monomer koristi u različite industrijske i laboratorijske svrhe. U poslednjih petnaest godina, akrilamid je postao posebno zanimljiv za šire naučne krugove jer se pokazalo da se nalazi i u hrani biljnog porekla, posebno hrani bogatoj skrobom, koja se priprema pečenjem ili prženjem na temperaturama višim od 120°C. Do sada ustanovljeni negativni zdravstveni efekti akrilamida su veoma raznovrsni i mogu biti rezultat delovanja samog akrilamida ili delovanja njegovog metabolita glicidamida koji nastaje <i>in vivo</i> kada se jedan deo molekula akrilamida metaboliše oksigenacijom dvostruke veze pomoću enzima citohrom P450 2E1 (CYP2E1).</p> <p>Akrilamid je supstanca koja ima dokazan negativan efekat na organske sisteme kod ljudi i životinja, i koja je svrstana u moguće humane karcinogene. Negativan efekat akrilamida na egzokrini pankreas je poznat, ali o mogućim efektima akrilamida na endokrini pankreas se i dalje veoma malo zna. Ima puno dokaza koji ukazuju na to da akrilamid ima citotoksični efekat koji se manifestuje kroz uticaj na redoks-status ćelija i dovodi do promena u vrednostima biomarkera oksidativnog i nitrozativnog stresa, kao i u aktivnosti antioksidativnih enzima.</p> <p>Pankreas je jedan od ciljnih organa za delovanje akrilamida te je glavni predmet istraživanja doktorske teze bio proučavanje potencijalnog efekta akrilamida na endokrini pankreas pacova. Ispitivanje je vršeno na 3 eksperimentalne grupe juvenilnih mužjaka pacova soja Wistar, od kojih je jedna grupa bila kontrolna, dok su dve bile tretirane sa akrilamidom u dozama od 25 mg/kg tm i 50 mg/kg tm, 5 dana nedeljno, tokom 3 nedelje. Po isteku tretmana, nakon dekapitacije, kompletno tkivo pankreasa je fiksirano u 10% rastvoru formalina tokom 24 h i obrađeno prema standardnoj proceduri za kalupljenje u parafinu. Parafinski kalupi su sečeni na serijske preseke debljine 5 µm, nakon čega su bojeni histohemijskom i imunohistohemijskim metodama. Kod eksperimentalnih grupa posmatrane su histološke promene na endokrinom pankreasu, sa akcentom na α- i β-ćelije. Takođe, posmatrana je i ekspresija hormona insulina i glukagona, enzima inducibilne azot-oksida sinteze (iNOS) i CYP2E1, kao i ekspresija antioksidativnih enzima katalaza (CAT) i superoksid dismutaza 1 i 2 (SOD1 i SOD2) u ćelijama Langerhansovih ostrvaca. Potencijalna promena u funkcionalnosti β-ćelija je ispitana i</p>

kroz analizu nivoa glukoze u serumu pacova tretiranih sa akrilamidom.

Budući da β -ćelije čine 80% ćelija koje grade Langerhansova ostrvca pankreasa, pored *in vivo* eksperimenata, ispitana je i toksičnost akrilamida na Rin-5F ćelijsku liniju insulinoma β -ćelija pacova u *in vitro* uslovima.

Glavni cilj *in vitro* istraživanja je bio da se ispita uticaj rastućih koncentracija akrilamida na preživljavanje tretiranih Rin-5F ćelija, ali i efekat IC_{50} koncentracije ove supstance primenjene tokom različitih vremenskih intervala (0,5, 1, 3, 6, 12 i 24 h) na pojavu oksidativnog i nitrozativnog stresa. Redoks-status Rin-5F ćelija tretiranih sa akrilamidom je ispitan preko analize prisustva biomarkera oksidativnog i nitrozativnog stresa, aktivnosti CAT i ukupne SOD, kao i promene u ekspresiji gena za CAT, SOD1, SOD2 i iNOS. Pored toga, analiziran je i efekat istog tretmana na ekspresiju gena za insulin, CYP2E1, Bax i Bcl-2.

U okviru teze je pokazano da akrilamid ne dovodi do značajnih promena u histološkoj građi, dijametru i broju Langerhansovih ostrvaca kod tretiranih životinja. Primena stereoloških metoda je ukazala na mikrostrukturne promene na endokrinom pankreasu na nivou α - i β -ćelija. U ovoj tezi je po prvi put pokazano da tretman akrilamidom negativno utiče na broj i površinu β -ćelija pankreasa. U tezi je, takođe, pokazan značajan dozno-zavisni pad u prisustvu insulina u β -ćelijama pankreasa. Uprkos tome, kod akrilamidom tretiranih životinja nije konstatovana promena u koncentraciji serumske glukoze. U ovoj tezi je pokazano da tretman akrilamidom dovodi do statistički značajnog porasta u broju α -ćelija kod životinja koje su primale nižu dozu tretmana, dok se broj α -ćelija kod životinja koje su primale višu dozu tretmana ne razlikuje značajno od kontrole. Tretman akrilamidom je doveo do značajnog porasta u količini prisutnog glukagona u α -ćelijama pankreasa.

Tretman akrilamidom nije doveo do značajne promene u ekspresiji CAT, SOD1 i SOD2 u ćelijama Langerhansovih ostrvaca. Kod tretiranih životinja došlo do značajnog dozno-zavisnog porasta u ekspresiji enzima iNOS, dok je ekspresija CYP2E1 značajno dozno-zavisno opala nakon tretmana.

U tezi je pokazano da tretman akrilamidom negativno utiče na vijabilnost Rin-5F ćelija, i utvrđeno je da IC_{50} koncentracija akrilamida za Rin-5F ćelije iznosi 10 mM. Rezultati teze pokazuju da tretman akrilamidom u IC_{50} koncentraciji u Rin-5F ćelijskoj liniji značajno povećava nivo malondialdehida (MDA) nakon tretmana u trajanju od 1, 12 i 24 h. Isti tretman značajno smanjuje nivo redukovano GSH nakon tretmana od 1, 3, 6, 12 i 24 h, kao i nivo slobodnih -SH grupa nakon tretmana od 3 i 6 h. Tretman akrilamidom u IC_{50} koncentraciji signifikantno pojačava aktivnost CAT nakon tretmana od 1 h, dok tretman u trajanju od 12 h značajno smanjuje aktivnost ovog enzima. Ovaj tretman smanjuje aktivnost SOD nakon 1, 12 i 24 h, dok tretman u trajanju od 6 h značajno pojačava aktivnost enzima SOD. U tezi je, takođe, pokazan i veoma značajan porast u nivou prisutnih nitrita, koji je direktno proporcionalan sa nivoom azot-oksida i nivoom aktivnosti enzima iNOS. Ovaj nalaz ukazuje na potencijalnu pojavu nitrozativnog stresa u

akrilamidom-tretiranim Rin-5F ćelijama. U tezi je po prvi put pokazano da tretman akrilamidom dovodi do značajnih varijacija u transkripciji gena za iNOS, SOD1, SOD2, CAT, CYP2E1, Bax i Bcl-2 u tretiranim Rin-5F ćelijama, dok isti tretman ne dovodi do promene nivoa transkripcije gena za insulin. Tretman akrilamidom u koncentraciji od 10 mM tokom rastućih vremenskih perioda dovodi do porasta u relativnoj količini iRNK gena za iNOS u svim tačkama tretmana, do porasta nivoa iRNK za SOD1 i SOD2 nakon tretmana od 12 i 24 h, kao i do porasta količine iRNK za CAT nakon tretmana od 3 h. U tezi je pokazano i da akrilamid izaziva promene u sintezi iRNK za enzim CYP2E1 koji je posebno značajan u kontekstu detoksikacije ove toksične supstance. Porast u transkripciji gena za CYP2E1 je uočen nakon tretmana u trajanju od 0,5 i 1 h, dok je do smanjenja transkripcije došlo nakon tretmana od 12 i 24 h. Tretman akrilamidom u koncentraciji od 10 mM tokom rastućih vremenskih perioda dovodi do porasta u relativnoj količini iRNK gena za Bax u svim tačkama tretmana, i do porasta u transkripciji gena za Bcl-2 nakon tretmana od 0,5, 1 i 3 h.

Sumirajući sve rezultate ove teze, može se zaključiti da je endokrini pankreas jedno od ciljnih tkiva, na koje akrilamid ostvaruje višestruki negativni uticaj.

Datum prihvatanja teme: DP	27. 4. 2017.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije	<p>Predsednik: dr Milica Matavulj, redovni profesor u penziji, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Mentor: dr Jelena Marković, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Član: dr Verica Milošević, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu</p> <p>Član: dr Danijela Kojić, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Član: dr Gordana Ušćebrka, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu</p>

	<p>Član: dr Mirjana Vojinović Miloadov, profesor emeritus, Fakultet tehničkih nauka, Univerzitet u Novom Sadu</p>
--	---

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Milena Stošić
Mentor: MN	Dr. Jelena Marković, assistant professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Title: XI	Effect of acrylamide treatment on endocrine pancreas of the rats
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad, Republic of Serbia
Physical description: PD	(chapters: 7 / pages: 125 / figures: 53 / tables: 3 / references: 477)
Scientific field: SF	Biology
Scientific discipline: SD	Histology with embriology
Subject, Key words: SUC	acrylamide, islets of Langerhans, pancreas, insulin, glucagon, iNOS, CYP2E1, SOD1,

	SOD2, CAT, oxidative stress
Holding data: HD	The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad, Republic of Serbia
Note: N	None
<p>Abstract: AB</p> <p>Acrylamide is a toxic chemical used as an important monomer for various industrial and laboratory purposes, which makes it highly present in the environment. In the last fifteen years, acrylamide has become especially interesting for wider scientific circles when it was found in staple foodstuff rich in starch, prepared at temperatures higher than 120°C. The established negative health effects of acrylamide are very diverse and can be the result of the acrylamide action itself or the action of its metabolite glycidamide that occurs <i>in vivo</i>, when acrylamide molecule is metabolized via oxygenation of the double bond by the cytochrome P450 2E1 (CYP2E1).</p> <p>Acrylamide is a substance with a proven adverse effect on humans and animals, and it is classified as a possible human carcinogen. The negative effect of acrylamide on the exocrine pancreas has already been recognized, but the possible effects of acrylamide on endocrine pancreas are still mostly undetermined. There is a significant amount of evidence to suggest that acrylamide exerts a cytotoxic effect which manifests through the changes in level of oxidative and nitrosative stress biomarkers, as well as in the activity of antioxidant enzymes.</p> <p>Since, pancreas is one of the target organs for acrylamide, the main subject of doctoral thesis was to investigate the potential effect of acrylamide on the rat endocrine pancreas. The investigation was conducted on 3 experimental groups of juvenile male Wistar rats, of which one group was the control group, while two groups were treated with acrylamide at doses of 25 mg/kg bw and 50 mg/kg bw, 5 days a week, during 3 weeks. After termination of the treatment, decapitation was performed, and the complete pancreatic tissue was fixed in a 10% formalin solution for 24 h and treated according to the standard paraffin embedding procedure. Paraffin molds were cut into 5 µm thick serial sections, after which they were stained with histochemical and immunohistochemical methods.</p> <p>Histological changes of the endocrine pancreas, with the emphasis on α- and β-cells, were examined in three experimental groups of rats. In addition, the expression of insulin and glucagon hormone, the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and CYP2E1 enzymes, and the expression of antioxidative enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutases 1 and 2 (SOD1 and SOD2) in the islets of Langerhans were also investigated. A potential change in the functionality of β-cells was also examined by analyzing glucose level in the serum of rats treated with acrylamide.</p> <p>In pancreatic islets of Langerhans the majority of cells (>80%) are β-cells. Therefore, in addition to <i>in vivo</i> experiments, the toxicity of acrylamide was examined <i>in vitro</i> on rat insulinoma Rin-5F cell line.</p>	

The main goal of *in vitro* research was to investigate the impact of increasing acrylamide concentrations on the viability of treated Rin-5F cells, and also to examine whether IC₅₀ concentration of this substance, applied at different intervals of time (0.5, 1, 3, 6, 12 and 24 h), induce oxidative and nitrosative stress.

Redox-status of Rin-5F cells treated with acrylamide was examined by analyzing oxidative and nitrosative stress biomarkers, CAT and total SOD activity, as well as changes in the expression of the CAT, SOD1, SOD2 and iNOS. In addition, the effect of the same treatment on the transcription of the insulin, CYP2E1, Bax and Bcl-2 gene was analyzed. The results of the thesis showed that acrylamide treatment does not lead to significant changes in the histological structure, diameter and number of islets of Langerhans of treated animals. Application of stereological methods indicated microstructural changes of α - and β -cells of endocrine pancreas. It has been shown for the first time that treatment with acrylamide negatively affects the number and surface area of pancreatic β -cells. In addition, a significant dose-dependent decline in the amount of insulin in pancreatic β -cells was also demonstrated. However, no change in serum glucose level was observed in treated animals.

Acrylamide treatment led to a statistically significant increase in the number of α -cells in animals receiving a lower dose of treatment, while the number of α -cells in animals receiving a higher dose of treatment did not differ significantly from the control. Treatment with acrylamide led to a significant increase in the amount of the glucagon in α -cells.

Treatment with acrylamide did not cause a significant change in the expression of CAT, SOD1 and SOD2 in islets of Langerhans. However, there was a significant dose-dependent increase in the expression of iNOS enzyme, whereas expression of CYP2E1 significantly decreased in dose-dependent manner in treated animals.

Results of the thesis showed that acrylamide exerts a negative effect on the viability of Rin-5F cell line. It has been established that the IC₅₀ concentration of acrylamide for the Rin-5F cell line is 10 mM. The results of the thesis indicate that treatment of Rin-5F cell line with IC₅₀ concentration of acrylamide for 1, 12, and 24 h significantly increased the level of malondialdehyde (MDA). Exposure to acrylamide for 1, 3, 6, 12 and 24 h significantly decreased the level of reduced GSH, while the level of free -SH groups was reduced after 3 and 6 h of acrylamide treatments. Treatment with IC₅₀ concentration of acrylamide significantly enhanced CAT activity after 1 h of acrylamide exposure, while 12 h exposure significantly reduced the activity of this enzyme. Application of acrylamide reduced SOD activity after 1, 12, and 24 h exposure, while 6 h exposure significantly increased the activity of SOD enzymes. Results of the thesis also showed a very significant increase of the nitrite level, which is directly proportional to the level of nitrogen oxide (NO) and the level of the iNOS activity. This finding points to the potential occurrence of nitrosative stress in acrylamide-treated Rin-5F cells.

It has been shown for the first time that acrylamide treatment leads to significant variations in transcription of iNOS, SOD1, SOD2, CAT, CYP2E1, Bax and Bcl-2 genes in treated Rin-5F cells, while the same treatment does not affect transcription of the insulin gene. Treatment with acrylamide at a concentration of 10 mM for increasing periods of time leads to an increase in the relative amount of the iNOS gene iRNA at all treatment points. Twelve and 24 h of acrylamide exposure increased the transcription of the SOD1 and SOD2 genes. Transcription of CAT gene was increased after 3 h of

acrylamide exposure. Furthermore, it has been shown that acrylamide treatment leads to variations in the mRNA synthesis of CYP2E1 gene, which is particularly significant in the context of detoxification of this toxic substance. An increase in the transcription of the CYP2E1 gene was observed after 0.5 and 1 h of acrylamide exposure, while the reduction of transcription occurred after 12 and 24 h of acrylamide exposure. The treatment with 10 mM acrylamide has led to an increase of the transcription of the Bax gene at all treatment points, and also to an increase of transcription of the Bcl-2 gene after of 0.5, 1, and 3 h of acrylamide exposure.

Summarizing all the results of this thesis, it can be concluded that the endocrine pancreas is one of the target tissues of acrylamide, to which this substance exerts a multiple adverse effects.

Accepted by the Scientific Board on:

24. 7. 2017.

Defended:

Thesys Defend Board:

President:

dr. Milica Matavulj, Full Professor in retirement, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Mentor:

dr. Jelena Marković, Assistant Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Member:

dr. Verica Milošević, Senior Scientist, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade

Member:

dr. Danijela Kojić, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Member:

dr. Gordana Ušćebrka, Full Professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

Member:

dr. Mirjana Vojinović Miloadov, Professor Emeritus, Faculty of Technical Sciences, University of Novi Sad