



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



Ivana Koledin

**STRUKTURNE PROMENE SLUZOKOŽE
DEBELOG CREVA PACOVA POD UTICAJEM
AKRILAMIDA**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2016. godine

*Zahvaljujem se svima koji su doprineli
izradi moje doktorske disertacije.*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. FIZIČKE I HEMIJSKE OSOBINE AKRILAMIDA	2
1.1.1. Industrijsko dobijanje i upotreba akrilamida	2
1.2. AKRILAMID U ČOVEKOVOM OKRUŽENJU	3
1.2.1. Način izlaganja ljudi akrilamidu	3
1.2.2. Akrilamid u hrani	4
1.2.2.1. Formiranje akrilamida u hrani	4
1.2.2.2. Zastupljenost akrilamida u prehrambenim proizvodima ..	6
1.2.2.3. Izloženost akrilamidu iz hrane	7
1.2.3. Metabolizam akrilamida	8
1.3. BIOLOŠKI EFEKTI AKRILAMIDA	9
1.3.1. Pregled literature	9
1.3.2. Efekti akrilamida na kolon	13
1.4. ANATOMIJA, HISTOLOGIJA I FUNKCIJA GASTROINTESTINALNOG SISTEMA	15
1.4.1. Anatomija gastrointestinalnog sistema	15
1.4.2. Histologija gastrointestinalnog sistema	16
1.4.3. Histološke specifičnosti sluznice kolona	18
1.4.4. Epitel debelog creva	18
1.4.4.1. Peharaste ćelije i mucini	21
1.4.4.2. Funkcionalna svojstva mucina i mukusnog sloja	24
1.4.5. GALT	26
1.4.5.1. Limfociti	27
1.4.5.2. Eozinofili	28
1.4.5.3. Mastociti	30
1.5. HOMEOSTAZA SLUZNICE DEBELOG CREVA	31
2. CILJ RADA	35
3. MATERIJAL I METODE	37
3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	38
3.2. EKSPERIMENTALNI PLAN	38
3.2.1. Subhronični eksperiment	38
3.2.2. Akutni eksperiment	39
3.3. HISTOLOŠKA ANALIZA UZORAKA KOLONA	39
3.3.1. Histološka obrada uzoraka kolona	39
3.3.2. Metode bojenja	39
3.3.2.1. Klasične i histohemijske metode bojenja	39
3.3.2.2. Procedura za imunohistohemijska bojenja	40
3.4. ANALIZA REZULTATA	40
3.4.1. Semikvantitativna analiza uzoraka kolona	40
3.4.1.1. Analiza peharastih ćelija i sadržaja mucina u uzorcima kolona	40
3.4.1.2. Analiza limfocita u uzorcima kolona	41
3.4.2. Kvantitativna analiza uzoraka kolona	42
3.4.2.1. Stereološka analiza zida kolona	42
3.4.2.2. Analiza broja mastocita u uzorcima kolona	43

3.4.2.3. Analiza broja eozinofila u uzorcima kolona	44
3.4.3. Statistička obrada podataka	44
4. REZULTATI	45
4.1. REZULTATI SUBHRONIČNOG IZLAGANJA AKRILAMIDU	46
4.1.1. Morfologija debelog creva	46
4.1.2. Peharaste ćelije i sadržaj mucina	52
4.1.2.1. PAS-AB	52
4.1.2.2. HID-AB	56
4.1.2.3. MUC2	59
4.1.3. Limfociti	61
4.1.4. Eozinofili	62
4.1.5. Mastociti	64
4.1.5.1. TB pozitivni mastociti	64
4.1.5.2. HID-AB pozitivni mastociti	64
4.2. REZULTATI 24 h AKUTNOG IZLAGANJA AKRILAMIDU	66
4.2.1. Peharaste ćelije i sadržaj mucina	66
4.2.1.1. PAS-AB	66
4.2.1.2. HID-AB	70
4.2.1.3. MUC2	73
4.2.2. Limfociti	75
4.2.3. Eozinofili	76
4.2.4. Mastociti	78
4.2.4.1. TB pozitivni mastociti	78
4.2.4.2. HID-AB pozitivni mastociti	78
4.3. REZULTATI 72 h AKUTNOG IZLAGANJA AKRILAMIDU	80
4.3.1. Peharaste ćelije i sadržaj mucina	80
4.3.1.1. PAS-AB	80
4.3.1.2. HID-AB	84
4.3.1.3. MUC2	88
4.3.2. Limfociti	89
4.3.3. Eozinofili	91
4.3.4. Mastociti	92
4.3.4.1. TB pozitivni mastociti	92
4.3.4.2. HID-AB pozitivni mastociti	93
5. DISKUSIJA	94
6. ZAKLJUČCI	112
7. LITERATURA	116

LISTA SKRAĆENICA

AA – akrilamid

CD – klaster diferencijacije

CNS – centralni nervni sistem

DNES – difuzni neuroendokrini sistem

DNK – dezoksirionukleinska kiselina

GALT – difuzno limfno tkivo gastrointestinalnog sistema

H&E – hematoksili i eozin

Hb – hemoglobin

Hb-A – hemoglobin-akrilamid adukt

HID-AB – high iron diamine-alcian blue

IL – interleukin

IUPAC – internacionalna unija za čistu i primenjenu hemiju

MALT – difuzno limfno tkivo sluznice

MHC – glavni histokompatibilni kompleks

MUC – mucinski gen

PAS-AB – periodic acid Schiff-alcian blue

PND – post natalni dan

PNS – periferni nervni sistem

TB – toluidin plavo

TCR – receptor T limfocita

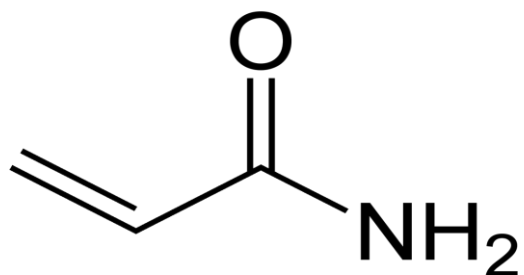
TFF – faktor tri petlje

UV – ultravioletno

1. ၂၅၀၀

1.1. FIZIČKE I HEMIJSKE OSOBINE AKRILAMIDA

Akrilamid (AA) (CAS No. 79-06-1) je nezasićeni amid akrilne kiseline, hemijske formule C_3H_5NO ($CH_2=CH-CONH_2$) (Sl. 1) i molekulske mase 71,08 g/mol. Po IUPAC-ovoj nomenklaturi AA se naziva prop-2-enamid.



Slika 1. Strukturna formula akrilamida. (<https://en.wikipedia.org>)

AA je čvrsta kristalna supstanca bele boje, bez mirisa i ukusa. Dobro se rastvara u vodi, metanolu, etanolu i acetonu, a slabije u hloroformu i benzenu (EFSA, 2015). Njegova tačka topljenja $84.5^{\circ}C$, a tačka ključanja $136^{\circ}C$. Iznad tačke topljenja monomeri AA brzo polimerizuju stvarajući poliakrilamid. Izlaganje UV zracima takođe dovodi do polimerizacije AA.

AA je biorazgradiv, postoje brojni mikroorganizmi čiji enzimi katališu sintezu i biodegradaciju AA (Duda-Chodak i sar., 2016). Neki od enzima mikroorganizama koji razgrađuju AA su: amidaze, nitril hidratataza, glutamin sintetaza i dehidrogenaza.

1.1.1. Industrijsko dobijanje i upotreba akrilamida

AA je industrijski prvi put dobijen 1893. godine u Nemačkoj, a njegova komercijalna proizvodnja i upotreba je počela 1954. godine (Eriksson, 2005). Postoje tri načina za dobijanje AA, to su: sumporno-kiselinski metod (HSDB, 2003), katalitička hidratacija akrilonitrila (IPSC, 1985) i enzimaska hidratacija.

U industriji AA ima široku primenu (NICNAS, 2002; Friedman, 2003), koristi se u proizvodnji polimera i gelova, a posebno za sintezu poliakrilamida koji je manje toksičan nego njegov monomer. Poliakrilamidni polimeri i kopolimeri se koriste u papirnoj i tekstilnoj industriji, u proizvodnji plastičnih masa i kao flokulanti za prečišćavanje otpadnih voda.

Poliakrilamid se koristi i u kozmetičkoj industriji za proizvodnju preparata za ličnu negu, kao što su losioni i dezodoransi (Exon, 2006). Polimeri AA se koriste u građevinarstvu za proizvodnju cementa i temelja pri izgradnji tunela i brana. Koriste se i za tretiranje zemljišta u cilju sprečavanja erozije i u procesu prerade ruda. AA se meša sa pesticidima i upotrebljava kao medijum za gajenje useva. Koristi se i u industriji hrane za pravljenje ambalaža za namirnice i kao aditivi u nekim prehrambenim proizvodima. Poliakrilamidni gelovi imaju široku primenu u naučnim laboratorijama gde se koriste za elektroforetsko razdvajanje proteina, DNK i drugih biomolekula.

Poslednjih decenija raste proizvodnja i upotreba AA, tako se od 1998. do 2003. godine proizvodnja AA povećala za 17 miliona kg, a zabeležen je i porast u broju proizvođača AA (Parzefall, 2008; HHS, 2011).

1.2. AKRILAMID U ČOVEKOVOM OKRUŽENJU

Još 1994. godine AA je klasifikovan kao potencijalno kancerogena supstanca za ljude (IARC, 1994), a posle 2002. godine kada je otkriveno da se formira tokom termičke obrade hrane (Tareke i sar., 2002) zabrinutost je podignuta na još viši nivo. Posebno zabrinjava njegovo prisustvo u hrani koju ljudi širom sveta svakodnevno rado konzumiraju.

1.2.1. Načini izlaganja ljudi akrilamidu

Ljudi su izloženi AA na nekoliko načina:

1. Preko zemljišta – AA se u zemljištu može naći zbog njegove primene za izgradnju tunela, brana i sl. U zemljištu AA relativno brzo podleže biorazgradnji, posebno u aerobnim zemljištima (Duda-Chodak i sar., 2016), ali postoji opasnost ako ljudi dođu u kontakt sa zemljištem koje je kontaminirano sa AA.
2. Putem vode – AA ima široku primenu u procesu prečišćavanja otpadnih voda, kao i za tretman vode za piće. Kao i u zemljištu i u vodi postoje bakterije koje imaju sposobnost da razlažu AA. Bez obzira na biodegradaciju AA prisutnog u vodi ovo je

- jedan od čestih načina na koji ljudi dolaze u kontakt sa ovom supstancom (Friedman i Mottram, 2005).
3. Putem vazduha – količina AA u atmosferskom vazduhu je mala, ali veliku opasnost predstavljaju pušači, kako za sebe tako i za svoju okolinu. Pokazano je da duvan sadrži 62 - 756 ng/g AA (McAdam i sar., 2015), a u duvanskom dimu je procenjeno da ima 1.1 – 2.34 µg po cigareti (Smith i sar., 2000)
 4. Dermalni kontakt – koža ljudi dolazi u kontakt sa AA ukoliko je on prisutan u njihovom radnom okruženju. Posebno su ugroženi radnici u fabrikama koje proizvode AA, radnici u drugim granama industrije koje kao sirovinu koriste AA, kao i ljudi koji su zaposleni u laboratorijama u kojima se koriste poliakrilamidni gelovi. Neurotoksični efekat AA kod ljudi je i dokazan upravo kod radnika koji su radili sa AA (Pennisi i sar., 2013).
 5. Putem hrane – ovom vidu kontakta sa AA su izloženi svi ljudi na našoj planeti, koji konzumiraju termički obrađenu hranu, te njemu posvećujemo posebnu pažnju.

1.2.2. Akrilamid u hrani

1.2.2.1. Formiranje akrilamida u hrani

Švedski naučnici su 2002. godine otkrili da se AA spontano formira tokom termičke obrade hrane bogate skrobom (Tareke i sar., 2002) i od tada AA je u fokusu svetskih istraživanja.

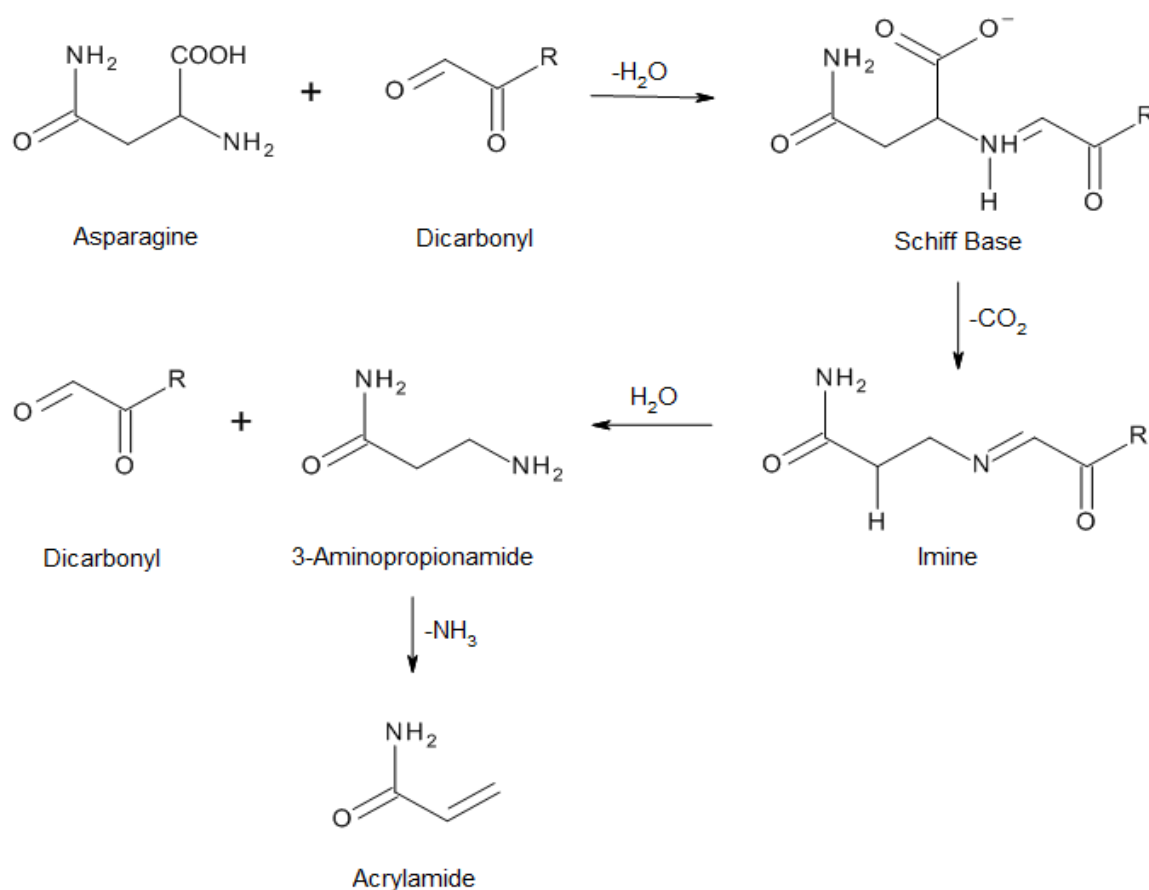
AA se u hrani formira tokom neenzimatske reakcije tamnjenja koja se jos naziva i Malardova (*engl. Maillard*) reakcija (Sl. 2) (Friedman, 2003; Tuohy i sar., 2006). Malardova reakcija se dešava prilikom termičke obrade (pečenje, prženje) hrane iznad 120°C. U hrani bogatoj ugljenim hidratima prilikom pečenja dolazi do kondenzacije amino grupe aminokiseline asparagina i karbonilne grupe redukujućih šećera (glukoza, fruktoza) pri čemu nastaje AA. Malardova reakcija predstavlja kaskadnu reakciju u kojoj pored AA nastaje i niz drugih jedinjenja koja hrani daju karakterističan miris, ukus i aromu što pozitivno utiče na senzorne karakteristike hrane.

Tokom Malardove reakcije dolazi do gubitka esencijalnih aminokiselina, nekih vitamina i metala (Tuohy i sar., 2006). Oni se vezuju za produktne Malardove reakcije i tako gube svoja svojstva, postaju nepristupačni ili teško svarljivi za organizam.

Asparagin i redukujući šećeri su glavni prekursori za nastanak AA u Malardovoj reakciji. Asparagin je slobodna aminokiselina prisutna u velikim količinama u krompiru (93,9 mg/100

g) (Friedman, 2003) pa stoga i najveće količine AA nastaju termičkom obradom krompira. U prehrambenoj industriji i poljoprivredi radi se na selekciji kultivara sa niskim sadržajem asparagina kako bi se tokom termičke obrade hrane formirale manje količine AA (Friedman, 2003). Utvrđeno je da je i sadržaj šećera u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom AA u termički obrađenim proizvodima od krompira (Silva i Simon, 2005).

Sinteza AA zavisi od raznih fizičkih i hemijskih parametara, a najvažniji su dužina i temperatura na kojoj se hrana termički obrađuje. Duže pečenje na višoj temperaturi pospešuje Malardovu reakciju kao i degradaciju skroba na monosaharide što dovodi do povećane produkcije AA (Duda-Chodak i sar., 2016). Količina vode u hrani koja se termički obrađuje, takođe, utiče na količinu krajnjeg produkta reakcije, akrilamida. Pokazano je da ako se tokom pripreme keksa doda 20% vode to duplira količinu nastalog AA u poređenju sa upotrebom 15% ili 10% vode u procesu proizvodnje keksa (Duda-Chodak i sar., 2016).



Slika 2. Malardova reakcija (<https://en.wikipedia.org>)

Osim u Malardovoj reakciji AA može nastati na još nekoliko načina (Lingnert i sar., 2002). U tim reakcijama akrilna kiselina i akrolein su glavni prekursori AA. Neki od mogućih

alternativnih načina nastanka AA su: oksidacija triglicerida, degradacija aminokiselina i proteina, degradacija ugljenih hidrata.

Postoji veliki broj istraživanja iz oblasti tehnoloških nauka koja imaju cilj da pronađu načine za redukciju sinteze AA u prehrambenoj industriji.

1.2.2.2. Zastupljenost akrilamida u prehrambenim proizvodima

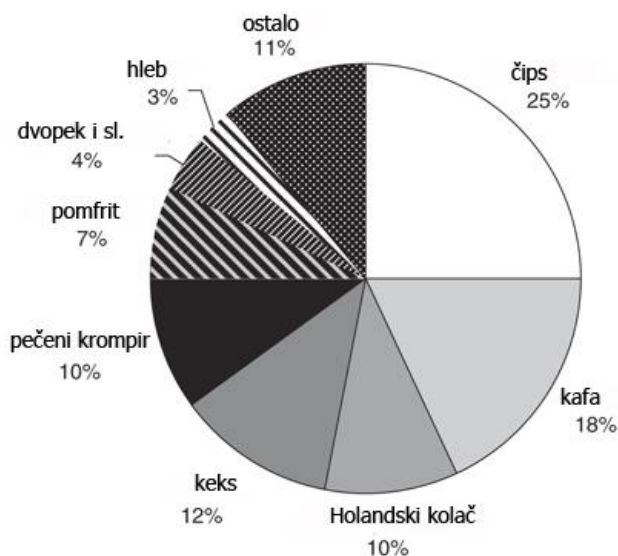
Od 2002. godine do danas postoje brojni radovi i studije koje su pokušale da odrede količinu AA u velikom broju prehrambenih proizvoda (Tab. 1). Generalno je ustanovljeno da procenat AA u hrani zavisi od vrste proizvoda, proizvođača kao i zemlje porekla hrane. Ohrabruje podatak da je zabeležen pad u procentu AA u hrani od njegovog otkrića do danas (EFSA, 2015) verovatno zahvaljujući unapređenju tehnološkog procesa obrade hrane u prehrambenoj industriji (Friedman, 2015).

Tabela 1. Koncentracija akrilamida u nekim prehrambenim proizvodima (EFSA, 2015)

Vrsta hrane	Koncentracija akrilamida (µg/kg)
Grickalice od krompira	308
Pomfrit	239 - 368
Čips	283-519
Hleb	40-64
Žitarice za doručak	102-211
Biskviti i krekeri	171-407
Kafa	249-522
Zamene za kafu	1499
Hrana za bebe	12-24
Pečeni lešnici	93
Suve šljive	89
Testenina	13
Pivo	14

Zbog različitih prehrambenih navika postoje razlike u konzumiranju namirnica koje predstavljaju izvor AA kod odraslih ljudi i kod dece. Takođe se razlikuje unos AA kod žena i muškaraca, kod pušača i nepušača. U zavisnosti od navika u ishrani razlikuje se prosečan unos AA od zemlje do zemlje.

Glavni izvori AA kod odraslih ljudi (Sl. 3) su: kafa i proizvodi od krompira. Kod dece i adolescenata najveći udeo hrane sa AA čine: proizvodi od krompira, biskviti i krekeri (Friedman, 2015). Zabrinjavajuća je činjenica da se AA nalazi i u hrani za bebe, kao što su: adaptirano mleko, kašice i sokovi.



Slika 3. Udeo namirnica sa akrilamidom u ishrani ljudske populacije. (Konings, 2010)

1.2.2.3. Izloženost akrilamidu iz hrane

Procena izloženosti ljudske populacije AA otkrila je da su deca (0-7 god.) najugroženija. Prosečan dnevni unos AA kod dece je između 0.5 i 1.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne težine, dok je njegov prosečan unos kod mladih i odraslih 0.4-0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne težine po danu (EFSA, 2015). Izloženost dece AA iz hrane je za 50% veća u odnosu na odrasle (Heudorf i sar., 2009). Potvrđeno je i da su deca koja su bila izložena duvanskom dimu kod kuće imala veću količinu produkata metabolizma AA u urinu (Ji i sar., 2013).

Utvrđeno je da su muškarci izloženiji AA iz hrane nego žene. Kod muškaraca je prosečan dnevni unos AA 38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne težine, a kod žena 29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesne težine (Dybing i Sanner, 2003).

U svim studijama koje su se bavile procenom razlika u izloženosti AA pokazano je da su pušači ugroženiji nego nepušači. Pelucchi i sar. (2015) su primetili da je incidenca renalnog kancera veća kod pušača u odnosu na nepušače, dok su Hirvonen i sar. (2010) ustanovili da kod pušača postoji pozitivna korelacija između unosa AA i pojave kancera pluća. Jedan od parametara izloženosti AA je merenje nivoa AA vezanog za Hb, i on je bio 4 puta viši kod pušača za razliku od nepušača (Schettgen i sar., 2003; Parzefall, 2008).

Navike u ishrani bitno utiču na izloženost AA iz hrane. Španci (0.2 µg/kg) i kinezi (0.3 µg/kg) imaju najmanji unos AA putem hrane, za razliku od stanovnika Velike Britanije (0,61 µg/kg) i Irske (0.59 µg/kg) koji hranom unose duplo više AA od španaca i kineza. Iako kinezi imaju najmanju stopu unosa AA hranom, primećeno je povećanje unosa AA za 70% u periodu od 2000. do 2016. godine (Gao i sar., 2016).

1.2.3. Metabolizam akrilamida

AA se u organizam može uneti inhalacijom, preko kože i putem gastrointestinalnog trakta. Oralno uneti AA se brzo apsorbuje, njegova bioraspodivnost iznosi 30-44% ako se unese hranom, a 60-98% ako se unese vodom. Prilikom ekspozicije kože apsorpcija AA je znatno sporija i iznosi 6.6% (Hays i Aylward, 2008).

Nakon apsorpcije moguća su dva metabolička puta AA, može doći do njegove konjugacije sa redukujućim glutationom ili do oksidacije, uz učešće enzima citihroma P450 2EI, do glicidamida (Sumner i sar., 1999). Pokazano je da je glicidamid mnogo toksičniji nego AA. Step konverzije AA u glicidamid varira kod različitih vrsta (Shipp i sar., 2006). Kod ljudi oksidacija AA do glicidamida je slabo zastupljena, kod pacova ona čini 30% njegovog metaboličkog puta, a kod miševa čak 60% (Duda-Chodak i sar., 2016).

Najveća količina metabolisanog AA izlučuje se urinom (40-70%), a njegov glavni metabolit je merkapturična kiselina. Manji deo unetog AA se izbacuje fekalno (5-6%), putem žuči (15%) i izdahnutim vazduhom (6%) (JIFSAN/NCFST, 2002). Prisustvo merkapturične kiseline u urinu se koristi kao indikator izloženosti AA (Boettcher i Angerer, 2005), a najviše se koristi u biomonitoring studijama u kojima se procenjuje izloženost ljudske populacije AA.

Bakterije koje naseljavaju digestivni trakt (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus clausii*, *Helicobacter pylori*) sintetišu enzim amidazu koji učestvuje u biodegradaciji AA, to znači da u ljudskom organizmu potencijalno može postojati mehanizam za degradaciju AA (Duda-Chodak i sar., 2016).

Poslednjih godina sve je više radova koji se bave protektivnim efektom antioksidanata iz hrane na oštećena nastala delovanjem AA. Pokazano je da aktivni sastojak iz maslinovog ulja smanjuje štetne efekte oksidativnog stresa izazvanog od strane AA (Rodriguez-Ramiro i sar., 2011a), dok riblje ulje sprečava apoptozu neurona u cerebralnom korteksu (Lakshmi i sar., 2012). Dokazano je protektivno dejstvo nekoliko vrsta začinskog bilja (Cao i sar., 2008;

Prasad i Muralidhara, 2013), kakao praha (Rodriguez-Ramiro i sar., 2011b), kao i aktivnog sastojka iz tamnog soja sosa (Xichun i Min'ai, 2009). Pozitivan efekat belog luka na reparaciju oštećenja nastalih delovanjem AA pokazan je u nekoliko studija (Taubert i sar., 2006; Zhang i sar., 2012; Zhang i sar., 2013). Postoji više radova koji dokumentuju antioksidativni efekat velikog broja voća, pa tako zaštitnu ulogu od oštećenja nastalih dejstvom AA imaju: grožđe, borovnice, kikiriki, jagode (Alturfan i sar., 2012; Zhao i sar., 2015), kajsija (Erdemli i sar., 2015) i papaja (Sadek, 2012).

1.3. BIOLOŠKI EFEKTI AKRILAMIDA

1.3.1. Pregled literature

S obzirom na malu molekulsku masu i veliku rastvorljivost u vodi akrilamid lako prolazi kroz biološke membrane i dospeva do svih organa, kod svih do sada ispitivanih vrsta (Friedman 2003), a zahvaljujući metaboličkim transformacijama (Award i sar., 1998) ima različita (sub)celularna mesta delovanja. Takođe, AA prolazi placentalnu barijeru i dospeva do fetusa, kako kod životinja tako i kod ljudi (Schettgen i sar., 2004), a može se naći i u majčinom mleku (Sorgel i sar., 2002). Preračunato je da je količina AA u krvi novorođenčadi skoro ista kao i kod majki (Schettgen i sar., 2004).

Akrilamid ima sposobnost vezivanja za -SH, -NH₂ i -OH grupe kao i za nukleofilne centre na DNK (Segeberback i sar., 1995; Bergmark i sar., 1993; Solomon i sar., 1985). AA se vezuje i za plazma proteine, prvenstveno za hemoglobin (Hb-A) (Friedman, 2003; Catalgol i sar., 2009) što se koristi kao marker u proceni izloženosti AA (Friedman, 2003; Hagmar i sar., 2005). Perzistencija Hb-A kod pacova je 90 dana što odgovara fiziološkom "turnoveru" molekula Hb (Carere, 2006). Formiranje Hb-A kod tretiranih pacova je dozno zavisno i iznosi 12% od aplikovane doze (Carere, 2006). Količina Hb-A kod ljudi je direktno proporcionalna onoj kod pacova (Carere, 2006). Nivo Hb-A je znatno veći kod pušača nego kod nepušača (Parzefall, 2008). Prisustvo Hb-A je mereno kod radnika koji dolaze u kontakt sa AA na radnom mestu i kod svih je uočen njegov povišen nivo u odnosu na kontrolne grupe radnika koji nisu bili u kontaktu sa AA (Bergmark i sar., 1993; Hagmar i sar., 2001).

Konjugacija AA sa -SH grupom glutaciona utiče na trošenje glutaciona u ćeliji što dovodi do promena u redoks statusu ćelije (Srivastava i sar., 1986). To kasnije može uticati na ekspresiju gena, direktno ili preko transkripcionih faktora koji su redoks zavisni (Tsuda i sar., 1993). Povećana količina glutaciona zapažena je u nervu išijadikusu kod pacova što nervo tkivo čini osetljivijim na oksidativni stres (Zhu i sar., 2008). Predpostavlja se da povećanje količine glutaciona može biti glavni uzrok neuropatija.

Neurotoksičnost AA potvrđena je kod ljudi koji su bili izloženi ovoj sustanci u radnom okruženju duži vremenski period. Zapažena je ataksija, halucinacije, mamurluk, slabost skeletnih mišića i ukočenost ruku i nogu (He i sar., 1989; Spencer i Schaumburg, 1974a; Spencer i Schaumburg, 1974b). Kod građevinskih radnika koji su koristili vodootporni akrilamidni gel detektovana je reverzibilna periferna neuropatija. Ona se manifestovala u vidu utrnulosti šaka i stopala, slabosti nogu i gubitka refleksa palca stopala (Erkekoglu i Baydar, 2014). Ista studija je pokazala da se neurotoksični efekti uočavaju i pri niskim i pri visokim dozama AA, samo što je pri niskim dozama neophodan duži period izlaganja organizma AA da bi se efekti ispoljili. Navedeni podaci govore o kumulativnom dejstvu AA u ljudskom organizmu.

Morfološke studije pokazuju da je uzrok neurotoksičnosti oštećenje Purkinje-ovih ćelija i degeneracija distalnih aksona PNS-a i CNS-a (Spencer i Schaumburg, 1974a; Spencer i Schaumburg, 1974b). Neuropatološke studije su pokazale da AA dovodi do oticanja distalnog dela aksona i nakupljanja neurofilamenata i degenerisanih mitohondrija u tim regionima, što dalje dovodi do degeneracije PNS-a i CNS-a (LoPachin i Lehning, 1994). Duže izlaganje akrilamidu dovodi do atrofije aksona i njihove degeneracije (Gold i sar., 1992; Tandrup i Jakobsen, 2002). Postoje hipoteze da AA utiče na brzi aksonalni transport i neurotransmisiju (LoPachin i sar., 2002; Sickles i sar., 2007). Oštećenja terminalnih delova aksona od strane AA mogu da objasne neke neurodegenerativne promene kao što je Alchajmerova bolest (LoPachin i Gavin, 2008). Ova oštećenja dovode i do poremećaja kognitivne funkcije, oštećenja cerebralnog korteksa, talamusa i hipokampusa (Parzefall, 2008). Niske doze AA aplicirane u periodu od osam meseci utiču na sposobnost učenja kod pacova (Garey i Paule, 2010).

Kod pacova je dokazano vezivanje AA za proteine citoskeleta, pre svega mikrotubule i neurofilamente (Lapadula i sar., 1989; Yu i sar., 2005). AA utiče na ekspresiju proteina citoskeleta u nervu išijadikusu kod pacova (Zhu i sar., 2008).

Akrilamid dovodi do reproduktivne toksičnosti koja se ispoljava u smanjenoj težini mladih, smanjenom broju spermatozoida, kao i njihovoj abnormalnoj morfologiji (Sakamoto i

Hashimoto, 1986). Takođe, primećene su promene u reproduktivnom ponašanju mužjaka, smanjenoj fertlnosti i nižoj stopi trudnoće kao i poremećaji u transportu spermatozoida do uterusa (Tyl i sar., 2000). AA remeti normalan razvoj i sazrevanje muškog reproduktivnog sistema pacova (Wang i sar., 2010).

Glicidamid koji nastaje pri oksidativnoj biotransformaciji AA je reaktivniji od samog AA jer ima veći afinitet vezivanja za DNK (Friedman, 2003). Kod ljudi, pri relativno niskim dozama AA, nastaje više glicidamida nego kod pacova, verovatno zbog veće koncentracije citohroma P450 2E1 (Carere, 2006).

Vezivanje AA za DNK je izuzetno sporo (Solomon i sar., 1985), dešava se samo pri visokim dozama i dovodi do stvaranja mikronukleusa. AA za razliku od glicidamida neznatno povećava frekvencu mutacija u sisarskim ćelijama, ali zato izaziva hromozomske aberacije, razmenu sestrinskih hromatida, aneuploidiju, poliploidiju i druge poremećaje u mitozu (Carere, 2006).

AA se vezuje za kinezin i utiče na sagregaciju hromozoma i polarizaciju deobnog vretena pri veoma niskim dozama (Sickles i sar., 2007; Friedman i sar., 2008). On takođe, dovodi do oksidativnog stresa u ćelijama jetre, pluća i testisa (Yousef i El-Demardash, 2006). Predpostavlja se da AA svoj genetički efekat ispoljava kombinacijom DNK oštećenja, uticajem na mitozu i mejozu i izazivanjem oksidativnog stresa u ćeliji (Zeiger i sar., 2009) što može dovesti do razvoja tumora (Friedman, 2003).

AA je jedna od retkih hemikalija koja dovodi do mutacija u germinativnim ćelijama, što je potvrđeno istraživanjima koja su vršena na glodarima. Jedna aplicirana doza AA pokazala je nepravilnosti u sintezi testikularne DNK (Sega i sar., 1990). Parenje mužjaka tretiranih AA sa netretiranim ženkama pokazalo je statistički signifikantno povećanje frekvence hromozomskih aberacija kod zigota. Ispitivanjem ćelijske populacije testisa istih mužjaka uočeno je povećanje broja tetraploidnih ćelija, elongacija kao i hromozomska sagregacija (Pacchierotti i sar., 1994). Takođe je pokazano povećanje broja aneuploidije, hromozomalni prekidi (chromosome breaks) i razmene sestrinskih hromatida na nivou spermatogonija (Shiraishi, 1978) kao i statistički signifikantnog povećanja broja mikronukleusa kod spermatida (Lahdetie i sar., 1994; Manjanatha i sar., 2006). Više studija izvedenih na miševima pokazuje povećanu frekvencu naslednih translokacija (Russell i sar., 1991; Adler, 1990; Adler i sar., 1994; Shelby i sar., 1987; Generoso i sar., 1996). Kod miševa je detektovano postojanje manjih i većih genskih lezija i lokusnih mutacija na nivou spermatida (Russell i sar., 1991). Delovanje AA i glicidamida na spermatogenezu može se objasniti između ostalog i njihovim vezivanjem za kinezin, protamine kao i proteine deobnog vretena

(Tyl i sar., 2003; Tyl i sar., 2000; Segal i sar., 1989). AA ostvaruje efekat na spermatogenezu i preko delovanja na vijabilnost Leydig-ovih ćelija i nivo testosterona (Yang i sar., 2005; Camacho i sar., 2012).

Kod miševa i pacova detektovano je prisustvo glicidamid-guanin DNK adukta (Segeberck i sar., 1995). Količina ovog adukta bila je veća kod miševa nego kod pacova iz razloga što se kod miševa više AA konvertuje u glicidamid u odnosu na pacove. Prisustvo DNK adukta detektovano je u više različitih organa samo 6 h nakon tretmana.

Kod miševa je uočeno prisustvo mikronukleusa u eritrocitima periferne krvi i koštanoj srži pri niskim dozama AA (Zeiger i sar., 2009). Broj mikronukleusa je dozno zavistan, a mala količina DNK u mikronukleusima ukazuje na klastogeni mehanizam (*chromosome breaking*) (Abramsson-Zetterberg, 2003) delovanja AA. Mikronukleusi u koštanoj srži pacova detektovani su samo pri visokim dozama AA (Yener i Dickmenli, 2009). Signifikantno povećanje mikronukleusa uočeno je u limfocitima humane krvi, ali samo pri visokim dozama, dok je vezivanje za Hb primećeno i kod niskih doza AA i glicidamida. Može se zaključiti da AA ne izaziva genotoksičnost kod ljudi pri niskim dozama (Baum i sar., 2005; Koyama i sar., 2006).

Grupa naučnika iz Egipta ustanovila je da prenatalna i perinatalna aplikacija AA utiče na razvoj i maturaciju jetre mladunaca (Allam i sar., 2010). Količina lipida i holesterola je bila povećana kod tretiranih životinja što predstavlja biomarker oštećenja jetre. Predpostavlja se da je uzrok povećanju ukupnih lipida povećana sinteza plazma lipoproteina i visoka mobilizacija proteina iz jetre. Takođe je primećeno smanjenje količine albumina u serumu kao posledica lezije jetre pod uticajem AA.

AA ima dokazano kancerogeno dejstvo kod glodara, dok kod ljudi nije dokazana veza između unosa AA i tumorogeneze (Pelucchi i sar., 2006; Mucci i Wilson, 2008). Na F344 pacovima rađene su dve velike studije u trajanju od dve godine (Johnson i sar., 1986; Friedman i sar., 1995). Kod mužjaka je potvrđeno postojanje benignih adenoma folikularnih ćelija tireoidne žlezde pri visokim dozama, kao i testikularnih mezotelioma pri niskim dozama AA. Zapaženo je i nesignifikantno povećanje malignih astrocitoma u kičmenoj moždini i mozgu, kao i proliferacija glija ćelija u mozgu što ukazuje na početni stadijum tumorogeneze. Kod ženki je dokazano značajno povećanje broja adenokarcinoma uterusa i benignih papiloma usne duplje, kao i statistički značajno povećanje benignih i malignih tumora mlečne žlezde i benignih adenoma hipofize. Kod mužjaka je registrovano povećanje incidence benignih tumora adrenalne žlezde. Kod miševa oba pola je primećeno povećanje broja adenoma i karcinoma pluća kao i tumora kože samo kod ženki (Bull i sar., 1984a; Bull i sar., 1984b).

Epidemiološke studije vršene na ljudima koji su bili izloženi akrilamidu na radnom mestu, kao i kohortne studije, nisu uspele da dokažu vezu između izloženosti AA i povećanog rizika od kancera. Praćena je pojava tumora velikog broja organa: usna duplja, farings, larings, esofagus, kolon, rektum, jajnici, prostata (Pelucchi i sar., 2006), bubrezi (Mucci i sar., 2004), mokraćna bešika (Mucci i sar., 2003) i tireoidna žlezda (Dourson i sar., 2008). Slaba veza nađena je između kancera pankreasa i AA (Marsh i sar., 1999). Lujan-Barroso i sar. (2014) su pokazali da unos AA ne predstavlja značajan faktor rizika za pojavu kancera ezofagusa. U vezi kancera dojki postoje oprečni podaci, Mucci i sar. (2005) su ustanovili da nema povezanosti između dijetarnog unosa AA i pojave kancera dojki, dok su Olesen i sar. (2008) ustanovili pozitivnu zavisnost nivoa Hb-A i kancera dojki. Hirvonen i sar. (2010) su ustanovili da kod muškaraca pušača u Finskoj postoji pozitivna korelacija između unosa AA i kancera pluća. Pozitivna korelacija je potvrđena i kod kancer prostate kod muškaraca koji su konzumirali pečenu hranu više puta tokom nedelje u odnosu na one koji su takvu hranu jeli ređe od jednom nedeljno (Stott-Miller i sar., 2013). Najnovija analiza izvršena 2015. godine od strane italijanskih naučnika (Pelucchi i sar., 2015) potvrdila je sve dosadašnje nalaze o nepostojanju veze između unosa AA i pojave kancera kod ljudi. Oni su zapazili malo povećanje učestalosti renalnog kancera, kao i ovarijalnog kancera i kancera endometrijuma kod žena nepušača. Autori su primetili da je pušenje glavni faktor rizika za pojavu renalnog kancera. Rezultati dobijeni nakon jedanaestogodišnjeg ispitivanja su pokazali da AA nije povezan sa rizikom od epitelijalnog ovarijalnog kancera (Obón-Santacana, 2015). Svetska zdravstvena organizacije je procenila da unos AA u vrednost od 0.14 g/kg telesne težine tokom celog života povećava rizik od kancera za 1:10000 (Friedman, 2015). Kod životinja akrilamid se povezuje sa neurotoksičnošću, kancerogenezom i reproduktivnom toksičnošću, dok je u humanoj populaciji jedino dokazana neurotoksičnost (LoPachin i Gavin, 2008; Pennisi i sar., 2013) kao i prisustvo Hb-A u krvi.

1.3.2. Efekti akrilamida na kolon

Postoji mali broj radova koji se bave uticajem akrilamida na debelo crevo i to uglavnom sa aspekta kancerogenog efekta AA na kolon. Tokom eksperimenta koji je trajao dve godine ispitivan je hronični uticaj AA iz vode na mužjake i ženke Fišer 344 pacova, pokazano je da kolon nije target organ za delovanje AA (Johnson i sar., 1986). Do sličnih zaključaka došli su i naučnici koji su ispitivali uticaj AA u pijaćoj vodi tokom celog životnog veka Fišer 344

pacova (Friedman i sar., 1995). Međutim, Olstørn i sar. (2007) su vršili istraživanja na miševima i došli su do zaključka da AA ima slabu ali signifikantnu tumorogenu aktivnost na debelo crevo. Zhang (2009) je izveo eksperiment u kome je intraperitonealno davao AA pacovima tokom 8 nedelja u dozi od 10 mg/kg telesne težine i našao da AA dovodi do formiranja aberantnih kripti crevnog žlezdanog epitela (*aberrant crypt foci*). Navedene formacije predstavljaju prvu fazu u kancerogenezi kolona i javljaju se pre formiranja polipa i adenokarcinoma (Badžek i sar., 2012). Da AA dovodi do formiranja aberantnih kripti crevnog žlezdanog epitela došao je i Xichun (2009) iste godine kao i Zhang. Za razliku od većine dotadašnjih autora, Zhang i Xichun zaključuju da AA ima direktno i nezavisno kancerogeno dejstvo na kolon pacova. Raju i sar. (2011) su došli do nalaza da AA u hrani, u dozi (5, 10 i 50 mg/kg) koja je ranije pokazana da dovodi do tumorogeneze na drugim organima pacova, ne povećava rizik od pojave kolorektalnog kancer. Ista grupa autora je ispitivala i uticaj AA na kolon pacova u dozama (0.5, 1.0 i 2.0 mg/kg) koje su slične preračunatim količinama AA u ljudskoj ishrani i došli su do istog zaključka da AA ne može da ima samostalno kancerogeno dejstvo na debelo crevo (Raju i sar., 2013). Oni su pokazali da je AA, kod pacova koji su tretirani sa azoksimetanom (dokazani kancerogen debelog creva pacova) i AA u dozama od 2 mg/kg i 5 mg/kg telesne težine, doveo do povećanja broja aberantnih kripti crevnog žlezdanog epitela što ukazuje na mogući ko-kancerogeni efekat AA na kolon. Inaktivacija tumor-supresujućeg gena (APC) i aktivacija proto-onkogen (KRAS) se smatraju ključnim događajem u inicijaciji i progresiji kolorektalnog kancera. Hogervorst i sar. (2014) su pokazali da AA izaziva mutacije u KRAS genu kod muškaraca i APC genu kod žena izlaganih AA i na osnovu toga su zaključili da AA može biti uzročnik kolorektalnog kancera kod ljudi.

Kada su u pitanju epidemiološke studije velika pažnja je posvećena pojavi kolorektalnog kancera (Mucci i sar., 2003; Mucci i sar., 2006; Hogervorst i sar., 2008; Larsson i sar., 2009; Hirvonen i sar., 2010) ali nije potvrđena veza između AA i tumorogeneze.

1.4. ANATOMIJA, HISTOLOGIJA I FUNKCIJA GASTROINTESTINALNOG SISTEMA

1.4.1. Anatomija gastrointestinalnog sistema

Digestivni sistem obuhvata sve organe uključene u varenje, transport i apsorpciju hranjivih materija. Sastoji se od digestivnog trakta i pridodatih žlezda. Digestivni trakt je duga izuvijana cev koja počinje ustima a završava se anusom. Sastoji se od: usne duplje, ždrelo, jednjaka, želuca, tankog i debelog creva. Digestivnoj cevi pridodate su i žlezde: pljuvačne žlezde, jetra, pankreas i žučna kesa. Gastrointestinalni sistem u užem smislu čine želudac i creva.

Želudac je kesasto proširenje digestivnog kanala. Sa anatomskog aspekta razlikuju se četiri regiona: pars cardiaca, fundus ventriculi, corpus ventriculi i pars pilorica. Razlike između slojeva uslovljene su drugačijom gradnjom sluznice i mišićnog sloja.

Tanko crevo se pruža od želuca do debelog creva, a sastoji se od tri anatomski segmenta: dvanaestopalačno crevo (duodenum), prazno crevo (jejunum), usukano crevo (ileum).

Duodenum je početni, najkraći i najširi deo tankog creva. Počinje od pilorusa, obilazi glavu i vrat pankreasa i nastavlja se u jejunum. Anatomski je podeljen na 4 dela: gornji deo (pars superior), nishodni deo (pars descendens), donji deo (pars transverse) i ushodni deo (pars ascendens) (Gray, 1974). Nishodni deo duodenuma je u kontaktu sa izvodnim kanalima jetre i pankreasa. Na prelazu duodenuma u jejunum nalazi se Treitzov mišić.

Jejunum i ileum predstavljaju slobodne, pokretne delove tankog creva koji se jednim imenom nazivaju jejunoileum. Jejunoileum je smešten u peritonealnom delu trbušne duplje i mezenterama je spojen za zadnji deo trbušnog zida.

Debelo crevo počinje od ileocekalnog otvora, na kome se nalazi zalistak koji sprečava vraćanje sadržaja iz debelog u tanko crevo. Sastoji se od: slepog creva (caecum), crvuljka (appendix vermiformis), sitog creva (colon) i čmarnog creva (rectum). Kolon se dalje deli na: uzlazno debelo crevo (colon ascendens), poprečno debelo crevo (colon transversum), silazno debelo crevo (colon descendens) i zavijeno debelo crevo (colon sigmoideum). Kod pacova ne postoji zavijeno debelo crevo (DeSesso i Jacobson, 2001). Čmarno crevo je završni segment digestivnog sistema i sastoji se iz rektuma u užem smislu i analnog kanala koji se završava analnim otvorom.

Imajući u vidu razliku u prosečnoj telesnoj masi čoveka (70 kg) i pacova (0.25 kg) dužina intestinalnog trakta čoveka je samo 5.5 puta veća od dužine crevnog trakta pacova (DeSesso i

Jacobson, 2001). Kod pacova tanko crevo zauzima 83% intestinalnog trakta, od toga 90% otpada na jejunum, dok kod čoveka tanko crevo čini 81% od totalne dužine crevnog sistema, a samo 38% čini jejunum (DeSesso i Jacobson, 2001). Kod pacova slepo crevo predstavlja primarno mesto za mikrobijalnu digestiju i čini 26% od ukupne dužine debelog creva. Kod čoveka slepo crevo je slabije razvijeno i predstavlja samo 5% od ukupne dužine kolona (DeSesso i Jacobson, 2001).

1.4.2. Histologija gastrointestinalnog sistema

Svi organi digestivnog trakta, osim usne duplje, imaju isti plan gradje. Centralnu šupljinu, lumen, obavlja zid sastavljen od četiri sloja: sluznica (*tunica mucosa*), podsluznica (*tunica submucosa*), mišićni sloj (*tunica muscularis*) i spoljašnji sloj (*tunica serosa seu adventitia*).

Sluznica se sastoji od pokrovnog epitel (*lamina epithelialis*), vezivnog tkiva sluznice (*lamina propria*) i mišićnog sloja sluznice (*lamina muscularis mucosae*). Epitel predstavlja barijeru između spoljašnje sredine i lamine proprije i na taj način ostvaruje svoju zaštitnu ulogu. Karakteristika crevnog epitela je kratak životni vek ćelija, smatra se da dnevna stopa deobe i stvaranja novih epitelnih ćelija u crevima odgovara produkciji ćelija u koštanoj srži (Marsh, 1971). Epitelne ćelije su međusobno povezane okludentnim i adherentnim vezama koje ograničavaju promet materija između samih ćelija. U različitim delovima digestivnog trakta nalaze se različiti tipovi epitela što je u direktnoj vezi sa funkcijom određenog segmenta. U tankom i debelom crevu nalazi se jednoslojni cilindrični epitel. Neposredno ispod bazalne membrane epitela kolona nalazi se debeo sloj kolagena i proteoglikana, tzv. kolagena ploča. Kolagenu ploču sintetišu fibroblasti, a njena uloga je da promenom stepena polimerizacije kolagenih vlakana reguliše intenzitet protoka vode i elektrolita iz crevnog lumena u vaskularni sistem creva.

Laminu propriju gradi rastresito vezivo bogato krvnim i limfnim sudovima i nervima. Ponekad sadži žlezde i limfno tkivo. U lamini propriji debelog creva izostaju limfni sudovi, ali su brojni limfni folikuli. Prisustvo limfnih folikula se objašnjava prisustvom većeg broja širokim spektrom mikroorganizama kao i koncentracijom definitivnih produkata metabolizma.

Lamina muskularis mukoze je izgrađena od glatkih mišića i omogućava pokretljivost sluznice nezavisno od pokreta digestivne cevi povećavajući tako dodirnu površinu sa hranom. U debelom crevu ona je jače razvijena nego u tankom crevu.

Podsluznica sadrži umereno gusto vezivno tkivo sa krvnim i limfnim sudovima i nervnim vlaknima. U zavisnosti od regiona digestivnog trakta u submukozi se nalaze žlezde ili limfni folikuli.

Mišićni sloj je izgradjen od glatkih mišića koji su raspoređeni u dva sloja u zavisnosti od usmerenja mišićnih ćelija. Unutrašnji sloj izgrađuju mišićna vlakna koja su kružno raspoređena (*stratum circulare*) i spoljašnji sloj u kome su ćelije pretežno uzdužno orjentisane (*stratum longitudinale*). Kontrakcija mišića ova dva sloja omogućava formiranje peristaltičkih pokreta koji su odgovorni za mešanje hrane i njen transport duž digestivne cevi ka analnom otvoru.

U zidu debelog creva cirkularni sloj mišića je svuda podjednako razvijen dok je longitudinalni sloj grupisan u tri zadebljale uzdužne trake koje se nazivaju *taenie coli* (*t. mesocolica*, *t. omentalis*, *t. libera*). Uzdužna mišićna vlakna iz tenija prodiru u cirkularni snop mišića u nepravilnim razmacima obrazujući tako posebne celine koje se kontrahuju nezavisno jedna od druge. Na ovaj način nastaju kesaste formacije, haustri, u zidu kolona, dok se između njih stvaraju nabori polumesečastog oblika, *plicae semilunares*. Haustre i polumesečasti nabori su nestalne strukture promenjive lokalizacije.

Mišićni sloj kolona prouzrokuje dve vrste crevnih kontrakcija: segmentacije i peristaltičke pokrete. Segmentacije su lokalne kontrakcije, dok se peristaltičkim pokretima sadržaj debelog creva pokreće distalno ka analnom otvoru.

Između cirkularnog i longitudinalnog sloja mišića nalazi se mienterični nervni pleksus (*plexus myentericus Auerbachi*) koji čini deo enteričkog nervnog sistema. Mienterični nervni pleksus je obezbeđuje parasimpatičku i simpatičku inervaciju debelog creva.

Tunika seroza oblaže sve intraperitonealne delove digestivnog tubusa (jejunum, ileum, delovi kolona). Ona predstavlja visceralni list peritoneuma i izgrađena je od rastresitog vezivnog tkiva i mezotela, jednoslojnog pločastog epitela. Tunika adventicija je građena od vaskularizovanog rastresitog vezivnog tkiva koje se utapa u okolno vezivo. Ona obavlja retroperitonealne organe duodenum, ushodni i nishodni colon. U debelom crevu ispod visceralnog peritoneuma postoje naslage masnog tkiva, *appendices epiploicae*, koje su smeštene duž tenija.

1.4.3. Histološke specifičnosti sluznice kolona

Mukoza debelog creva je "glatka" bez ćelijskih specijalizacija koje povećavaju apsorpcionu površinu, ali obiluje prostim tubularnim crevnim žlezdama, Lieberkühn-ovim kriptama. Kripte se protežu celom debljinom mukoze dopirući svojom bazom do lamine muscularis mukoze. Prema literaturnim podacima u tankom crevu miševa kripte se pojavljuju relativno kasno tokom embriogeneze i to počevši od 7. postnatalnog dana (Crosnier i sar., 2006).

Liberkinove kripte regulišu normalnu bakterijsku floru u crevima i imaju ulogu u obnavljanju intestinalnog epitela, stoga imaju i heterogenu ćelijsku populaciju koju čine: enterociti, peharaste ćelije, Paneth-ove ćelije, enteroendokrine ćelije, M-ćelije i matične ćelije. U debelom crevu peharaste ćelije su brojnije od enterocita, dok Panetove ćelije najčešće nedostaju. Enteroendokrine ćelije su ređe nego u tankom crevu dok su matične ćelije zastupljene u istom broju.

Kod pacova mikroorganizmi su prisutni u velikom broju u želucu i crevima, dok kod ljudi nema bakterija u želucu i proksimalnom delu tankog creva zbog niskog pH (DeSesso i Jacobson, 2001). Tranzitno vreme za prolazak himusa kroz debelo crevo kod ljudi (2-4 dana) je znatno sporije nego kod pacova (15 h) (DeSesso i Jacobson, 2001).

1.4.4. Epitel debelog creva

Debelo crevo je obloženo jednoslojnim cilindričnim epitelom u kojem se nalazi nekoliko tipova ćelija: peharaste ćelije, enterociti, enteroendokrine ćelije, M ćelije i matične ćelije.

Enterociti su cilindričnog oblika sa duguljastim bazalno postavljenim jedrom. Enterociti su hiperpolarizovane ćelije što uključuje reorganizaciju citoskeleta kao i pravilnu orijentaciju ćelijskog trafikinga (Halbleib i sar., 2007). Njihova polarizacije je ključna za integritet epitelne barijere u crevima. Na apikalnoj površini poseduju tanke, prstaste citoplazmatične produžetke, mikrovile, pokrivene glikokaliksom. Mikroresice se sastoje od ćelijske membrane koja obavlja snop aktinskih filamenata povezanih sa ostalim citoskeletnim proteinima. Na apikalnoj membrani svakog enterocita ima na hiljade mikroresica dužine 1 μm i širine 0.1 μm (Marsh, 1971). Procenjuje se da svaka apsorptivna ćelija ima prosečno oko 3000 mikroresica, a da ih na 1mm² sluznice ima oko 200 miliona (Junqueira i Carneiro, 2005). Ove ćelijske specijalizacije najviše doprinose amplifikaciji apsorpcione površine creva. Najvažnija uloga

enterocita je apsorpcija metabolita koji nastaju varenjem hrane. Specijalizovane su za prihvatanje i transport supstanci iz crevnog lumena u vaskularni sistem lamine proprije. Plazmalema mikrovila sadrži brojne transportne proteine i digestivne enzime neophodne za terminalnu digestiju ugljenih hidrata i proteina. Enzimi, disaharidaze i depeptidaze, se nalaze na spoljašnjoj strani plazmaleme i ulaze u sastav glikokaliksa. S obzirom da sintetišu enzime, enterociti nisu samo apsorptivne ćelije nego i sekretorne.

Bazolateralna strana ćelije je od apikalnog dela odvojena tesnim međućelijskim vezama. Tesne veze u apikalnom delu ćelija učestvuju u prevenciji prodora patogena u intestinalni epitel stvarajući fizičku barijeru. Pored toga, prodor antigena enterociti mogu da spreče i sekrecijom imunoglobulina, a imaju i antigen-prezentujuću ulogu (Lobley, 1991; Snoeck i sar., 2005). Sa bazalne strane enterociti dolaze u kontakt sa kapilarima u lamini propriji. Rastojanje između bazalne membrane enterocita i kapilara je svega nekoliko mikrometara (DeSesso i Jacobson, 2001). Takođe, na bazalnoj strani enterocita postoje pore koje su prekrivene samo bazalnom laminom i one služe za ubrzavanje apsorpcije vode i materija rastvorljivih u vodi (DeSesso i Jacobson, 2001).

Životni vek enterocita je oko 1.5 do 3 dana. Nastaju deobom i diferencijacijom matičnih ćelija iz Liberkinovih kripti koje migriraju ka vrhu resice. Manje ih ima u debelom nego u tankom crevu, a u debelom crevu imaju ulogu da reapsorbuju vodu i elektrolite.

Enteroendokrine ćelije se nalaze u nižim delovima Liberkinovih kripti rasute između neendokrinih ćelija i pripadaju difuznom neuroendokrinom sistemu (DNES). U debelom crevu su ređe nego u tankom crevu i čine 0.4% ćelijske populacije epitelnih ćelija kolona (Karam, 1999). Frekvencija zastupljenosti enteroendokrinih ćelija opada od duodenuma ka kolonu i opet se povećava u rektumu gde se mogu sresti u i grupama (Gunawardene i sar., 2011). Enteroendokrine ćelije se karakterišu velikim brojem granula u citoplazmi i snopovima citoplazmatičnih nastavaka koji povećavaju njenu površinu (Karam, 1999). Citoplazmatične nastavke na apikalnom kraju imaju sve enteroendokrine ćelije, dok one u debelom crevu imaju i bazalne citoplazmatične nastavke koji se protežu do susednih epitelnih ćelija (Gunawardene i sar., 2011). Enteroendokrine ćelije se mogu podeliti u dve grupe: ćelije otvorenog tipa, koje na vrhu imaju mikrovile i dopiru do lumena creva i ćelije zatvorenog tipa koje ne dopiru do lumena. Nakon stimulacije, enteroendokrine ćelije egzocitozom oslobađaju sekretorne granule u kapilare lamine proprije, a oslobođeni hormoni ispoljavaju parakrino ili endokrino dejstvo. Hormoni ovih ćelija regulišu funkciju i motilitet digestivnog sistema. Nakon dugogodišnje debate o poreklu enteroendokrinih ćelija ustanovljeno je da ove ćelije

potiču od istih stem ćelija kao i ostale intestinalne ćelije (Karam, 1999). U debelom crevu životni vek enteroendokrinih ćelija je 23 dana.

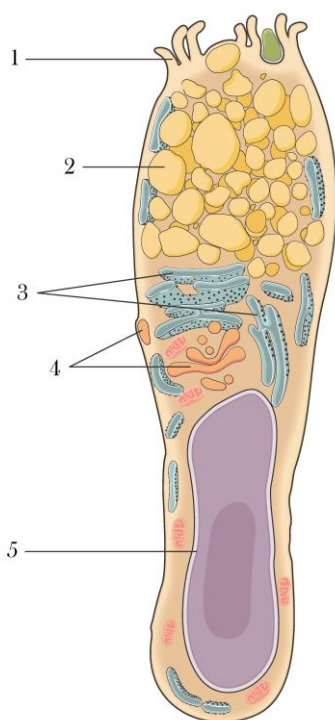
Funkcionalno i morfološki predstavljaju heterogenu ćelijsku populaciju, tako da postoji veliki broj podtipova enteroendokrinih ćelija u skladu sa različitim ultrastrukturnim i funkcionalnim karakteristikama. Enteroendokrine ćelije nisu prijemčive za klasične histološke boje pa je za njihovu identifikaciju potrebna primena imunohistohemijskih metoda bojenja. Neke od najzastupljenijih enteroendokrinih ćelija u epitelu kolona su: enterohromafine ćelije koje luče serotonin, D ćelije koje luče somatostatin i L ćelije koje luče YY peptid. Enterohromafine ćelije su najzastupljenije od svih enteroendokrinih ćelija i nalaze se u svim delovima gastrointestinalnog trakta. One čine 70% ukupne populacije enteroendokrinih ćelija u kolonu, dok su druge po zastupljenosti L ćelije i njihov broj raste od proksimalnog ka distalnom kolonu (Gunawardene i sar., 2011).

M-ćelije su prisutne u mukozi koja pokriva limfne folikule duž tankog i debelog creva. 1974. godine su otkrivene u humanom ileumu, a godinu dana kasnije su detektovane i u apendiksu (Kucharzik i sar., 1998). Angažovane su u imunom odgovoru kao antigen-transportujuće ćelije što je inicijalni korak u imunom odgovoru. Zbog svoje specifične uloge, morfološki se razlikuju od okolnih enterocita. Kod čoveka M-ćelije ne poseduju mikrovile, dok su kod glodara mikrovili kratki i nepravilni i liče na mikronabore (Miller i sar., 2007). Iznad M-ćelija dolazi do redukcije glikokaliksa (Mabbott i sar., 2013). Navedene morfološke adaptacije omogućavaju brži kontakt između patogena iz crevnog sadržaja i apikalnog dela M-ćelija. M-ćelije endocitozom prihvataju antigene iz crevnog lumena i preko endocitoznih vezikula ih transportuju do lamine proprije, odnosno limfnog tkiva ispod nje. Između bazolateralnih odeljaka M-ćelija nalaze se široki međućelijski prostori u kojima su prisutni intraepitelni T-limfociti koji migriraju iz lamine proprije. Ova modifikacija omogućava skraćivanje vremena potrebnog za transport antigenog materijala, jer daje mogućnost da do kontakta između vezikula i T-limfocita dođe pre nego što vezikule stignu do bazalnog dela ćelije (Nicoletti, 2000). M-ćelije u debelom crevu imaju iste morfološke adaptacije za prihvatanje i transport antigenog materijala kao i M-ćelije iznad Pajerovih ploča u tankom crevu (Miller i sar., 2007). S obzirom da su im intermedijerni filament organizovani na isti način kao i kod enterocita smatra se da vode poreklo od diferenciranih enterocita (Kucharzik i sar., 1998) a ne od stem ćelija u kriptama.

Matične ćelije služe za fiziološko obnavljanje celokupnog crevnog epitela, kao i za regeneraciju oštećene sluznice. Nalaze se u dnu Liberkinovih kripti, kockastog su oblika i njihov apikalni pol ne komunicira sa lumenom kripti. Ćelije koje nastaju deobama i diferencijacijom matičnih ćelija migriraju uz kriptu do površine epitela. Crevni epitel se potpuno obnavlja svakih 2-6 dana (Anđelković i sar., 2001).

Od matičnih ćelija u bazi kripte nastaju sve ćelije prisutne u crevnoj mukozii. Intestinalne stem ćelije se stalno obnavljaju tokom života i predstavljaju pul za nastanak progenitorskih ćelija koje se dalje diferenciraju do potpune maturacije (Noah i sar., 2011). Epitel kolona nastavlja sa maturacijom i nakon rođenja sve do 17. postnatalnog dana (Katz i sar., 2002). Geni koji se aktiviraju tokom intestinalne organogeneze imaju značajnu ulogu i u diferencijaciji adultnog epitela creva (Noah i sar., 2011).

1.4.4.1. Peharaste ćelije i mucini



Slika 4. Peharasta ćelija
(<https://en.wikipedia.org>)

1. Mikrovili
2. Sekretorne granule
3. Granulirani endoplazmatski retikulum
4. Goldžijev aparat
5. Jedro

Peharaste ćelije (Sl. 4) se nalaze između enterocita i izrazito su polarizovane. Apikalni pol ćelije ispunjavaju mnogobrojne sekretorne granule koje sadrže hidrofilne glikoproteine, mucine. Sekretorne granule zauzimaju najveći deo apikalnog pola ćelije dajući ćeliji peharast oblik po čemu su i dobile naziv. Jedro je ovalno i potisnuto na bazalni pol ćelije zajedno sa endoplazmatskim retikulumom. Goldžijev kompleks je izuzetno dobro razvijen i lociran neposredno iznad jedra, što ukazuje na njegovu važnu ulogu u ćeliji.

U duodenumu peharaste ćelije su retke i čine svega 4% ćelijske populacije epitela, ali se njihov broj povećava prema distalnim delovima tankog creva, a najbrojnije su u debelom crevu gde čine 16% od ukupne ćelijske populacije epitela kripte (Karam, 1999). Peharaste ćelije čine čak 50% od ukupne ćelijske populacije epitela Liberkinove kripte (Noah i sar., 2011). Peharaste ćelije su najzastupljenije u kolonu zbog mukusa koji ima važnu ulogu u zaštiti epitela od mehaničkog dejstva zgusnutog crevnog sadržaja, a ujedno, olakšava njegov transport.

Životni vek peharastih ćelija je 4.6 dana (Karam, 1999).

Nastaju diferencijacijom i migracijom matičnih ćelija. Prvo nastaju pro-peharaste ćelije koje imaju nekoliko mukusnih granula i imaju sposobnost deobe. Nezrele peharaste ćelije imaju široku bazu, granule mucina kao i ogranele se nalaze u apikalnom delu ćelije (Stringer i sar., 2007). Tokom migracije duž kriptpe peharaste ćelije sazrevaju i dobijaju karakterističan oblik i akumuliraju veće količine mucina (Johansson i Hansson, 2013). Kod zrelih ćelija organele i jedro se nalaze u donjem, užem, delu ćelije a mucigene granule u apikalnom, širem, delu ćelije. U roku od dan-dva ove ćelije akumuliraju veliku količinu mucigenih granula i postaju zrele peharaste ćelije (Karam, 1999). U toku migracije peharastih ćelija od dna kriptpe do njenog vrha mucini u granulama menjaju svoj karakter. U novonastalim peharastim ćelijama, pri dnu kriptpe, histohemijskim metodama bojenja sekretorne granule pokazuju sadržaj neutralnih mucina. Uporedo sa procesom migracije ka vrhu kriptpe sekretorne granule sazrevaju u pravcu sadržaja kiselih mucina karakterističnih za adultni tip ćelija. Proces fiziološke obnove istrošenih peharastih ćelija je isti kao kao i proces njihove maturacije tokom fetalnog perioda, u kome peharaste ćelije, takodje, pokazuju prisustvo neutralnih mucina. U patološkim procesima, u kojima dolazi do gubitka površnog epitela ili crevnih resica u celini, regeneracija se postiže na isti način, te nalaz neutralnih mucina u peharastim ćelijama ukazuje na ubrzanu regeneraciju (Anđelković i sar., 2001).

Kada sekretorne granule oslobode mucine van ćelije oni postaju veoma hidratisani, međusobno se vezuju i formiraju mukus, viskozni, elastični, protektivni lubrikantni gel. Mucin se rastvara u vodi i gubi se pri klasičnoj histološkoj obradi tkiva, tako da apikalni deo ćelije ostaje neobojen, izgleda kao prazan intracelularni prostor.

Mucini u sastavu peharastih ćelija su kondenzovani i uskladišteni u sekretorne granule spremne da budu oslobođene. Peharaste ćelije mogu sekretovati malu, bazalnu, količinu mucina u fiziološkim uslovima, ili može doći do masovne egzocitoze kao odgovor na spoljašnje stimulse. Oslobođanje mucina je kontrolisano sa nekoliko faktora: mikrobijalni faktori, faktori rasta, inflamatorni citokini i autonomni nervni signali koji se aktiviraju preko adrenergičkih ili holinergičkih receptora na površini peharastih ćelija (McCauley i Guasch, 2015).

Mucini su glikoproteini velike molekulske mase sastavljeni od proteinskog jezgra za koje su vezani glikani. Podela mucina se vrši na osnovu sastava proteinskog jezgra ili na osnovu monosaharida koji ulaze u sastav njihovih oligosaharidnih lanaca.

Proteinski deo jezgra mucina kodiraju MUC geni, a do sada je otkriveno oko 20 MUC gena (Corfield, 2015) pa samim tim postoji i 20 različitih tipova mucina. Oni se dalje dele u dve grupe: sekretorni i transmembranski mucini. Sekretorni mucini (npr. MUC2, MUC5AC,

MUC5B, MUC6, MUC 19) formiraju fizičku barijeru u formi mukoznog gela na površini intestinalnog epitela. Sekretorni mucini se dele na dve subgrupe: mucini koji formiraju gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC19) i mucini koji ne formiraju gel (MUC7, MUC9). Gel-formirajući mucini su veliki polimerni molekuli, dok su mucini koji ne formiraju gel monomeri i imaju manje molekulске mase (Moniaux i sar., 2001). Transmembranski mucini (npr. MUC1, MUC4, MUC13, MUC16) imaju jedan region koji prolazi kroz ćelijsku membranu epitelnih ćelija i ogromne domene sa O-glikolizovanim tandemskim ponovcima. Transmembranski mucini ulaze u sastav glikokaliksa koji se nalazi na površini intestinalnog epitela (Corfield, 2015).

Broj i veličina tandemskih ponovaka u sastavu glikanskog dela mucina varira, a postoji i genetski polimorfizam u broju ponovaka tako da veličina molekula mucina varira i između individua u okviru iste vrste (Linden i sar., 2008).

Mucini se sintetišu kao monomeri, u formi apomucina. Nakon translacije dolazi prvo do N-glikozilacije, a zatim do dimerizacije u granuliranom endoplazmatičnom retikulumu formiranjem disulfidnih veza između cisteinskih regiona u blizini C-terminalnog kraja apomucina (Pearson i Brownlee, 2010). N-glikozilacije je neophodna da bi došlo do transfera nastalog MUC2 molekula do Goldžijevog aparata u kome dolazi do O-glikozilacije PTS domena i formiranja trimera preko disulfidnih veza. Glikozilacija povećava molekulsku masu dimera mucina do pet puta (Johansson, 2012). U okviru iste organele molekuli mucina se pakuju u sekretorne vezikule uz prisustvo velikih količina jona kalcijuma (Pearson i Brownlee, 2010). Formiranje trimera je esencijalno za formiranje gela nakon sekrecije mucina (Corfield, 2015), a to je osnova za obrazovanje zaštitnog mukusnog sloja na površini epitela. Nakon oslobađanja sekretornih vezikula molekuli mucina se oslobađaju od jona kalcijuma i razmotavaju u vodenoj sredini (Pearson i Brownlee, 2010) pri čemu se njihov volumen uvećava od 100 do 1000 puta (Johansson i sar., 2011).

Na osnovu glikanske frakcije mucini se dele na: neutralne i kisele mucine. Neutralni mucini su bogati glikogenom i najzastupljeniji su u želucu i tankom crevu, za razliku od kiselih mucina koji su dominantni u kolonu. Kiseli mucini su podeljeni na dve subgrupe u zavisnosti od monosaharida koji zauzima terminalnu poziciju u molekulu oligosaharida. Oligosaharidi koji na svom terminalnom kraju imaju sijalinsku kiselinu ulaze u sastav sijalomucina, a oni koji imaju sulfatnu grupu grade sulfomucine (Linden i sar., 2008). Sijalinska kiselina i sulfo grupa su negativno naelektrisani monosaharidi.

Distalni kolon pacova je po zastupljenosti i distribuciji mucina sličan sa humanim kolonom, dok se proksimalni kolon razlikuje (Filipe, 1975). U distalnom kolonu sulfomucini dominiraju

duž cele kripte, dok su sijalomucini prisutni samo u gornjem delu kripte. U proksimalnom kolonu pacova dominiraju sijalomucini. Pojedinačne peharaste ćelije sa sulfomucinima se javljaju u gornjem delu kripte. PAS-pozitivne peharaste ćelije su izraženije u gornjem delu kripte nego u donjem delu.

MUC2 mucin spada u grupu sekretornih mucina koji formiraju gel i najzastupljeniji je tip mucina u debelom crevu. MUC2 je prvi humani mucinski gen koji je kloniran i kompletno sekvencioniran (Allen i sar., 1998), a samim tim i najbolje proučen.

Proteinski deo molekula mucina se sastoji od velikog broja tandemskih ponovaka aminokiselina sa visokim sadržajem prolina, treonina i serina koji su nazvani PTS domeni (Bergstrom i Xia, 2013). MUC2 mucin sadrži više od 5000 aminokiselina (Allen i sar., 1998) i veliki, veoma glikolizovan, centralno postavljen PTS domen, kao i domene bogate cisteinom. U okviru PTS domena, na serinskim i treoninskim ostacima, dolazi do intenzivne O-glikozilacije molekula mucina. Oligosaharadi koji su za proteinsko jezgro vezani O-glikozidnim vezama čine oko 85% molekulske mase mucina (Allen i sar., 1998; Pearson i Brownlee, 2010), dok su glikani N-tipa zastupljeniji u transmembranskim mucinima (Corfield, 2015). O-glikani su zaslužni za strukturnu stabilnost mukusnog sloja kolona, a utiču i na sastav komensalne mikroflore (Bergstrom i Xia, 2013), pri čemu suptilne razlike u strukturi O-glikana mogu dovesti do promene sastava mikroflore i na taj način uticati na podložnost intestinalnim obolenjima.

Karakteristika MUC2 mucina je formiranje dvoslojnog mukusnog sloja u kolonu. Unutrašnji sloj je debljine 50-100 μm , a spoljašnji oko 800 μm (Atuma i sar., 2001; Johansson i sar., 2008).

1.4.4.2. Funkcionalna svojstva mucina i mukusnog sloja

Mukus se sastoji od: vode, mucina, faktora tri petlje (*trefoil factors, TFFs*), sekretornih imunoglobulina (IgA), antimikrobijalnih peptida (defenzin i lektin), antimikrobijalnih proteaza, enterocitnih hidrofobnih fosfolipida i antitela (Linden i sar., 2008). Iako mucini čine svega 2-3% od ukupnog volumena mukusa zaslužni su za većinu njegovih osobina presudnih za očuvanje intestinalne homeostaze. Mucini imaju veliki kapacitet za vezivanje vode i učestvuju u hidrataciji intestinalnog epitela. Zahvaljujući strukturi i biohemijskom sastavu, mucini doprinose fizičkoj i hemijskoj zaštiti površine epitela, kao i regulaciji lokalne mikrosredine intestinalnih ćelija.

Potvrđeno je da mukusni sloj u kolonu nije jedinstven nego se sastoji od dva dela, prvi, unutrašnji sloj je čvrsto vezan za epitelne ćelije i nije u kontaktu sa mikroorganizmima, dok je

drugi, spoljašnji, sloj vezan slabim vezama za unutrašnji sloj mukusa i lako se može odvojiti od njega (Atuma i sar., 2001). Unutrašnji sloj mukusa se naziva glikokaliks i veoma je značajan u sprečavanju invazije mikroorganizama, jer u slučaju njegovog odsustva bakterije lako dolaze do epitelnih ćelija (Johansson i sar., 2011). Spoljašnji mukusni sloj kolona predstavlja dom za preko 400 različitih vrsta mikroorganizama koje učestvuju u njegovoj degradaciji doprinoseći tako njegovom "turnoveru" (Corfield, 2015) što ide u prilog činjenici da postoji dinamična i uzajamna veza između domaćina i komensalne mikroflore u kolonu.

Mukusni sloj nije statična barijera nego izuzetno dinamična struktura. Gornji mukusni sloj se stalno uklanja i obnavlja, a sa njim se uklanjaju i mikroorganizmi. Na taj način se sprečava prodor mikroorganizama do glikokaliksa. Peharaste ćelije mogu modulirati sekreciju mucina pod uticajem eksternih stimulosa (McCauley i Guasch, 2015). Reagulacija produkcije i sekrecije mucina od strane peharastih ćelija je ključna za odgovor kolona na štetne agense iz okoline. Postoji ekvilibrijum između sinteze i sekrecije novih mucina i "turnovera" mukusnog sloja. *In vivo* studije su pokazale da je potrebno oko 60 min za obnovu unutrašnjeg mukusnog sloja (Johansson, 2012), a 24 h za obnovu celokupnog mukusnog sloja (Corfield, 2015). Brza obnova oba mukusna sloja omogućava brzi odgovor intestinalnog epitela na promene uslova u lumenu kolona. Ovo svojstvo peharastih ćelija je od esencijalnog značaja za očuvanje zaštitnog sistema kolona (Johansson, 2012).

Aktiviranje sinteze ili sekrecije mucina zajedno sa proliferacijom peharastih ćelija je posredovano raznim neurohumoralnim, lokalnim i imunim faktorima (Pearson i Brownlee, 2010). Ukupna produkcija mucina u kolonu može biti povećana usled povećane biosinteze mucina, stope egzocitoze ili povećanja broja peharastih ćelija.

Postoje dva načina sekrecije mucina: bazalna i stimulirana sekrecija. Bazalna sekrecija podrazumeva konstantnu umerenu egzocitozu granula mucina koje služe za održavanje intaktnog mukusnog sloja. Stalni gubitak mukusa dešava se pod uticajem proteaza mikroorganizama ili erozijom usled mehaničkih i hemijskih oštećenja od strane crevnog sadržaja (Allen i sar., 1998). U zdravom organizmu gubitak mukusa je u balansu sa sekrecijom novosintetisanih mucina pa ne dolazi do narušavanja homeostaze kolona (Montagne i sar., 2003). Peharaste ćelije proizvode različite tipove mucina koji se sekretuju različitim dinamikom i u različito vreme (Stringer i sar., 2007). Stimulirana sekrecija mucina nastaje kao odgovor na bioaktivne ili epigenetske faktore kao što su: mikrobi, toksini, proinflamatorni citokini, neuropeptidi i faktori rasta (Linden i sar., 2008), holinergički stimuli, hemijski i fizički iritanti (Stringer i sar., 2007). Stimulirana sekrecija podrazumeva naglu egzocitozu svih uskladištenih mukusnih granula. Postoje nalazi da se javlja razlika u

sekreciji mukusa iz peharastih ćelija na površini epitela i onih iz kripti što predstavlja mehanizam na koji organizam moduliše zaštitnu funkciju mukusnog sloja (Stringer i sar., 2007;). Peharaste ćelije na površini epitela imaju dominantnu ulogu u bazalnoj sekreciji mucina, one se odlikuju brzim sintezom mucina ali ih ne skladište. Nasuprot njima, peharste ćelije u kriptama prevashodno skladište mucine i oslobađaju ih samo u slučaju stimulisane sekrecije (Johansson, 2012).

1.4.5. GALT

U sluznici creva postoje brojne ćelije imunog sistema koje pripadaju GALT-u (*engl. Gut Associated Lymphoid Tissue*), koji je deo difuznog limfnog tkiva sluznice, tzv. MALT sistema (*engl. Mucosa Associated Lymphoid Tissue*).

Mukozni imuni sistem može delovati nezavisno od sistemskog imunog sistema jer sadrži sve ćelije neophodne za inicijaciju imunog odgovora. On je funkcionalno podeljen na induktivni i efektorni deo (Cesta, 2006). Induktivni deo čini sekundarno limfno tkivo u kome dolazi do klonalne ekspanzije B limfocita kao odgovor na antigen specifičnu aktivaciju T limfocita. Induktivni deo GALT-a u tankom crevu čine Pajerove ploče, a u debelom crevu pojedinačni limfni folikuli. Pajerove ploče se formiraju tokom embriogeneze i njihov broj se ne menja sa godinama. Pre rođenja Pajerove ploče su slabo celularne, a nakon rođenja dolazi do njihove intenzivne ekspanzije (Cesta, 2006). Uočeno je da su u Pajerovim pločama B limfociti zastupljeniji od T limfocita i da je njihov odnos 0:2, a da je odnos CD4⁺ naspram CD8⁺ T limfocita 0:5 (Cesta, 2006). Pokazano je da su limfni folikuli u debelom crevu miša iregularno raspoređeni, ali da po centimetru kolona ima 1.4 limfna folikula (Owen i sar., 1991). Limfni folikuli u kolonu su sitniji i imaju manji germinativni centar u odnosu na Pajerove ploče tankog creva (Owen i sar., 1991). U kolonu je dokazano prisustvo pojedinačnih limfocita u epitelu i lamini propriji (Elmore, 2006). U lamini propriji kolona, pri normalnim uslovima, nalazi se mešana populacija imunih ćelija, prisutne su: plazma ćelije, makrofagi, mastociti, T i B limfociti (Carmack i sar., 2009). Efektorni deo GALT-a čini difuzno raspoređeno limfno tkivo u lamini propriji.

U sastav celularne komponente GALT-a ulaze: B-limfociti, CD4⁺ i CD8⁺ T limfociti, dendritske ćelije, makrofazi, mastociti i eozinofili.

1.4.5.1. *Limfociti*

Limfociti nastaju u koštanoj srži odakle migriraju ka timusu gde se odigrava njihova maturacija. Nakon migracije neki limfociti napuštaju timus i naseljavaju različita tkiva, a posebno mukozu creva. Limfociti se pojavljuju u lamini proprijii gastrointestinalnog trakta u trećoj nedelji nakon rođenja i kod miševa dostižu adultni nivo oko 6. meseca starosti (Rothenberg, 2001). S obzirom da limfociti naseljavaju gastrointestinalni trakt postnatalno njihovo naseljavanje zavisi od prisustva i sastava komensalne mikroflore.

U crevima se razlikuju dve populacije limfocita: intraepitelni limfociti i limfociti u lamini proprijii. Intraepitelni limfociti primaju, interpretiraju i prenose informacije iz lumena ka limfocitima u lamini proprijii, obavljajući na taj način važnu ulogu u zaštiti organizma od invazije i sistemske diseminacije patogenih i komensalnih bakterija (Kunisava i sar., 2007; Cheroutre, 2005). Intraepitelni limfociti su brojniji u tankom (jedan limfocit na svakih 4-10 enterocita) nego u debelom crevu (jedan limfocit na svakih 30-50 enterocita) (Kunisava i sar., 2007).

Na osnovu ekspresije receptora (TCR) i koreceptora intraepitelni limfociti se dele na dve grupe, razlikuju se: konvencionalni i nekonvencionalni limfociti. Konvencionalni limfociti ekspresuju $\alpha\beta$ TCR zajedno sa CD4 i CD8 α koreceptorima. U debelom crevu dominiraju CD8 α limfociti sa $\alpha\beta$ TCR, dok 10-20% čine limfociti sa $\gamma\delta$ TCR (Resendiz-Albor i sar., 2005). Nekonvencionalni limfociti ekspresuju TCR $\alpha\beta$ ili TCR $\gamma\delta$ receptore i nekonvencionalne CD8 α koreceptore. Pored navedenih razlika nekonvencionalnim limfocitima nedostaju neki receptori i markeri koji postoje na konvencionalnim limfocitima (Kunisava i sar., 2007). U tankom crevu miševa uzrast utiče na broj intraepitelnih limfocita dok takve promene nisu uočene u debelom crevu (Suzuki, 2012). U tankom crevu dominiraju nekonvencionalni intraepitelni limfociti čineći 60% od ukupne populacije limfocita, dok su u kolonu oni zastupljeni sa 5% (Ostain i sar., 2010). Navedene grupe limfocita ispoljavaju fenotipske i funkcionalne razlike kao i razlike u prepoznavanju antigena.

Nekonvencionalni intraepitelni limfociti mogu prepoznati antigene prezentovane od strane enterocita (Ostain i sar., 2010) i na taj način dolazi do imunog odgovora na neprocesovane antigene koji se ekspresuju u stresnim situacijama (Cheroutre i Kronenberg, 2005). Oni tako predstavljaju prvu liniju odbrane od patogena. Bez obzira na izraženu autoreaktivnost nekonvencionalni limfociti nisu autodestruktivni u normalnim uslovima (Cheroutre i Kronenberg, 2005) i njihovo prisustvo je ključno za indukciju i održanje imunog odgovora u crevima (Kunisava i sar., 2007).

Konvencionalni intraepitelni limfociti su tumus zavisne efektorne ćelije koje reaguju na antigene prezentovane od strane MHC I i II klase molekula u okviru GALT-a (Ostain i sar., 2010) i zahtevaju aktivaciju van epitela. Oni su slični T limfocitima prisutnim u drugim organima kao što su slezina i perefirni limfni folikuli. Odnos CD8 i CD4 limfocita u kolonu je isti kao i u slezini (Kunisava i sar., 2007). CD8 $\alpha\beta$ intraepitelni limfociti ispoljavaju citolitičke efekte, dok CD4 limfociti imaju regulatornu ili supresornu ulogu (Cheroutre i Kronenberg, 2005).

Pokazano je da intraepitelni limfociti imaju važnu ulogu u repariranju epitela i zarastanju rana zahvaljujući ekspresiji keratinocitnog faktora rasta (Chen i sar., 2002), a pored toga uključeni su i u očuvanje integriteta epitela preko produkcije citokina i faktora rasta (Dahan i sar., 2007). Na osnovu svih nabrojanih uloga možemo zaključiti da intraepitelni limfociti imaju i regulatornu i efektornu ulogu koja je značajna za očuvanje homeostaze mukoznog imunog sistema.

U lamini propriji debelog creva 69% limfocita čine B limfociti, od T limfocita CD8 limfociti čine 70% od toga 90-95% ekspresuje $\alpha\beta$ TCR (Resendiz-Albor i sar., 2005). Intraepitelni limfociti su strateški pozicionirani na granici između dijetarnih antigena i komensalne mikroflore u lumenu kolona i najveće akumulacije limfocita u organizmu, organizovane u GALT. Limfociti u lamini propriji su preko svojih bazolateralnih projekcija u vezi sa intraepitelnim limfocitima (Dahan i sar., 2009). Limfociti iz lamine proprije mogu da prenose određene informacije ka intraepitelnim limfocitima što utiče na njihovu diferencijaciju kao i ulogu u održavanju epitelne barijere (Dahan i sar., 2007).

Velike razlike koje postoje između limfocita u tankom i debelom crevu odraz su razlika u mikrosredinama ova dva dela creva. Limfociti u tankom crevu su najviše izloženi antigenima iz hrane, dok su limfociti u debelom crevu izloženi bakterijskim antigenima. Iz navedenih razloga imuna regulacija debelog creva se razlikuje od imune regulacije tankog creva (Resendiz-Albor i sar., 2005).

1.4.5.2. Eozinofili

Eozinofili nastaju u koštanoj srži od pluripotentnih stem ćelija. Iz koštane srži migriraju u cirkulaciju gde se kratko zadržavaju čineći 1-5% krvnih leukocita (Jung i Rothenberg, 2014). Iz cirkulacije eozinofili migriraju u timus, mlečnu žlezdu, uterus i gastrointestinalni trakt. Digestivni sistem sadrži najviše eozinofila u homeostatskim uslovima i oni su lokalizovani u lamini propriji gde čine 20-30% ukupne ćelijske populacije (Jung i Rothenberg, 2014).

U okviru gastrointestinalnog sistema eozinofili su prisutni u vezivnom tkivu: želuca, tankog creva, cekuma i kolona, a nema ih u ezofagusu i jeziku (Mishra i sar., 1999). Procenjeno je da je broj eozinofila u digestivnom sistemu oko deset puta veći nego u cirkulaciji (Jung i Rothenberg, 2014), dok se u okviru digestivnog sistema njihov broj progresivno povećava od želuca ka kolonu gde se može naći i 50 eozinofila po vidnom polju (Mishra i sar., 1999). U zdravom organizmu eozinofili su prisutni samo u lamini propriji digestivnog sistema, dok se u slučaju inflamacije mogu naći i u Pajerovim pločama, intraepitelnim regionima, mišićnom i seroznom sloju (Rothenberg, 2001).

Eozinofili "naseljavaju" gastrointestinalni trakt još tokom embriogeneze, kod miševa broj eozinofila pri rođenju je isti kao i kod adultnih jedinki (Rothenberg, 2001; Berek, 2016). S obzirom da eozinofili prenatalno "naseljavaju" gastrointestinalni sistem njihovo nakupljanje ne zavisi od prisustva i sastava crevne flore. Mehanizmi uključeni u nakupljanje eozinofila u tkivo kolona se razlikuju od mehanizama koji regulišu "naseljavanje" drugih tkivnih leukocita (limfociti, mastociti). Za održavanje broja eozinofila u homeostatskim uslovima odgovoran je eotaksin, glavni tkivni hemoatraktant za eozinofile (Humbles i sar., 2002). Studije na miševima bez eotaksina su pokazale da je konstitutivna ekspresija eotaksina neophodna za održavanje normalne populacije eozinofila u gastrointestinalnom sistemu, jer u njegovom odsustvu dolazi do smanjenja broja eozinofila u lamini propriji (Mishra i sar., 1999). Pokazano je da je eotaksin ključan samo za naseljavanje rezidentnih eozinofila u digestivni sistem, dok su za naseljavanje eozinofila u gastrointestinalni trakt tokom inflamacije odgovorni integrini (Jung i Rothenberg, 2014).

Dugo vremena se smatralo da su eozinofili efektorne ćelije koje imaju zaštitnu ulogu kod parazitskih infekcija, ali su brojna novija istraživanja potvrdila da su eozinofili multifunkcionalni leukociti uključeni u brojne biološke procese u digestivnom sistemu. Pored antiparazitske uloge, postoje studije koje ukazuju na postojanje simbioze između eozinofila i parazita koja doprinosi očuvanju homeostaze tkiva domaćina (Gebreselassie i sar., 2012). Eozinofili ekspresuju širok spektar receptora što ukazuje na mogućnost njihove uloge u virusnim i bakterijskim infekcijama (Kvarnhammar i Cardell, 2012). U odsustvu eozinofila procesi kao što su: remodelovanje tkiva, akumulacija kolagena i gastrična pokretljivost su znatno sporiji (Mishra i sar., 2008) jer su to procesi u kojima učestvuju eozinofili. Ovi nalazi govore o značajnoj ulozi eozinofila u pomenutim biološkim procesima u digestivnom sistemu. Eozinofili učestvuju i u održavanju integriteta tkiva (Mishra i sar., 1999; Berek, 2016). S obzirom da eozinofili naseljavaju gastrointestinalni sistem prenatalno postoje spekulacije da

učestvuju u regulaciju fiziološke funkcije digestivnog trakta i razvoj GALT-a (Rothenberg, 2001; Berek, 2016).

Lokalizacija eozinofila u lamini proprijii uz limfocite govori o njihovoj funkcionalnoj interakciji (Rothenberg, 2001; Berek, 2016). Postoje nalazi koji govore o modulatornoj ulozi eozinofila u T-ćelijskom imunom odgovoru, jer oni poseduju kostimulatorne molekule (CD40, CD28, CD86) i sekretuju citokine (IL2, IL6, IL12, IL4, IL10) koji mogu stimulisati limfocite (Rothenberg, 2001). Nekoliko studija potvrđuje da eozinofili ekspresuju MHC II molekule što govori o njihovom kapacitetu da funkcionišu kao antigen-prezentujuće ćelije (Jung i Rothenberg, 2014). Eozinofili sekretuju veliki broj citokina koji mogu aktivirati dendritske ćelije miševa, pa i na taj način učestvuju u imunom odgovoru organizma, kao nekonvencionalne antigen-prezentujuće ćelije (Jung i Rothenberg, 2014). Eozinofili imaju značajnu ulogu u aktivaciji B limfocita, nastanku plazma ćelija i njihovom opstanku u lamini proprijii pa tako i u sintezi imunoglobulina (Berek, 2016). IgA je najzastupljenije antitelo u digestivnom sistemu i ima krucijalnu ulogu u održavanju intestinalne homeostaze, a važan je i za uspostavljanje komensalne mikroflore u debelom crevu. Kod miševa smanjen broj eozinofila praćen je smanjem broja plazma ćelija koje produkuju IgA i u cirkulaciji i u mukozi (Berek, 2016). S obzirom na brojne uloge eozinofila poremećaj u njihovom bazalnom broju u gastrointestinalnom sistemu može dovesti do ozbiljnih posledica i narušavanja homeostaze mukoze (Chu i sar., 2014).

U nekim patološkim stanjima dolazi do ekspanzije broja eozinofila u gastrointestinalnom sistemu. Poznati su: eozinofilni ezofagitis, eozinofilni gastroenteritis i eozinofilni kolitis (Cianferoni i Spergel, 2015).

1.4.5.3. Mastociti

Mastociti su dugo živeće granulirane ćelije bele krvne loze koje nastaju u koštanoj srži od progenitornih ćelija. Oni kratko cirkulišu u krvi kao nezrele progenitorne ćelije nakon čega migriraju u tkiva i naseljavaju se u blizini krvnih i limfnih sudova, žlezda, glatkih mišića i nerava (Wouters i sar., 2016). Njihova maturacije se dešava u tkivu i zavisi od mikrosredine u kojoj se nađu (Reber i sar., 2015). Maturacija mastocita može nastati i kao odgovor na infekciju ili prisustvo molekula bakterijskog porekla u njihovoj mikrosredini (Wouters i sar., 2016).

Mastociti naseljavaju creva prenatalno, ali je njihov broj mali, a adultni nivo kod pacova dostižu sa 1-2 meseca starosti (Mishra i sar., 1999). U gastrointestinalnom sistemu mastociti

čine 1-5% ćelija u lamini propriji i submukozi, a mogu se naći i između epitelnih ćelija ili u mišićnim slojevima, pa čak i u serozi (Wouters i sar., 2016).

Na osnovu anatomske lokalizacije mastociti pacova se dele na mukozne mastocite, koji naseljavaju mukoza i mastocite vezivnog tkiva, koji se nalaze u blizini krvni sudova vezivnog tkiva (Abraham i St John, 2010). Pokazano je da se u crevu pacova, u normalnim uslovima, može naći do 50 mukoznih mastocita (Shintoku i sar., 2013). Kod čoveka mastociti se dele na osnovu sadržaja proteaza na dve velike grupe, to su mastociti koji sadrže samo triptazu i mastociti koji sadrže triptazu i himazu, a postoje i mastociti koji sadrže samo himazu, ali su oni retki (Reber i sar., 2015; Da Silva i sar., 2014). Mastociti se odlikuju velikom heterogenošću i plastičnošću. Do promena u fenotipu mastocita može doći u bilo kojoj fazi njihovog životnog ciklusa (Da Silva i sar., 2014). U mukozi creva dominiraju mastociti koji sadrže triptazu i oni se nalaze u blizini T limfocita. U tankom crevu čoveka mastociti sa triptazom čine 98% od ukupnog broja mastocita u mukozi i 13% u submukozi (Reber i sar., 2015).

Mastociti u svojoj citoplazmi imaju veliki broj granula koje su odgovorne za njihove brojne funkcije u organizmu. Da bi mastociti oslobodili svoje granule mora doći do njihove aktivacije. Aktivaciju mastociti inicira kontakt sa mikrobima ili drugim štetim signalima iz njihove mikrosredine. Oslobađanjem proinflammatoryh medijatora mastociti iniciraju odgovor urođenog imuniteta što može dovesti do povećane epitelne sekrecije, mogu se ubrzati peristaltički pokreti creva ili alarmirati enterički nervni sistem u gastrointestinalnom traktu (Bischoff, 2009). Citokini koje oslobađaju mastociti prilikom aktivacije, takođe, mogu dovesti do nakupljanja granulocita i limfocita na mestu njihove aktivacije. Pored degranulacije i oslobađanja već sintetisanih produkata, mastociti imaju sposobnost *de novo* sinteze bioaktivnih medijatora kao odgovor na patogene koji su doveli do aktivacije (Abraham i St John, 2010).

U gastrointestinalnom sistemu mastociti regulišu: vaskularnu i epitelijalnu permeabilnost, sekreciju mukusa, sekreciju jona, angiogenezu, fibrozu, reparaciju tkiva, peristaltičke pokrete, urođeni i stečeni imunitet (Bischoff, 2009; De Saliva i sar., 2014). Ipak, neregulisana aktivacija mastocita može narušiti intestinalnu homeostazu i promovisati inflamaciju što se dešava u nekim bolestima gastrointestinalnog trakta.

Broj mastocita u intestinalnoj mukozi se povećava tokom: inflamatornih bolesti creva, alergija na hranu i parazitskih infekcija (Reber i sar., 2015).

1.5. HOMEOSTAZA SLUZNICE DEBELOG CREVA

Gastrointestinalni sistem je konstantno izložen materijama iz spoljašnje sredine, uključujući: hranu, eksterne antigene, mikroorganizme i ksenobiotike. Epiteli organa koji su u kontaktu sa spoljašnjom sredinom ne predstavljaju samo jednostavnu fizičku barijeru za prodor mikroorganizama i drugih patogena nego kompleksnu hemijsku i biološku barijeru. Postoje četiri načina zaštite epitela od prodora patogena koji učestvuju u održavanju intestinalne homeostaze: mukusni sloj na površini epitela, same epitelne ćelije, intraepitelni limfociti i imune ćelije u lamini propriji (Moens i Veldhoen, 2012).

Prvi nivo zaštite predstavlja sprečavanje kontakta između mikroorganizama i epitelnih ćelija. U ovoj fazi značajnu ulogu imaju peharaste ćelije i mucini, odnosno mukusni sloj na površini intestinalnog epitela. Peharaste ćelije su specijalizovane sekretorne ćelije koje sekretuju brojne molekule koji ulaze u sastav mukusa (mucini, proteini, TFFs) i na taj način ostvaruju svoju važnu funkciju u održavanju homeostaze tkiva. TFFs učestvuju u zaštitnoj ulozi mukusa tako što utiču na polimerizaciju mucina i hvatanju mikroorganizama (Roda i sar., 2010). Nakon oslobađanja TFFs pokreću rekonstrukciju oštećenog mukusa, a odgovorni su i za restituciju epitela jer podstiču proliferaciju i diferencijaciju ćelija (Tran i sar., 1999; Lalani i sar., 1999). Generalno, svi molekuli koji se vezuju za mucine predstavljaju biohemijsku barijeru. Zahvaljujući spektru antitela koji ulaze u sastav mukusa on ima i antibakterijska svojstva (Sperandino i sar., 2015). Takođe, mehanička svojstva mucina i mukusa omogućavaju im i da fizički zarobe potencijalne patogene.

Drugu liniju odbrane od narušavanja homeostaze creva čine same epitelne ćelije koje su povezane tesnim međućelijskim vezama koje regulišu permeabilnost ćelija. Izrazita polarnost enterocita predstavlja osnovu za fizičku barijeru epitelnog sloja creva. Polarnost se ogleda u biohemijskoj i funkcionalnoj razlici između domena plazma membrane enterocita. Okludentne veze predstavljaju granicu između apikalnog i bazoleteralnog pola ćelije i imaju ulogu u sprečavanju difuzije glikolipida i proteina između dva odeljka ćelije (Snoeck i sar., 2005). Susedne ćelije u okviru crevnog epitela su takođe povezane okludentnim vezama što sprečava paracelularni transport molekula. U svakom slučaju tesne veze su dinamična struktura i dešavanja u epitelu ili lamini propriji mogu uticati na njihovu propustljivost (Snoeck i sar., 2005). U normalnim okolnostima reverzibilne promene u propustljivosti okludentnih veza se dešavaju aktivacijom određenih transportnih sistema na membrani. Nasuprot tome, tokom patoloških stanja može doći do otvaranja pora što omogućava prolaz

antigena. U interakciji između mikroorganizama i apikalne membrane enterocita mikrobijalni produkti mogu dovesti do rearanžiranja F-aktina i drugih proteina što za posledicu ima otvaranje pora u okludentnim vezama (Philpott i sar., 1998; Fasano i Uzzau, 1997). Na permeabilnost epitela utiču: faktori rasta, insulin, neurotransmiteri (McKay i Baird, 1999; Snoeck i sar., 2005) kao i pH sredine (Lobley, 1991).

Mikrovili, takođe predstavljaju barijeru zahvaljujući svojoj veličini i naelektrisanju. Kod dece ima 40 mikrovila veličine 100 nm na svakih 5 μm^2 . Ukoliko se zajedno kreću razmak između njih se smanjuje na svega 25 nm što odgovara veličini makromolekula i na taj način se sprečava njihov prodor kroz epitel (Snoeck i sar., 2005). Mikrovili su negativno naelektrisani što odbija pozitivno naelektrisane molekule čak i ako im je dijametar manji od 25 nm. Takođe, između mikrovila se nalaze invaginacije bazalne membrane što dodatno otežava prolaz molekulima (Knutton i sar, 1974; Gonnella i Neutra, 1984). Da bi došli do enterocita antigeni moraju prvo da prođu mikrovilusnu barijeru. Ukoliko neki agens izaziva atrofiju mikrovila ili utiče na njihovo formiranje on će uticati i na homeostazu intestinalne barijere (Snoeck i sar., 2005).

Kolonizacija kolona od strane mikroorganizama se dešava odmah po rođenju. Većina tih bakterija je korisna za zdravlje domaćina jer postoji simbioza između domaćina i mikroorganizama. Komensalna mikroflora učestvuje u varenju, u anaboličkim procesima, u zaštiti domaćina od patogena (Moens i Veldhoen, 2012). Za održavanje homeostaze važan je balans između tolerancije za korisne mikroorganizme kao i efikasno uklanjanje patogena i njihovih toksina. Intestinalna mukoza podstiče rast korisnih mikroorganizama stvarajući im pogodne uslove za život. Čelije creva, takođe, utiču na izvor energije potrebne za rast mikroorganizama, menjajući sastav glikana u sklopu mucina, favorizujući na taj način određene, poželjne, mikroorganizme (Moens i Veldhoen, 2012). Mikroorganizmi za uzvrat utiču na metabolizam nutrijenata, razlažući kompleksne ugljenehidrate na monosaharide i masne kiseline što podstiče rast i diferencijaciju epitelnih ćelija domaćina.

Treći vid zaštite predstavljaju intraepitelni limfociti koji su direktno uključeni u odbranu od mikroorganizama, a učestvuju i u očuvanju barijere. Populaciju intraepitelnih T limfocita čine nekonvencionalne T ćelije koje ekspresuju limitirani broj antigenih receptora i konstantno su u stanju aktivacije (Moens i Veldhoen, 2012). Na taj način se izbegava nepotrebno odlaganje reakcije u slučaju invazije mikroorganizama, jer za postizanje njihove pune aktivnosti nije potreban inicijalni korak u vidu klonalne ekspanzije prekursorne ćelije. Odmah nakon aktivacije intraepitelni limfociti oslobađaju citokine koji dalje aktiviraju ćelije urođenog

imuniteta. Smatra se da na taj način intraepitelni limfociti kordiniraju adaptivni imuni odgovor.

Enterociti, takođe, imaju aktivnu ulogu u imunom sistemu mukoze, oni se ponašaju kao ne-profesionalne antigen prezentujuće ćelije, a to im omogućava njihova izrazita polarizovanost. Antigeni u enterocitima mogu biti procesovani na dva načina: razgradnjom od strane enzima lizozoma ili ukoliko makromolekuli nisu degradabilni oni se oslabođaju u intestinalni prostor odakle ulaze u cirkulaciju (Snoeck i sar., 2005). Epitelne ćelije creva na apikalnom kraju ekspresuju MHC (*engl. major histocompatibility complex*) I i II klase molekula pomoću kojih vezuju antitela, procesuju ih i na bazolateralnom delu ih prezentuju T-limfocitima u lamini propriji ili intraepitelnim limfocitima dovodeći tako do njihove aktivacije (Hershberg i sar., 1998; Snoeck i sar., 2005; Roda i sar., 2010). Enterociti mogu indukovati i CD8⁺ T ćelijski odgovor kod miševa i ljudi (Blumberg, 1998). Tokom inflamacije dolazi do promena u svojstvima epitelne barijere kao i imunog odgovora na antigene prisutne u lumenu creva. Dahan i sar. (2007) su dokazali postojanje i značaj limfo-epitelnih interakcija kod inflamatornih obolenja creva.

Prema novijim istraživanjima pokazano je da i peharaste ćelije mogu imati ulogu antigen-prezentujućih ćelija (McDole i sar., 2012) čineći ih na taj način aktivnim učesnicima u intestinalnom imunitetu.

Poslednju intestinalnu barijeru u održavanju homeostaze, pre aktiviranja sistemskog imunog odgovora, čini GALT u lamini propriji. U lamini propriji se nalaze dendritske ćelije, makrofazi, limfociti, mastociti i eozinofili. Iako u sastav GALT-a ulaze sve ćelije neophodne za imunu reakciju, mukusni imuni odgovor je prvenstveno fokusiran na supresovanje imune reakcije (Mayer, 2003). Mehanizam reakcije GALT-a je usmeren na zaštitu domaćina od agresivnog imunog odgovora na konstituente intestinalnog lumena sa kojima se svakodnevno susreće.

2. CILJ RADA

Poslednjih decenija broj kancera debelog creva je u porastu kao i drugih obolenja digestivnog sistema. Jednu trećinu kalorija ljudi svakodnevno unose putem hrane bogate akrilamidom, a digestivni sistem prvi dolazi u kontakt sa ovom supstancom. Literaturni podaci pokazuju da su saznanja o efektima akrilamida na debelo crevo skromna. Iz gore navedenih razloga, od značaja za ljudsko zdravlje je utvrditi u kojoj meri uneti akrilamid utiče na sluzokožu debelog creva. Stoga su u ovoj disertaciji postavljeni ciljevi da se primenom histoloških, stereoloških i imunohistohemijskih metoda na animalnom modelu utvrdi:

- da li akrilamid, u subhroničnom delovanju, izaziva promene u morfologiji zida debelog creva, odnosno u njegovim tunikama
- da li akrilamid, u akutnom i subhroničnom delovanju, dovodi do strukturnih promena u sluzokoži debelog creva, odnosno tipu mukusa sekretovanog od strane peharastih ćelija lamine epitelijalis
- da li akrilamid, u akutnom i subhroničnom delovanju, utiče na brojnost ćelija GALT-a, pre svega na: limfocite, mastocite i eozinofile u mukozi debelog creva

3. MATERIJA I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U eksperimentima su korišćeni mužjaci belih laboratorijskih pacova soja Wistar uzgajani u gajilištu za laboratorijske životinje Departmana za biologiju i ekologiju na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. 22. postnatalnog dana (PND) životinje su odvojene od majki, izmerene i raspoređene u eksperimentalne grupe. U svakoj eksperimentalnoj grupi je bilo po 5 životinja koje su držane u istom kavezu. Sve eksperimentalne grupe bile su podvrgnute kontrolisanom dnevno-noćnom ritmu svetlosti (12 h svetlosti, 12 h tame, svetlo se palilo u 7 h ujutro) i temperaturi vazduha od $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Hranjene su standardnom peletiranom hranom za laboratorijske životinje, a vodu su uzimale po potrebi.

Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Univerziteta u Novom Sadu, odlukom broj: IV-2010-01.

3.2. EKSPERIMENTALNI PLAN

U okviru ove disertacije izvedena su tri eksperimenta, jedan subhronični i dva akutna. Svi eksperimenti su počeli 23. PND. Akrilamid (AA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Germany) je rastvoren u destilovanoj vodi i putem gavaže je aplikovan pacovima u ranim jutarnjim časovima. Prva eksperimentalna grupa je tretirana sa 25 mg/kg telesne težine AA, druga grupa pacova je tretirana sa 50 mg/kg telesne težine AA, dok je treća grupa životinja bila kontrolna i njima je oralno aplikovana samo destilovana voda.

Tokom eksperimenta redovno je praćena telesna težina životinja kao i njihovo opšte stanje.

3.2.1. Subhronični eksperiment

Subhronični eksperiment je trajao tri nedelje, od 23. do 42. PND. Aplikacija AA tokom trajanja eksperimenta je bila diskontinuirana, 5 dana aplikacije pa dva dana pauze. Životinje su žrtvovane 24 h nakon poslednje aplikacije AA.

Tokom trajanja eksperimenta životinje su merene na svaka dva dana, kao i na dan žrtvovanja.

3.2.2. Akutni eksperiment

U prvom akutnom eksperimentu životinjama je aplikovan AA 23. PND, a 24 h nakon tretmana životinje su žrtvovane.

U drugom akutnom eksperimentu aplikacija AA izvršena je 23. PND, a životinje su žrtvovane 72 h nakon tretmana.

U oba eksperimenta životinje su merene dan pre početka eksperimenta, kao i na dan žrtvovanja.

3.3. HISTOLOŠKA ANALIZA UZORAKA KOLONA

U sva tri eksperimenta životinje su žrtvovane dekapitacijom u dietil etar narkozi. Uzorci debelog creva uzeti su odmah nakon žrtvovanja životinja. Uzorkovan je deo debelog creva odmah iza slepog creva.

3.3.1. Histološka obrada uzoraka kolona

Za svetlosno-mikroskopska istraživanja, uzorci kolona su fiksirani u 10% formalinu tokom 24 h. Nakon toga je sledila dehidracija u seriji alkohola (70%, 96%, 100%) i prosvetljavanje u ksilolu. Uzorci tkiva su kalupljeni u parafinu. Parafinski kalupi debelog creva sečeni su na Reichert-ovom rotacionom mikrotomu u rezove debljine 5 µm.

3.3.2. Metode bojenja

3.3.2.1. Klasične i histoheмиjske metode bojenja

Dobijeni preseki su bojeni klasičnom histološkom metodom bojenja sa hematoksilinom i eozinom (H&E) (Merck, Darmstadt Germany) za prikazivanje tunika debelog creva i histopatološku analizu kolona. Na ovim uzorcima analizirani su i limfociti.

Za prikazivanje mucina u peharastim ćelijama korišćene su dve metode bojenja: PAS-AB (periodic acid Schiff-alcian blue) (Merck, Darmstadt Germany) i HID-AB (high iron diamine-alcian blue) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Germany). PAS-AB metoda bojenja

je korišćena za prikaz neutralnih i kiselih mucina u peharastim ćelijama (Sl. 5). Kiseli mucini se boje svetlo plavo (AB-pozitivni), dok su neutralni mucini PAS-pozitivni i boje se crveno/rozo. Pored ova dva tipa ćelija posmatrane su i ćelije koje sadrže oba tipa mucina i one se navedenom metodom boje tamno ljubičasto (Sl. 5). HID-AB metoda bojenja je korišćena za bolji uvid u prisustvo kiselih mucina u peharastim ćelijama. Sulfomucini se ovom metodom boje braon/crno (HID-pozitivni), a sijalomucini svetlo plavo (AB-pozitivni).

U cilju prikazivanja mastocita u debelom crevu preseci su bojeni Toluidin plavim (TB) (Acros Organics, New Jersey, USA). Prisustvo sulfata (heparin, hondroitin-sulfat) u mastocitima indukuje njihov afinitet za HID, stoga će biti analizirani i mastociti u presecima kolona koji su bojeni sa HID-AB metodom bojenja.

Carbol chromotrope (fenol Erba Lachema, Brno Czech Republic; chromotrope 2R Fluka, Buchs Switzerland) metoda bojenja je korišćena za vizualizaciju eozinofila u lamini propriji, tunike mukoze, debelog creva.

3.3.2.2. Procedura za imunohistohemijska bojenja

Za imunohistohemijska bojenja preseci su hvatani na silanske pločice.

U cilju određivanja MUC2 pozitivnih peharastih ćelija u sluzokoži debelog creva korišćen je Ultravision LP sistem za detekciju (Ultravision LP Detection System, Thermo Scientific, UK), kao i pacovsko anti-MUC2 (Abcam, UK) primarno antitelo. Kao pretretman, preseci kolona su kuvani 10 min u 10 mM citratnom puferu. Primarno antitelo je razblaženo u odnosu 1:75, a za razblaživanje je korišćen TBS sa dodatkom 2% BSA (Sigma, Darmstadt, Germany). Za vizualizaciju vezanih antitela korišćen je 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (Thermo Scientific, UK). Jedra su kontrastirana sa Majerovim hematoksilinom.

3.4. ANALIZA REZULTATA

3.4.1. Semikvantitativna analiza uzoraka kolona

3.4.1.1. Analiza peharastih ćelija i sadržaja mucina u uzorcima kolona

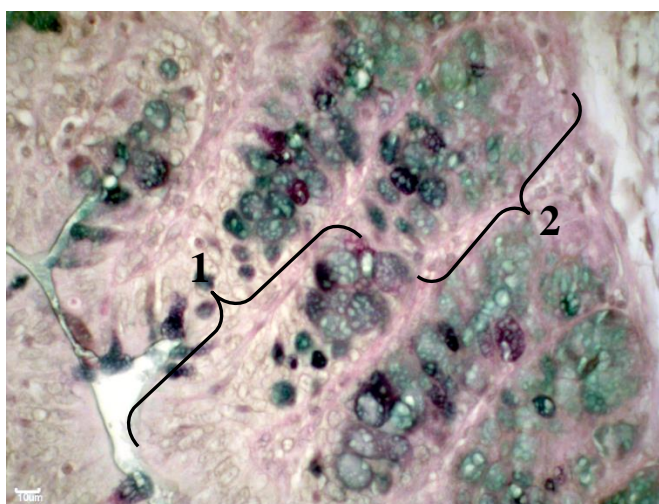
Na presecima debelog creva koji su bojeni sa PAS-AB i HID-AB posmatrana je distribucija, brojnost i obojenost peharastih ćelija posebno u donjem i u gornjem delu kripte (Sl. 5). Brojevima od 0 do 5 označena je zastupljenost pojedinih tipova peharastih ćelija: 0 - odsustvo

ćelija, 1 - retke ćelije, 2 - mali broj ćelija, 3 - srednji broj ćelija, 4 - brojne ćelije, 5 - veoma brojne ćelije. Dobijene vrednosti su korišćene za dalju statističku obradu.

Na uzorcima bojenim PAS-AB metodom bojenja (Sl. 5) analizirane su peharaste ćelije sa sadržajem neutralnih i kiselih mucina, kao i ćelije koje su sadržale oba tipa mucina istovremeno. Analizirana je i ukupna zastupljenost peharastih ćelija koje su se obojile navedenom metodom bojenja.

Na uzorcima bojenim HID-AB metodom bojenja izvršena je semikvantitativna analiza sulfomucina i sijalomucina u peharastim ćelijama, kao i ukupna zastupljenost obojenih peharastih ćelija u gornjem i donjem delu Liberkinove kripte u sluznici kolona.

Semikvantitativna analiza korišćena je i za kvantifikaciju MUC2 pozitivnih peharastih ćelija, takođe posebno u gornjem a posebno u donjem delu kripte uz upotrebu istih, gore navedenih, numeričkih vrednosti (0-5).



Slika 5. Fotomikrografija debelog creva pacova. Gornji deo Liberkinove kripte kolona (1), donji deo Liberkinove kripte kolona (2). Peharaste ćelije sa kiselim mucinima su svetlo plave, dok su one sa neutralnim mucinima crvene. Tamno ljubičaste ćelije sadrže i kisele i neutralne mucine. PAS-AB.

3.4.1.2. Analiza limfocita u uzorcima kolona

Zastupljenost limfocita na uzorcima kolona bojenim sa H&E određena je semikvantitativnom metodom. Brojevima od 0 do 3 označena je zastupljenost limfocita u kolonu, posebno u epitelu i lamini propriji. U epitelu: 0 - odsustvo limfocita, 1 – retki, sporadični limfociti, 2 - mali broj limfocita, 3 - veliki broj limfocita. U lamini propriji: 0 - odsustvo ćelija, 1 – retki,

pojedinačni limfociti, 2 – mali infiltrati limfocita ili brojne pojedinačne ćelije, 3 – prisustvo limfocita u vidu gustog infiltrata.

3.4.2. Kvantitativna analiza uzoraka kolona

3.4.2.1. Stereološka analiza zida kolona

Uzorci kolona iz subhroničnog eksperimenta bojeni sa H&E korišćeni su za stereološku analizu tunika i lamina koje ulaze u sastav zida debelog creva (Sl. 6). Zid kolona analiziran je upotrebom Weibel-ovog mnogonamenskog testnog sistema sa 42 tačke (M42) (Weibel, 1979) koji je bio ugrađen u okular svetlosnog mikroskopa. Stereološka analiza izvršena je na svakom četvrtom serijskom preseku debelog creva na ukupno 100 vidnih polja po životinji na Reichert-ovom mikroskopu (Reichert, Austria) pri ukupnom uvećanju 250x. Određene su volumenske gustine (V_v): tunike mukoze ($V_{v_{tm}}$), lamine epitelijalis ($V_{v_{le}}$), lamine proprije ($V_{v_{lp}}$), lamine muskularis mukoze ($V_{v_{lms}}$), tunike submukoze ($V_{v_{ts}}$), i tunike muskularis ($V_{v_{tms}}$).

Volumenske gustine lamine epitelijalis ($V_{v_{le}}$), lamine proprije ($V_{v_{lp}}$), lamine muskularis mukoze ($V_{v_{lms}}$), tunike submukoze ($V_{v_{ts}}$), i tunike muskularis ($V_{v_{tms}}$) određene su na osnovu sledeće formule

$$V_{ve} = \frac{Pe}{Pt} = \frac{\sum 60Pe}{42 \cdot 60} [\text{mm}^0]$$

Pe = broj tačaka testnog sistema koje padaju na ispitivani deo zida kolona

Pt = ukupan broj tačaka testnog sistema

Volumenska gustina tunike mukoze ($V_{v_{tm}}$) određena je sabiranjem volumenskih gustina lamine epitelijalis ($V_{v_{le}}$), lamine proprije ($V_{v_{lp}}$) i lamine muskularis mukoze ($V_{v_{lms}}$)

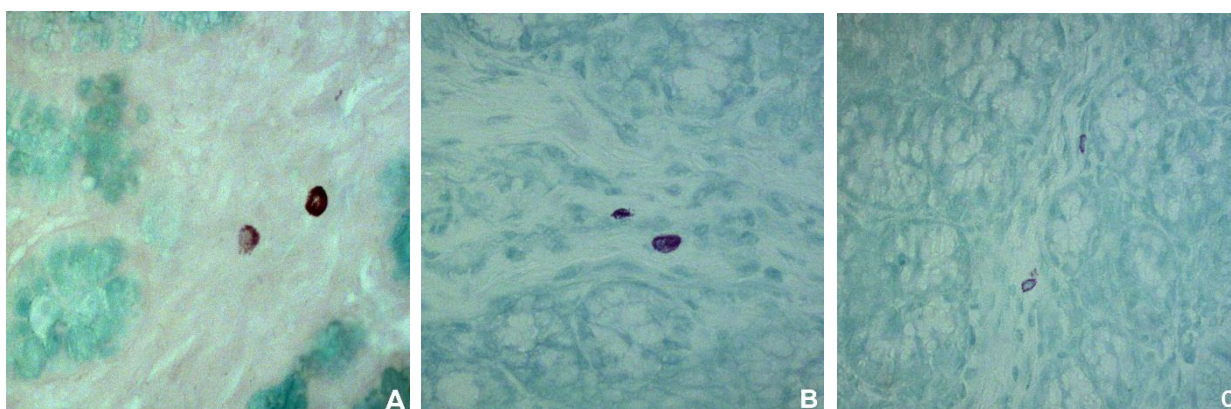
$$V_{v_{tm}} = V_{v_{le}} + V_{v_{lp}} + V_{v_{lms}} [\text{mm}^0]$$



Slika 6. Delovi zida kolona. Tunika mukoza (1), lamina epitelijalis (#), lamina proprija (*), lamina muskularis mukoze (isprekidana linija), tunika submukoza (2), tunika muskularis (3). H&E.

3.4.2.2. Analiza broja mastocita u uzorcima kolona

Mastociti su brojani na uzorcima debelog creva bojenih sa TB i HID-AB metodom (Sl. 7). Određen je totalni broj mastocita u obe metode bojenja. Analiza mastocita urađena je na svakom četvrtom serijskom preseku na ukupno 3 preseka po životinji pri uvećanju objektiva 40x i okulara 10x. Za svaku životinju izbrojan je ukupan broj mastocita na sva tri preseka i izračunat je prosečan broj mastocita po životinji. Ovako dobijene vrednosti su korišćene za dalju statističku obradu.



Slika 7. Prikaz HID-AB pozitivnih (A) i TB pozitivnih mastocita (B, C).

3.4.2.3. Analiza broja eozinofila u uzorcima kolona

Analiza broja eozinofili rađena je na uzorcima debelog creva bojenim sa Carbol chromotrope metodom koja je specifična za prikaz eozinofila u tkivu. Eozinofili su brojani pri uvećanju objektiva 40x i okulara 10x na deset vidnih polja (Casella, 2009). Ovako dobijene vrednosti su korišćene za dalju statističku obradu.

3.4.3. Statistička obrada podataka

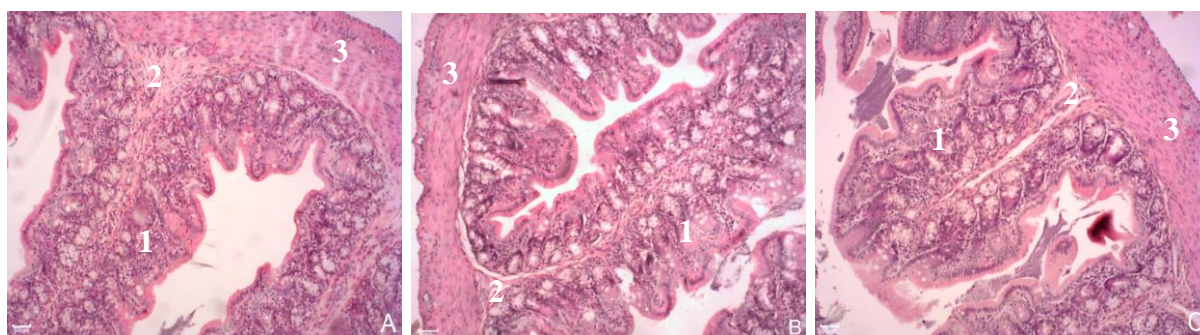
U postupku statističke obrade podataka dobijenih analizom uzoraka kolona pacova signifikantnost razlika proveravana je analizom varijanse (one-way ANOVA) i *Fisher LSD* testom. Vrednosti $p < 0.05$ smatrane su statistički signifikantnim.

4. REZULTATI

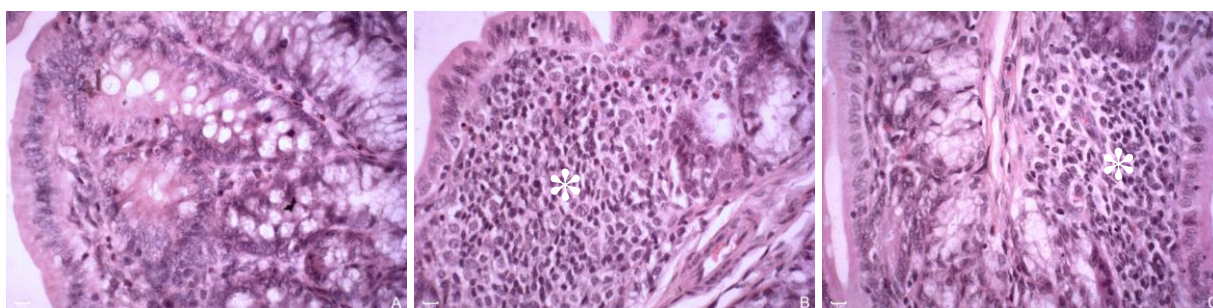
4.1. REZULTATI SUBHRONIČNOG IZLAGANJA AKRILAMIDU

4.1.1. Morfologija debelog creva

Histološka analiza tunika debelog creva pokazala je promene u debljini submukoze i mišićnog sloja dok promene u volumenu mukoze nisu uočene (Sl. 8). Volumen submukoze je smanjen kod obe tretirane grupe u odnosu na kontrolne životinje. Posmatranjem mišićnog sloja kolona uočeno je smanjenje volumena ovog sloja kod niže doze AA i povećanje volumena mišića kod životinja tretiranih višom dozom AA u odnosu na kontrolu. U mukozi debelog creva kod pojedinih tretiranih životinja uočena je infiltracija limfocita (Sl. 9). Primećuje se da je ova infiltracija intenzivnija kod tretmana nižom nego kod tretmana višom dozom AA.



Slika 8. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C); tunika mukoza (1), tunika submukoza (2), tunika muskularis (3). Evidentno je smanjenje volumena submukoze kod (B, C) u odnosu na (A). Zapaža se smanjenje volumena mišića kod (B) u odnosu na (A) kao i povećanje volumena mišića kod (C) u odnosu na (A) nakon subhroničnog izlaganja akrilamidu. H&E. Bar 50 μ m.



Slika 9. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). Na (B, C) se uočava infiltracija limfocita (*) u lamini propriji tunike mukoze nakon subhroničnog izlaganja akrilamidu. H&E. Bar 10 μ m.

Histološki nalaz potvrdila je stereološka analiza volumenskih gustina (V_v): tunike mukoze ($V_{v_{tm}}$), lamine epitelijalis ($V_{v_{le}}$), lamine proprije ($V_{v_{lp}}$), lamine muskularis mukoze ($V_{v_{lms}}$), tunike submukoze ($V_{v_{ts}}$), i tunike muskularis ($V_{v_{tms}}$) (Tab. 2, Graf. 1). U grupi životinja tretiranih nižom dozom AA $V_{v_{tm}}$ je bila statistički značajno povećana ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolu. U prilog predhodnom nalazu ide i trend povećanja koji je zapažen kod $V_{v_{le}}$, kao i statistički značajno povećanje $V_{v_{lp}}$ ($p < 0.05$). Kod $V_{v_{lms}}$ zapažen je trend smanjenja vrednosti volumenske gustine ali lamina muskularis čini mali udeo u ukupnom volumenu tunike mukoze i njen pad nije mogao bitno da promeni ukupan volumen tunike. U grupi životinja tretiranih višom dozom AA zapaža se trend povećanja $V_{v_{tm}}$ u odnosu na kontrolu, $V_{v_{le}}$ je ostala nepromenjena u poređenju sa kontrolnim životinjama, dok je $V_{v_{lp}}$ bila statistički značajno povećana ($p < 0.05$). $V_{v_{lms}}$ je u tretmanu višom dozom AA statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$) kao i u odnosu na nižu dozu AA ($p < 0.05$) što ukazuje na trend linearnog smanjenja vrednosti $V_{v_{lms}}$ u odnosu na dozu AA.

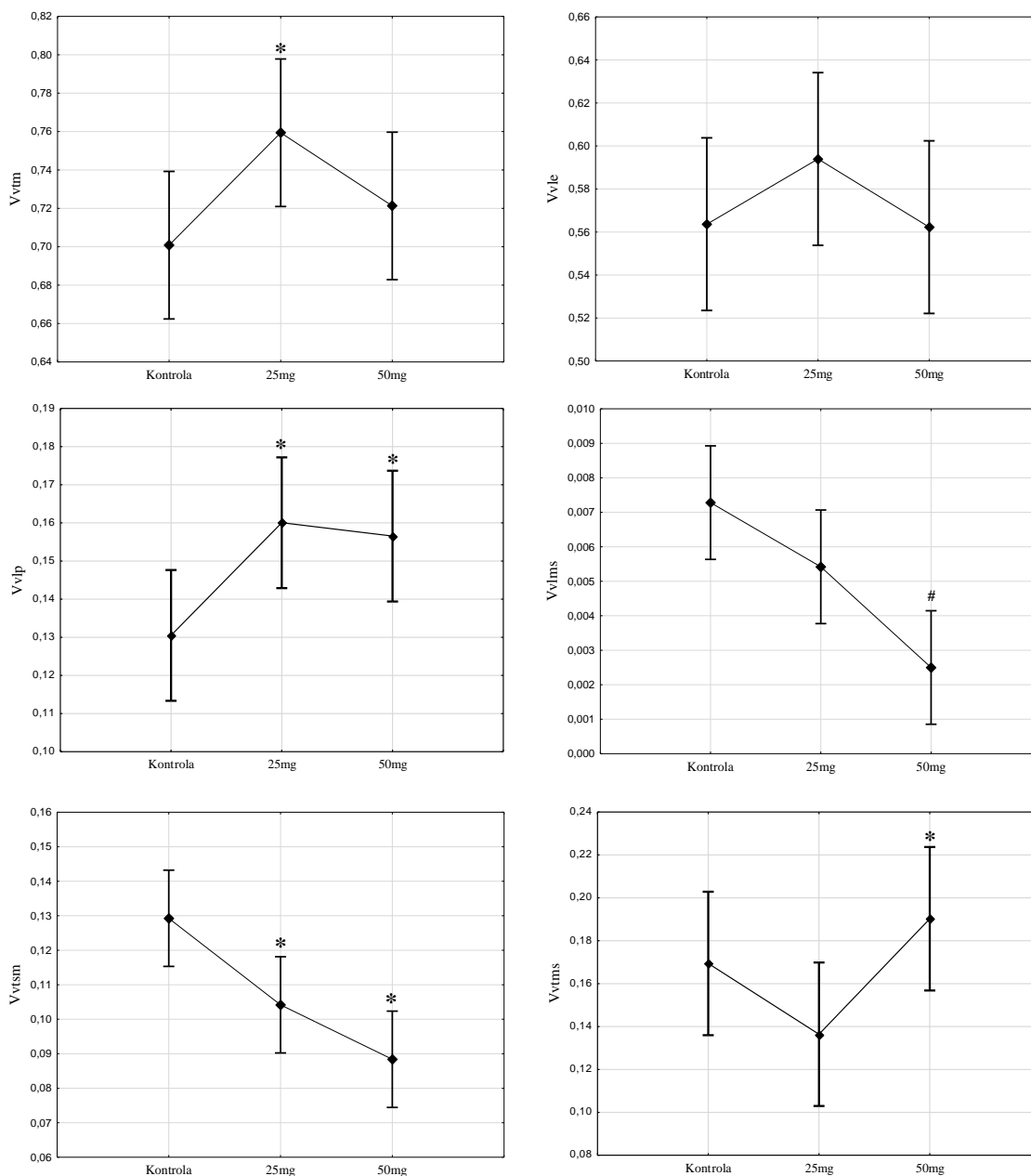
Tabela 2. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za: volumensku gustinu tunike mukoze ($V_{v_{tm}}$), volumensku gustinu lamine epitelijalis ($V_{v_{le}}$), volumensku gustinu lamine proprije ($V_{v_{lp}}$), volumensku gustinu lamine muskularis mukoze ($V_{v_{lms}}$), volumensku gustinu tunike submukoze ($V_{v_{ts}}$) i volumensku gustinu tunike muskularis ($V_{v_{tms}}$) zida kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom

Stereološki parametri	Kontrola	AA 25mg/kg	AA 50mg/kg
$V_{v_{tm}}$ (mm^3/mm^3)	0.7008 ± 0.0530	0.7594 ± 0.0323^a	0.7213 ± 0.0285
$V_{v_{le}}$ (mm^3/mm^3)	0.5636 ± 0.0573	0.5940 ± 0.0286	0.5623 ± 0.0315
$V_{v_{lp}}$ (mm^3/mm^3)	0.1305 ± 0.0213	0.1600 ± 0.0174^a	0.1565 ± 0.0132^a
$V_{v_{lms}}$ (mm^3/mm^3)	0.0067 ± 0.0024	0.0054 ± 0.0015	$0.0025 \pm 0.0007^{b,c}$
$V_{v_{ts}}$ (mm^3/mm^3)	0.1293 ± 0.0152	0.1042 ± 0.0150^a	0.0884 ± 0.0126^c
$V_{v_{tms}}$ (mm^3/mm^3)	0.1694 ± 0.0408	0.1364 ± 0.0195	0.1902 ± 0.0386^b

^a $p < 0.05$ u odnosu na kontrolu, ^b $p < 0.05$ u odnosu na 25 mg/kg AA, ^c $p < 0.01$ u odnosu na kontrolu

$V_{v_{ts}}$ pokazuje statistički značajno smanjenje kod niže doze AA ($p = 0.0170$) kao i kod više doze AA ($p = 0.0007$) u odnosu na kontrolu. p vrednosti ukazuju na trend linearnog smanjenja vrednosti $V_{v_{ts}}$ u odnosu na dozu AA.

$V_{v_{tms}}$ kod niže doze AA pokazuje trend smanjenja, a kod više doze AA trend povećanja. Navedene promene nisu bile statistički značajne u odnosu na kontrolu, ali je bila signifikantna razlika između dve tretirane grupe ($p = 0.0290$).



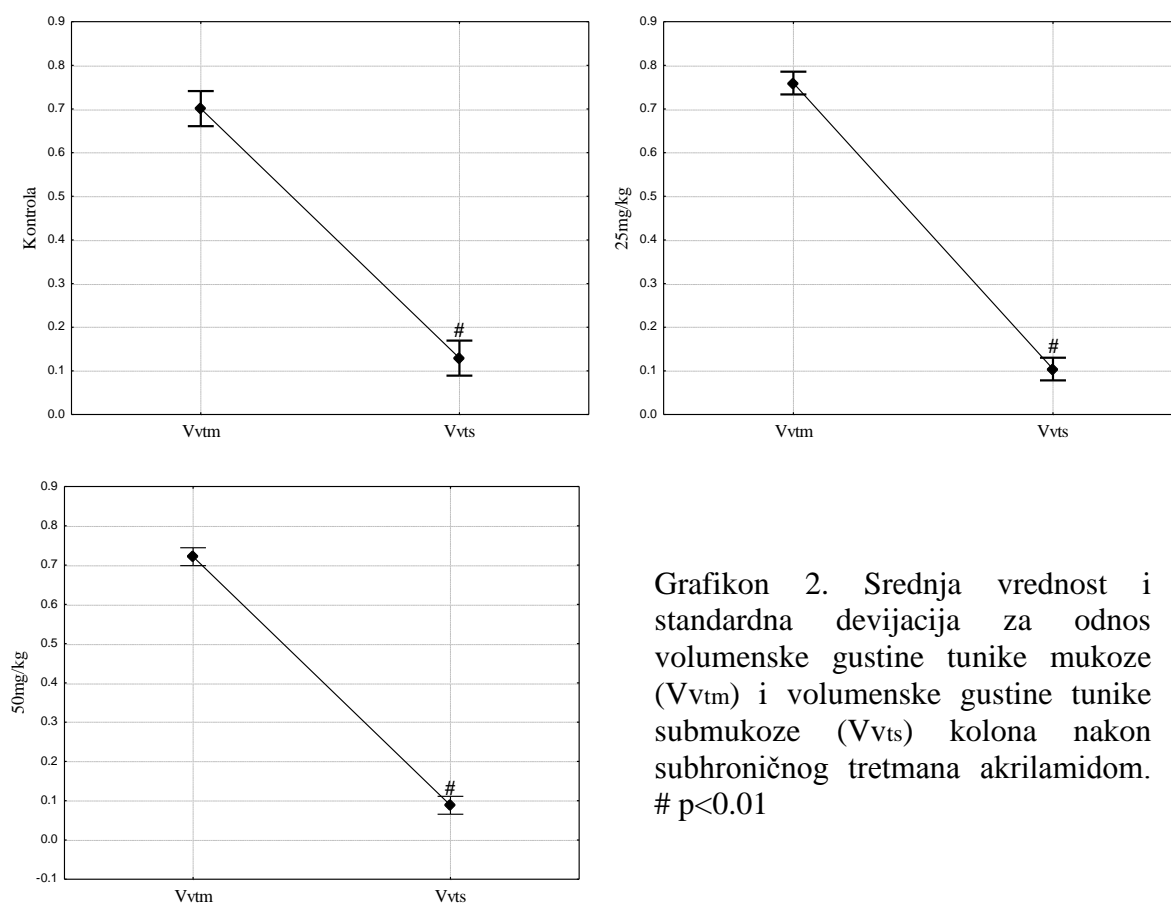
Grafikon 1. Srednja vrednost i standardna devijacija za: volumensku gustinu tunike mukoze ($V_{v_{tm}}$), volumensku gustinu lamine epitelijalis ($V_{v_{le}}$), volumensku gustinu lamine proprije ($V_{v_{lp}}$), volumensku gustinu lamine muskularis mukoze ($V_{v_{lms}}$), volumensku gustinu tunike submukoze ($V_{v_{ts}}$) i volumensku gustinu tunike muskularis ($V_{v_{tms}}$) kolona kontrolnih i tretiranih životinja nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$

Određivanjem odnosa volumenskih gustinapojedinih delova zida kolona: $V_{v_{tm}}/V_{v_{ts}}$, $V_{v_{tm}}/V_{v_{tms}}$ i $V_{v_{ts}}/V_{v_{tms}}$ pokazano je da je odnos $V_{v_{ts}}/V_{v_{tms}}$ bio najstabilniji tokom tretmana, smanjen je bio samo kod više doze AA (Tab. 3, Graf. 4) dok je samo odnos $V_{v_{tm}}/V_{v_{ts}}$ rastao u odnosu na doze AA (Tab. 3, Graf. 2). Odnos $V_{v_{tm}}/V_{v_{tms}}$ se kod niže doze AA povećao, a kod više doze AA se smanjio u odnosu na kontrolu (Tab. 3, Graf. 3). Odnos $V_{v_{le}}/V_{v_{lp}}$ i $V_{v_{lp}}/V_{v_{ts}}$ (Tab. 3, Graf. 5, Graf. 6) kod tretiranih pacova je bio u padu u poređenju sa kontrolom.

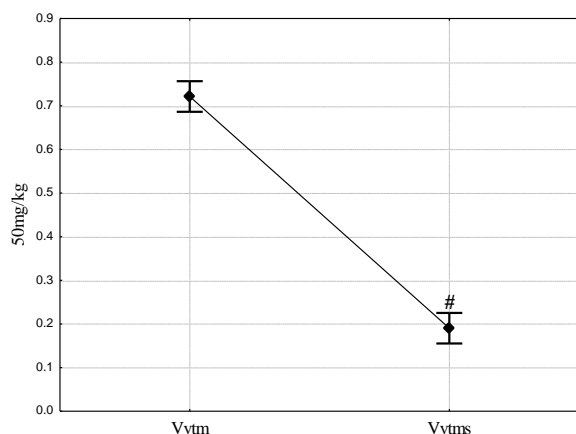
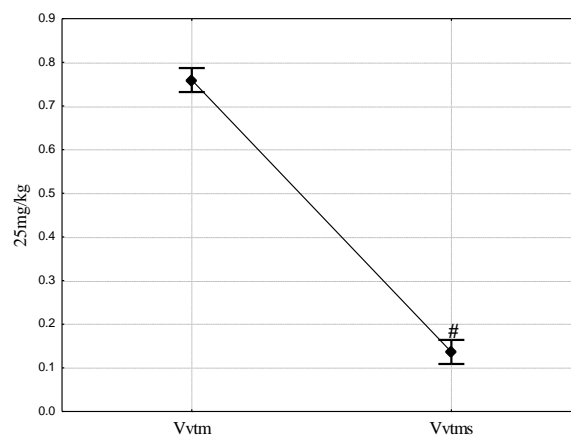
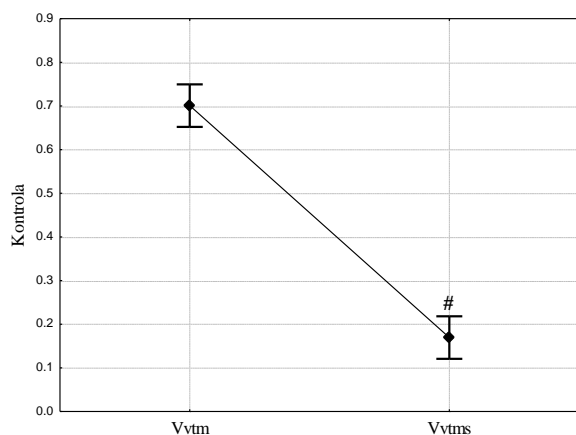
Tabela 3. Odnos V_{Vtm}/V_{Vts} , V_{Vtm}/V_{Vtms} , V_{Vts}/V_{Vtms} , V_{Vle}/V_{Vlp} i V_{Vlp}/V_{Vts} u zidu kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Stereološki parametar				
	V_{Vtm}/V_{Vts}	V_{Vtm}/V_{Vtms}	V_{Vts}/V_{Vtms}	V_{Vle}/V_{Vlp}	V_{Vlp}/V_{Vts}
Kontrola	5.42	4.14	0.76	4.32	0.99
AA 25mg/kg	7.29	5.57	0.76	3.71	0.65
AA 50mg/kg	8.16	3.79	0.46	3.59	0.56

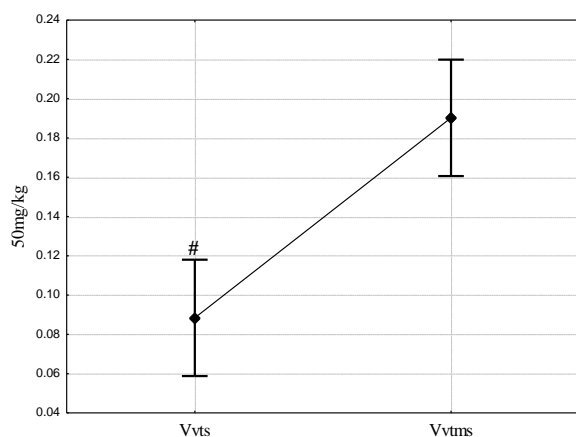
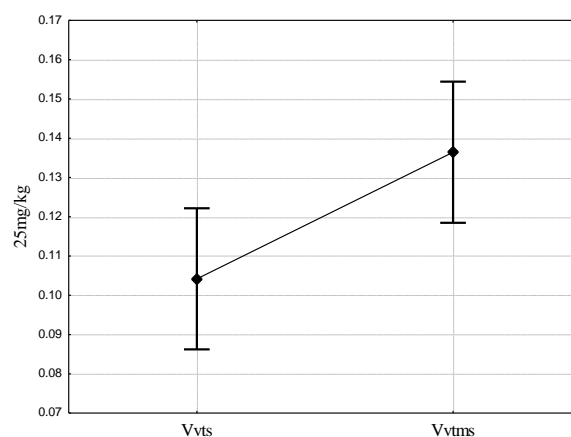
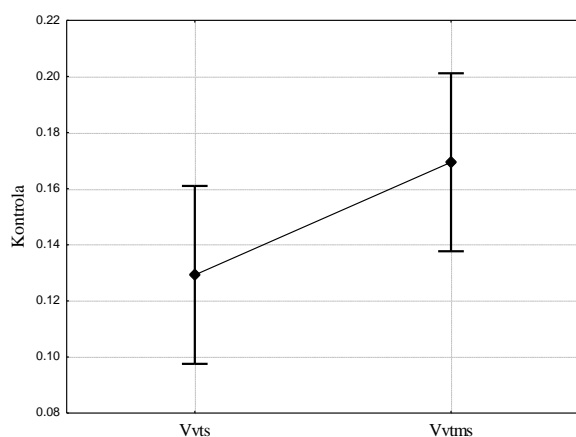
V_{Vtm} : volumenska gustina tunike mukoze; V_{Vts} : volumenska gustina tunike submukoze; V_{Vtms} : volumenska gustina tunike muskularis; V_{Vle} : volumenska gustina lamine epitelijalis; V_{Vlp} : volumenska gustina lamine proprije



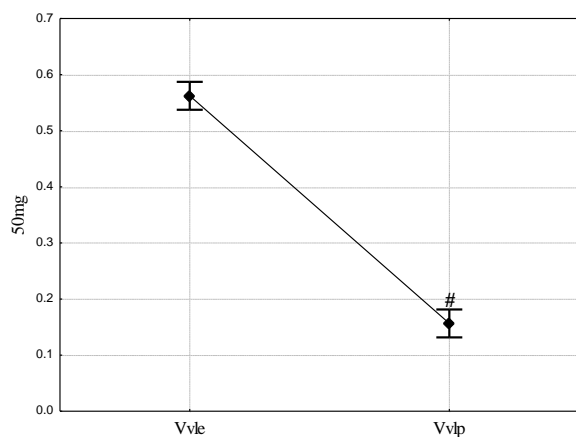
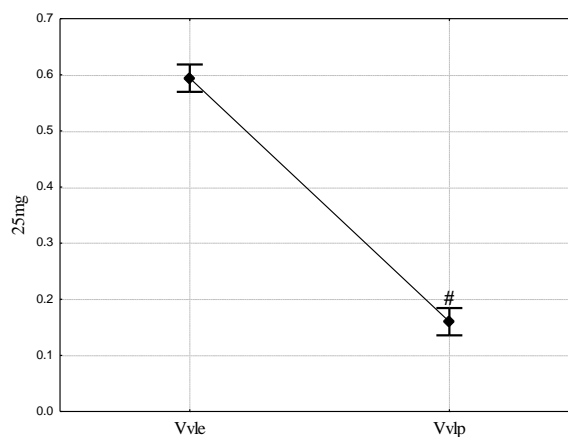
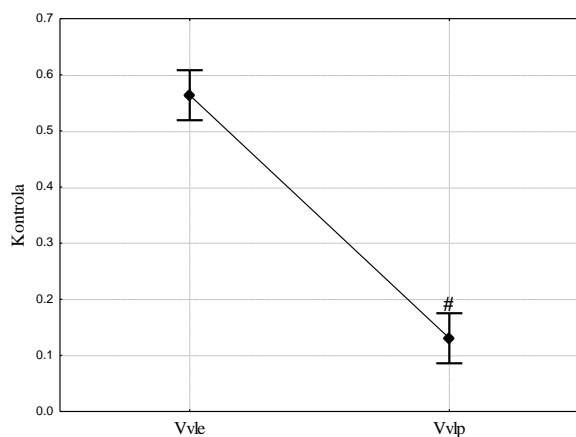
Grafikon 2. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos volumenske gustine tunike mukoze (V_{Vtm}) i volumenske gustine tunike submukoze (V_{Vts}) kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. # $p < 0.01$



Grafikon 3. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos volumenske gustine tunike mukoze (Vv_{tm}) i volumenske gustine tunike muskularis (Vv_{tms}) kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. # p<0.01

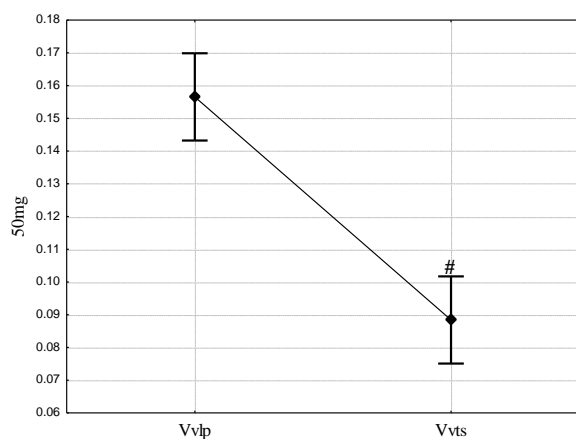
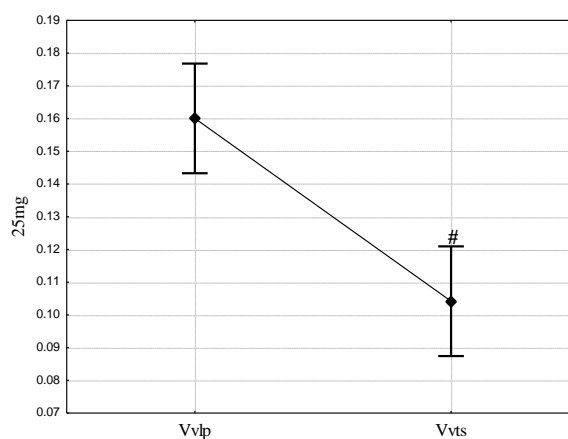
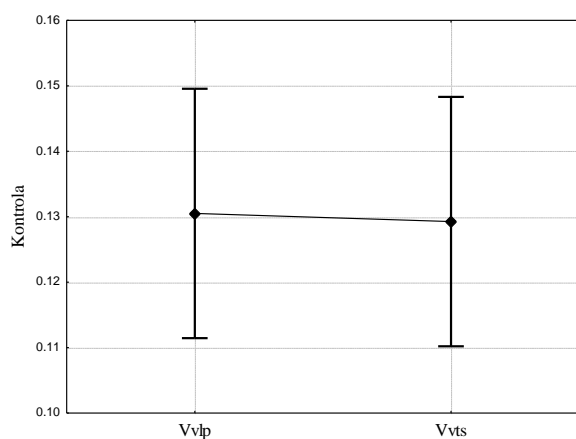


Grafikon 4. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos volumenske gustine tunike submukoze (Vv_{ts}) i tunike muskularis (Vv_{tms}) kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. # p<0.01



Grafikon 5. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos volumenske gustine lamine epitelijalis (Vvle) i lamine proprije (Vvlp) kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom.

$p < 0.01$



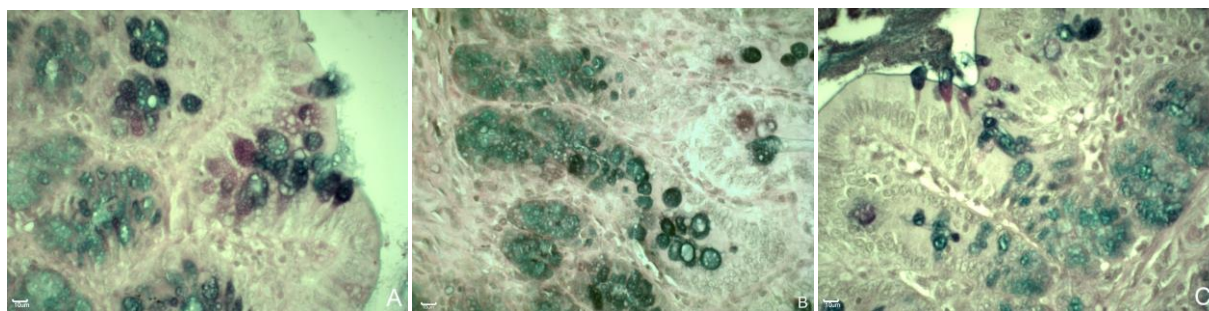
Grafikon 6. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos volumenske gustine lamine proprije (Vvlp) i volumenske gustine tunike submukoze (Vvts) kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom.

$p < 0.01$

4.1.2. Peharaste ćelije i sadržaj mucina

4.1.2.1. PAS-AB

Na rezovima kolona bojenih sa PAS-AB kod svih životinja zapaža se dominacija zrelih, kiselih mucina u donjem delu kripte (Sl. 10). Nezrele peharaste ćelije sa neutralnim mucinima kao i one koje sadrže oba tipa mucina prisutne su u većem broju u gornjem delu kripte. Histološka analiza peharastih ćelija kolona pokazala je smanjen broj navedenih ćelija u gornjem delu kripte kod jedinki tretiranih sa AA u odnosu na kontrolu (Sl. 10 B, C). Kod više doze AA (Sl. 10 C) u gornjem delu kripte vide se ćelije u fazi egzocitoze kao i velika količina mukusnog materijala u lumenu kolona. AA je uticao i na distribuciju mucina u peharastim ćelijama, pa se kod tretiranih životinja primećuje pad u broju ćelija sa neutralnim mucinima i povećanje broja ćelija sa kiselim mucinima u gornjem delu kripte (Sl. 10 B, C) u odnosu na kontrolu.



Slika 10. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). Vidi se distribucija kiselih (plave ćelije), neutralnih (pink ćelije) i miks mucina (ljubičaste ćelije) u peharastim ćelijama kolona u donjem i gornjem delu kripte, kao i smanjen broj ukupnih peharastih ćelija u gornjem delu kripte kolona kod (B, C) nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. PAS-AB. Bar 10 μ m.

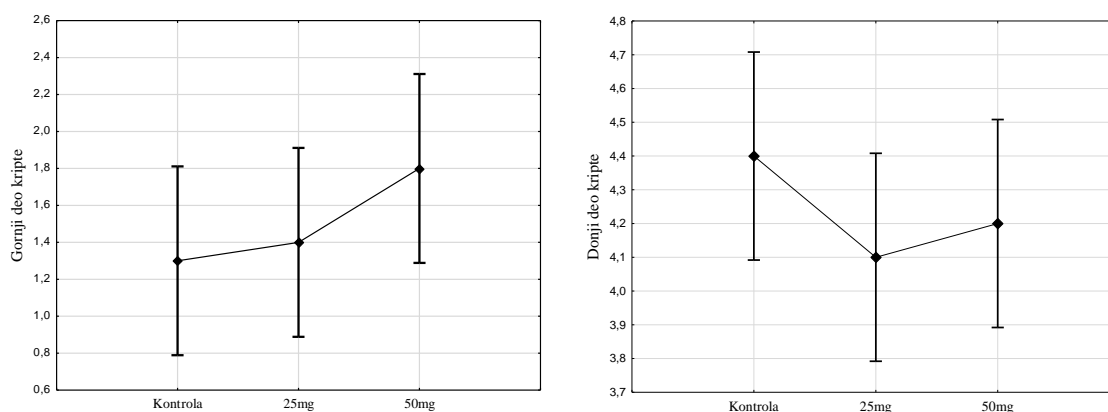
Statistička analiza zastupljenosti peharastih ćelija sa pojedinim tipovima mucina pokazala je signifikantno smanjenje ($p < 0.05$) u distribuciji peharastih ćelija sa neutralnim mucinima u donjem delu kripte kod niže doze AA u odnosu na kontrolu (Tab. 4, Graf. 8). Signifikantno smanjenje ($p < 0.05$) je evidentirano i u distribuciji peharastih ćelija sa miksom kiselih i neutralnih mucina u gornjem delu kripte, kod više doze AA, u poređenju kako sa kontrolom tako i sa nižom dozom AA (Tab. 4, Graf. 9). U gornjem delu kripte zapaženo je linearno povećanje zastupljenosti peharastih ćelija sa kiselim mucinima kod tretiranih grupa u odnosu na kontrolu, ali to povećanje nije bilo statistički signifikantno (Tab. 4 Graf. 7). Kada se posmatra ukupan broj peharastih ćelija primećuje se smanjenje njihove brojnosti kod

tretiranih životinja u odnosu na kontrolu, ali taj pad nije bio statistički značajan (Tab. 4, Graf. 10).

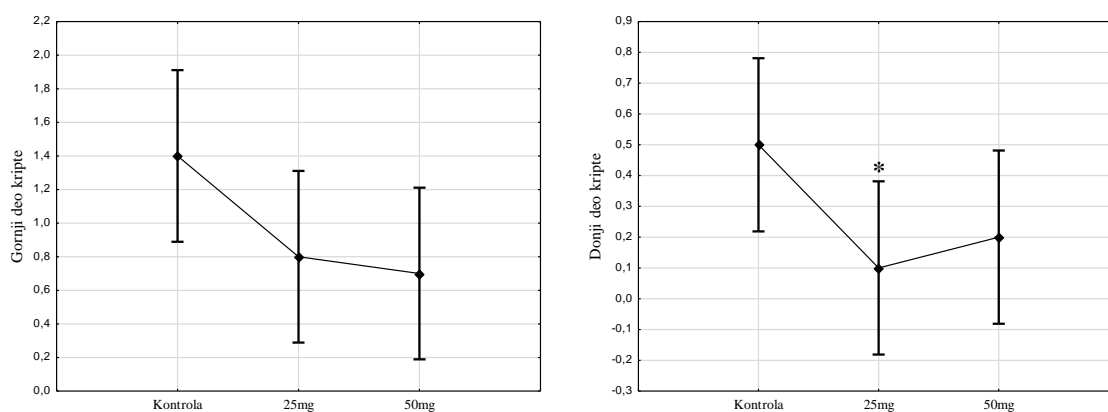
Tabela 4. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za mucine u peharastim ćelijama kolona bojene PAS-AB pH 2.5 metodom nakon subhroničnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Deo kripe	Ukupni mucini	Neutralni mucini	Kiseli mucini	Mix neutralnih i kiselih mucina
K	Gornji	5.50 ± 1.27	1.40 ± 0.42	1.30 ± 0.76	2.80 ± 0.27
	Donji	5.80 ± 0.45	0.50 ± 0.35	4.40 ± 0.22	0.90 ± 0.22
25 mg/kg AA	Gornji	4.90 ± 1.39	0.80 ± 0.67	1.40 ± 0.42	2.88 ± 0.85
	Donji	5.30 ± 0.76	0.10 ± 0.22 ^a	4.10 ± 0.22	1.25 ± 0.65
50 mg/kg AA	Gornji	4.40 ± 0.42	0.70 ± 0.45	1.80 ± 0.27	1.92 ± 0.58 ^{a,b}
	Donji	5.30 ± 0.57	0.20 ± 0.27	4.20 ± 0.45	0.83 ± 0.26

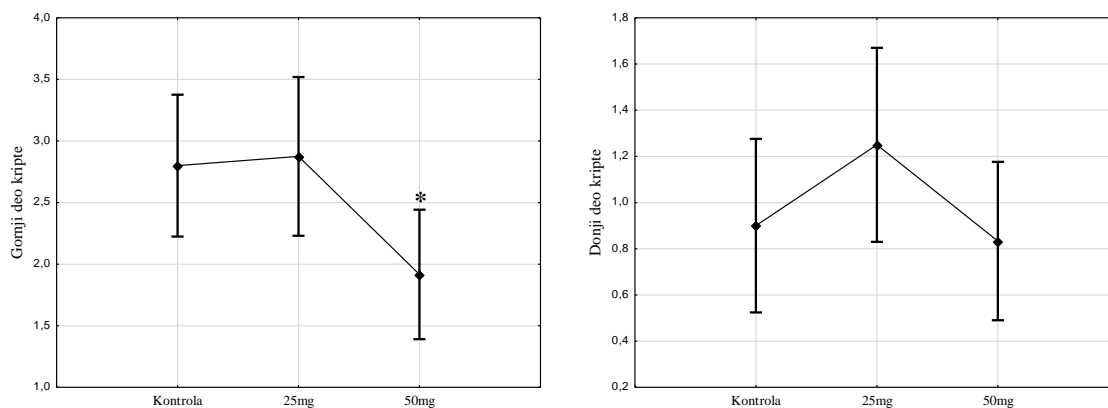
^a p<0.05 u odnosu na kontrolu, ^b p<0.05 u odnosu na 25 mg/kg AA



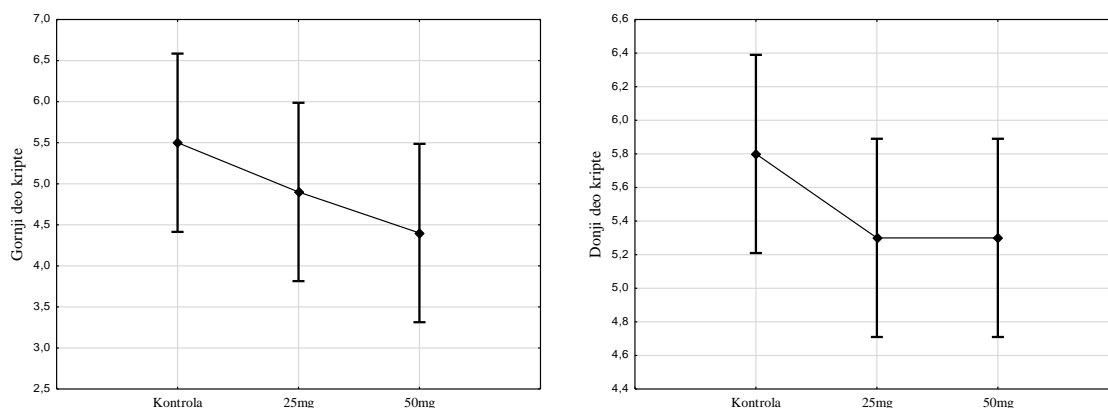
Grafikon 7. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa kiselim mucinima u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom.



Grafikon 8. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa neutralnim mucinima u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. * p<0.05



Grafikon 9. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa miksom kiselih i neutralnih mucina u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. * $p < 0.05$



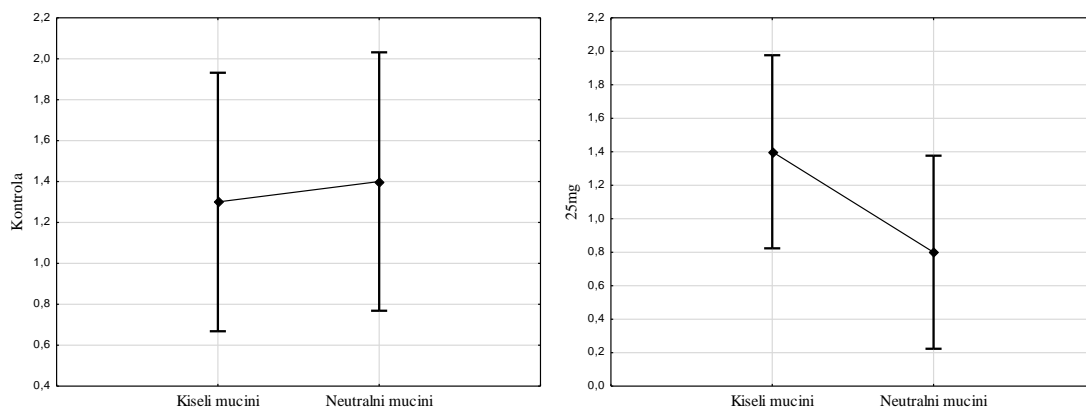
Grafikon 10. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju svih peharastih ćelija u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom.

Odnos zastupljenosti neutralnih prema kiselim mucinima u peharastim ćelijama kolona pokazao je smanjenje u gornjem delu kripe kod obe tretirane grupe životinja (Tab. 5, Graf. 11). Zapaženo smanjenje bilo je signifikantno samo kod više doze AA. U donjem delu kripe odnos distribucije neutralnih prema kiselim mucinima nije se menjao kod tretiranih u odnosu na kontrolne životinje (Ta5. 4, Graf. 12).

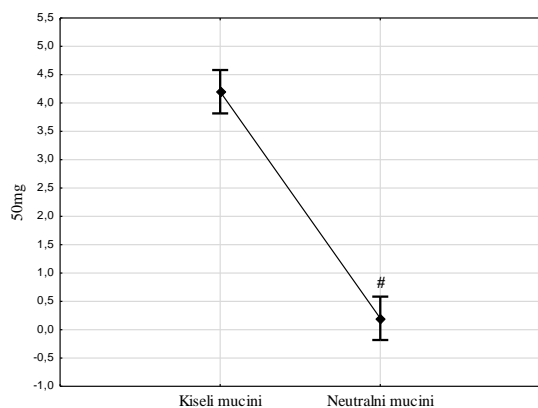
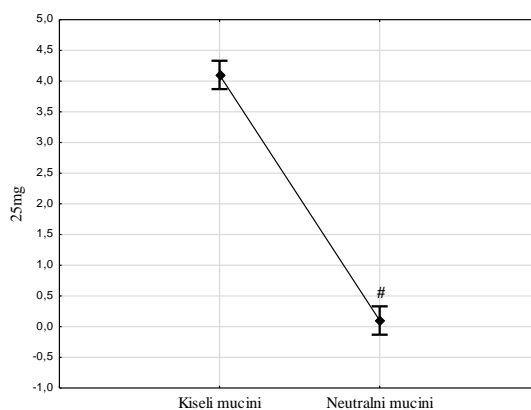
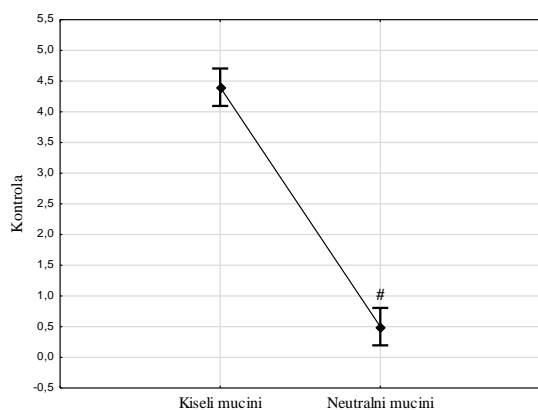
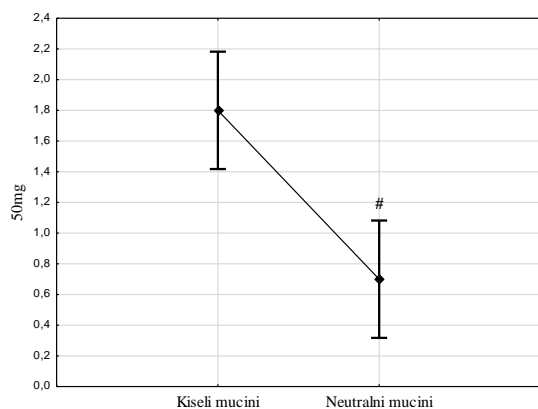
Tabela 5. Odnos neutralnih i kiselih mucina u peharastim ćelijama kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Tip mucina	Deo kripe	
		Gornji	Donji
K	NM/AM	1.08	0.11
25 mg/kg AA	NM/AM	0.57	0.02
50 mg/kg AA	NM/AM	0.39	0.05

NM: neutralni mucini, AM: kiseli mucini



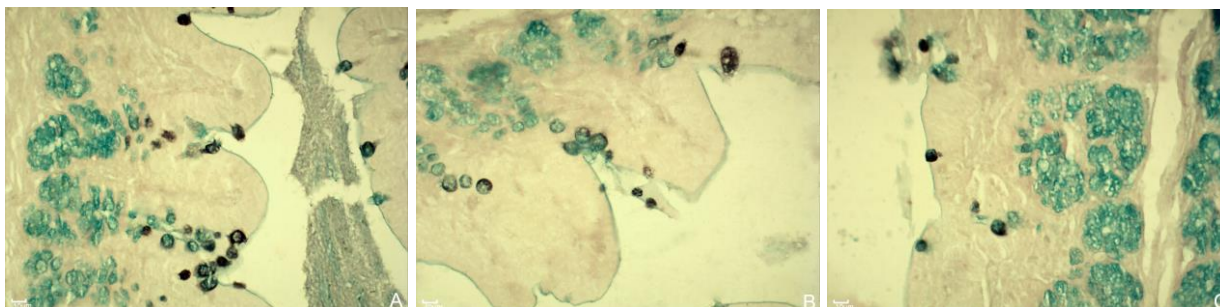
Grafikon 11. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharastih ćelija sa kiselim i neutralnim mucinima u gornjem delu kripte kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. # $p < 0.01$



Grafikon 12. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharastih ćelija sa kiselim i neutralnim mucinima u donjem delu kripte kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. # $p < 0.01$

4.1.2.2. HID-AB

Histološka analiza preseka kolona bojenih HID-AB metodom pokazala je potpuno odsustvo sulfomucina u donjem delu kripte (Sl. 11). Kod kontrolnih životinja (Sl. 11 A) zapaža se prisustvo peharastih ćelija sa sulfo- i sijalomucinima, dok je kod pacova tretiranih AA (Sl. 11 B, C) vidljivo smanjenje ukupnih peharastih ćelija u gornjem delu kripte.



Slika 11. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). U donjem delu kripte uočava se odsustvo sulfomucina (crne ćelije) kod sve tri eksperimentalne grupe (A-C). U gornjem delu kripte primetno je smanjenje i sulfo- i sijalomucina (plave ćelije) kod (B, C) nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. HID-AB. Bar 10 μ m.

Semikvantitativna analiza mucina bojenih HID-AB metodom pokazala je pad u distribuciji i sijalo- i sulfomucina u obe tretirane grupe pacova u odnosu na kontrolu (Tab. 6). U gornjem delu kripte, kod obe tretirane grupe, zapaženo je statistički signifikantno smanjenje sulfomucina ($p < 0.05$) (Graf. 13), sijalomucina kod niže ($p < 0.05$) i kod više doze AA ($p < 0.01$) (Graf. 14), kao i ukupnih mucina ($p < 0.01$) (Graf. 15). U donjem delu kripte kod niže doze AA se zapaža pad u zastupljenosti sijalomucina (Graf. 14), kao i ukupnih mucina (Graf. 13), dok sulfomucini u ovom delu kripte uopšte nema (Sl. 11, Tab. 6).

Tabela 6. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za mucine u peharastim ćelijama kolona bojene HID-AB pH 2.5 metodom nakon subhroničnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Deo kripte	Ukupni mucini	Sijalomucini	Sulfomucini
K	Gornji	4.60 \pm 0.22	2.60 \pm 0.22	2.00 \pm 0.35
	Donji	4.10 \pm 0.22	4.10 \pm 0.22	0.00 \pm 0.00
25 mg/kg A	Gornji	3.60 \pm 0.55 ^b	2.20 \pm 0.27 ^a	1.40 \pm 0.42 ^a
	Donji	3.80 \pm 0.27	3.80 \pm 0.27	0.00 \pm 0.00
50 mg/kg A	Gornji	3.40 \pm 0.65 ^b	2.10 \pm 0.22 ^b	1.30 \pm 0.45 ^a
	Donji	4.00 \pm 0.35	4.00 \pm 0.35	0.00 \pm 0.00

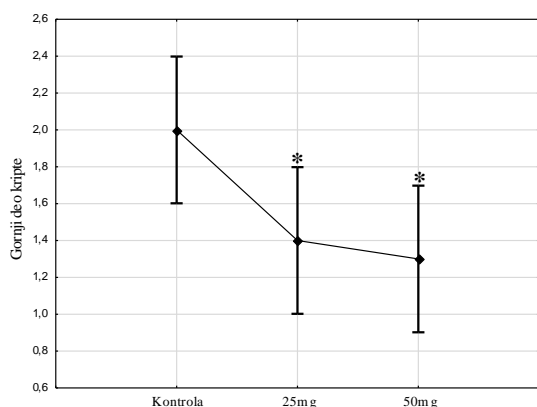
^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$

Rezultati ispitivanja odnosa sulfo- i sijalomucina (Tab. 7, Graf. 13, Graf. 14) pokazali su dozno zavisno smanjenje u gornjem delu kripe kod AA tretiranih pacova. Odnos sulfo- i sijalomucina za donji deo kripe nije iskazan jer sulfomucina nije bilo u ovom regionu kolona.

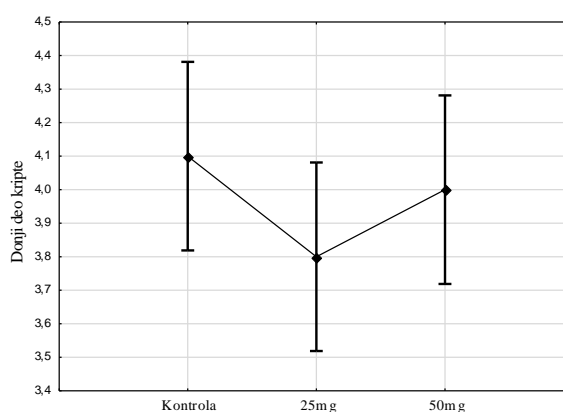
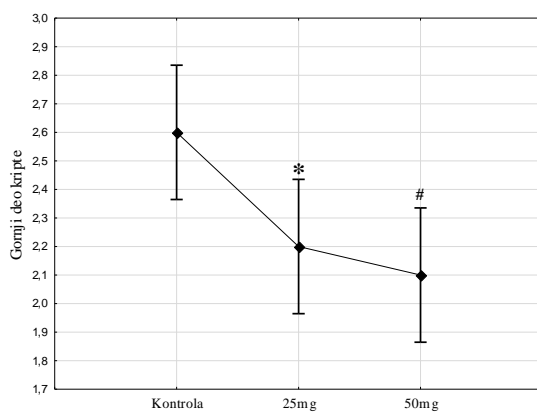
Tabela 7. Odnos sulfo i sijalo mucina u peharastim ćelijama kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Tip mucina	Deo kripe	
		Gornji	Donji
K	SuM/SiM	1.30	/
25 mg/kg AA	SuM/SiM	1.57	/
50 mg/kg AA	SuM/SiM	1.62	/

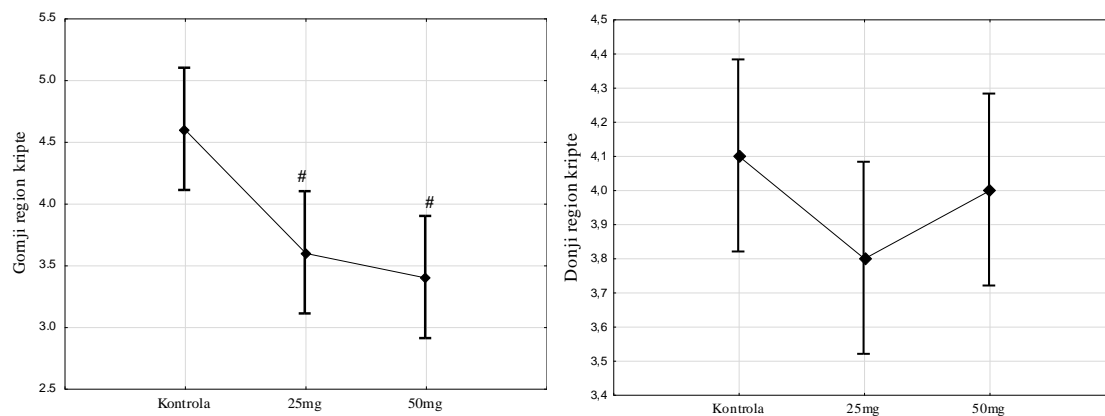
SuM: sulfomucini, SiM: sijalomucini



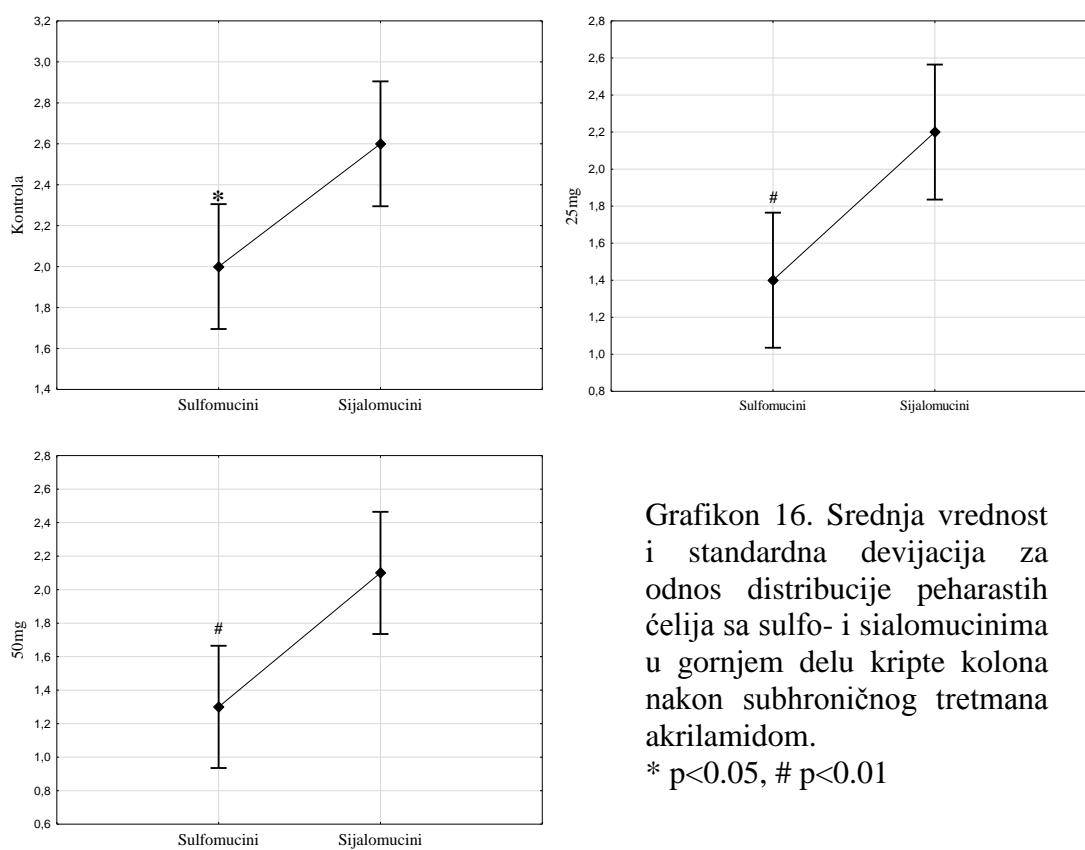
Grafikon 13. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa sulfomucinima u gornjem delu kripe kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. * $p < 0.05$



Grafikon 14. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa sijalomucinima u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$

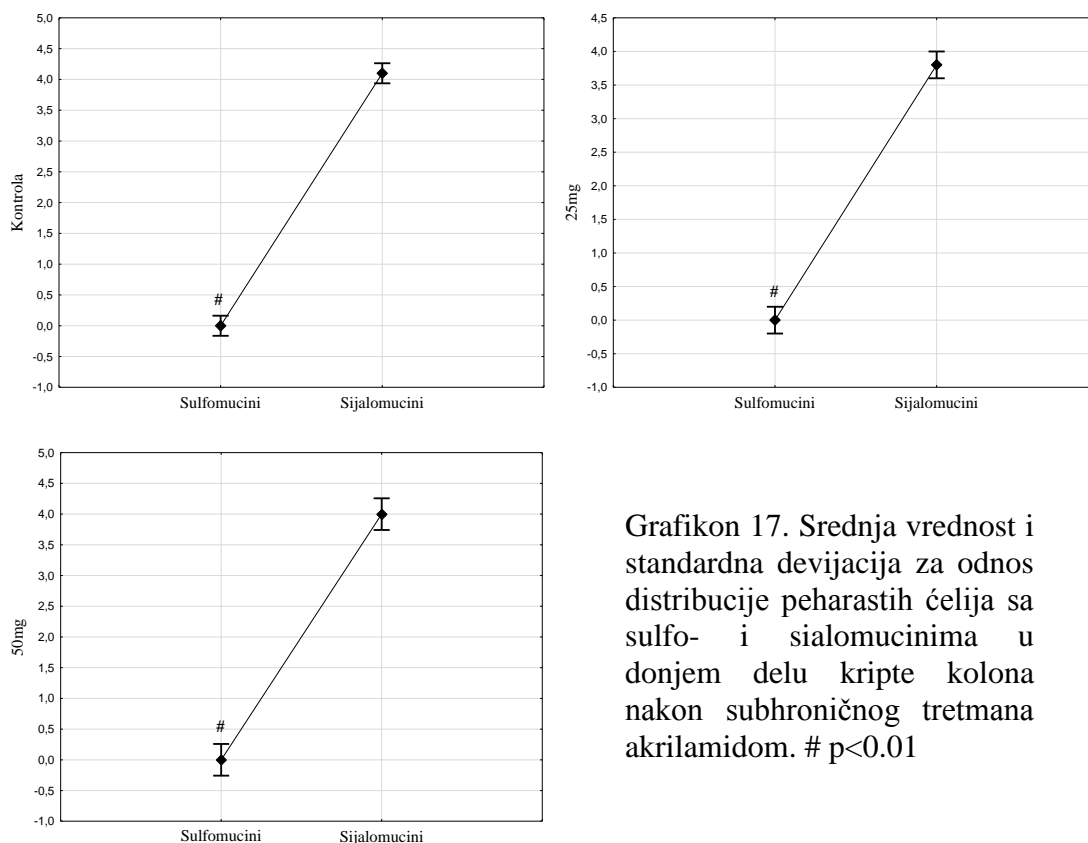


Grafikon 15. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju svih peharastih ćelija u gornjem i donjem delu kripte kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. # $p < 0.01$



Grafikon 16. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharastih ćelija sa sulfo- i sialomucinima u gornjem delu kripte kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom.

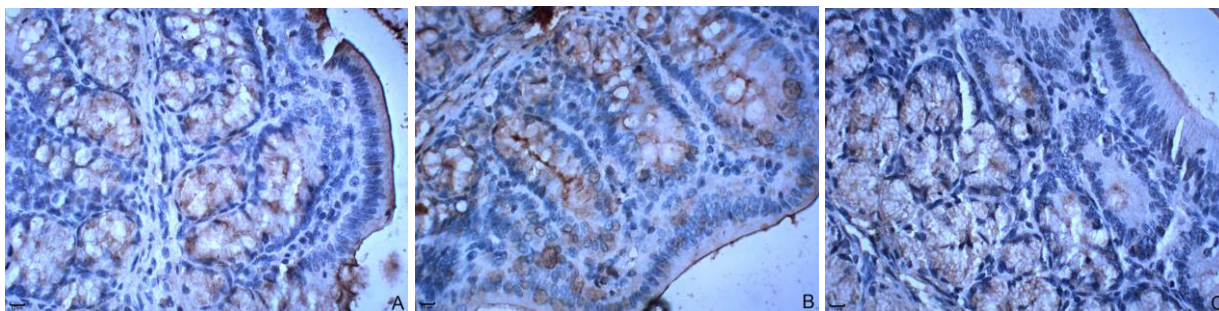
* $p < 0.05$, # $p < 0.01$



Grafikon 17. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharastih ćelija sa sulfo- i sialomucinima u donjem delu kriptе kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. # $p < 0.01$

4.1.2.3. MUC2

Histološka analiza MUC2 pozitivnih peharastih ćelija pokazala je da subhronični tretman AA dovodi do smanjenja u količini MUC2 mucina u kolonu pacova (Sl. 12). Zapaženo smanjenje u količini MUC2 mucina manifestuje se smanjenim intenzitetom obojenosti peharastih ćelija kod tretiranih životinja (Sl. 12 B,C) u odnosu na kontrolne jedinice (Sl. 12 A) što je izraženo u gornjem delu kriptе. Na površini intestinalnog epitela zapaža se deo sloj mukusa kod kontrolnih životinja, ali njegova debljina opada sa povećanjem doze AA (Sl. 12 A-C). Primećeni sloj mukusa na površini epitela je kod više doze isprekidan (Sl. 12 C) i na nekim mestima je potpuno odsutan.



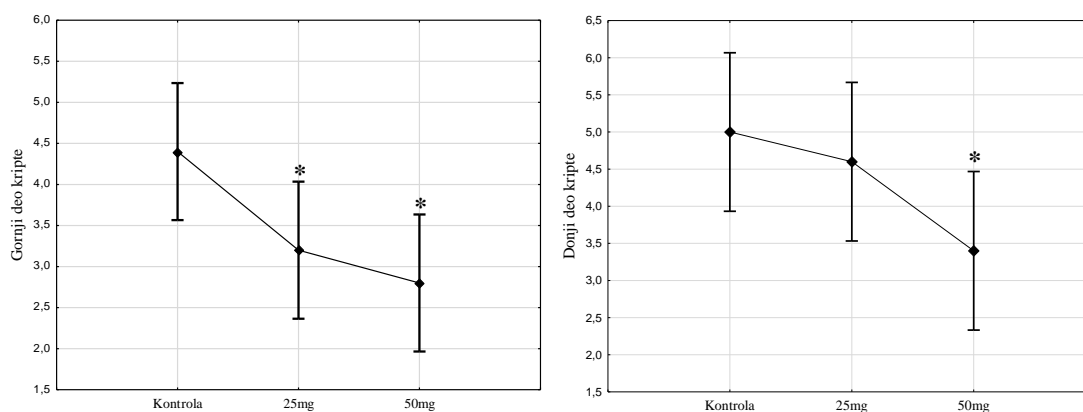
Slika 12. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). Intenzitet obojenosti peharastih ćelija u gornjem delu kripe opada pod uticajem subhroničnog tretmana akrilamidom (B, C). Površina epitela je oivičena slojem mukusa (A-C) koji je najdeblji kod (A). Anti-MUC2. Bar 10 μ m.

Rezultati semikvantitativne analize MUC2 pozitivnih peharastih ćelija prikazani su u tabeli 8 i na grafikonu 18. Evidentna je linearna redukcija MUC2 pozitivnih peharastih ćelija u odnosu na doze AA u oba dela kripe. U gornjem delu kripe, u oba tretmana, zapaženo je statistički značajno smanjenje ($p < 0.05$) MUC2 mucina, dok je u donjem delu kripe statistički značajno smanjenje ($p < 0.05$) MUC2 pozitivnih peharastih ćelija bilo prisutno samo kod više doze AA.

Tabela 8. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za MUC2 pozitivne peharaste ćelije u kolonu nakon subhroničnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Deo kripe	MUC2
K	Gornji	4.40 \pm 0.55
	Donji	5.00 \pm 0.00
25 mg/kg AA	Gornji	3.20 \pm 0.45 *
	Donji	4.60 \pm 0.55
50 mg/kg AA	Gornji	2.80 \pm 1.30 *
	Donji	3.40 \pm 1.82 *

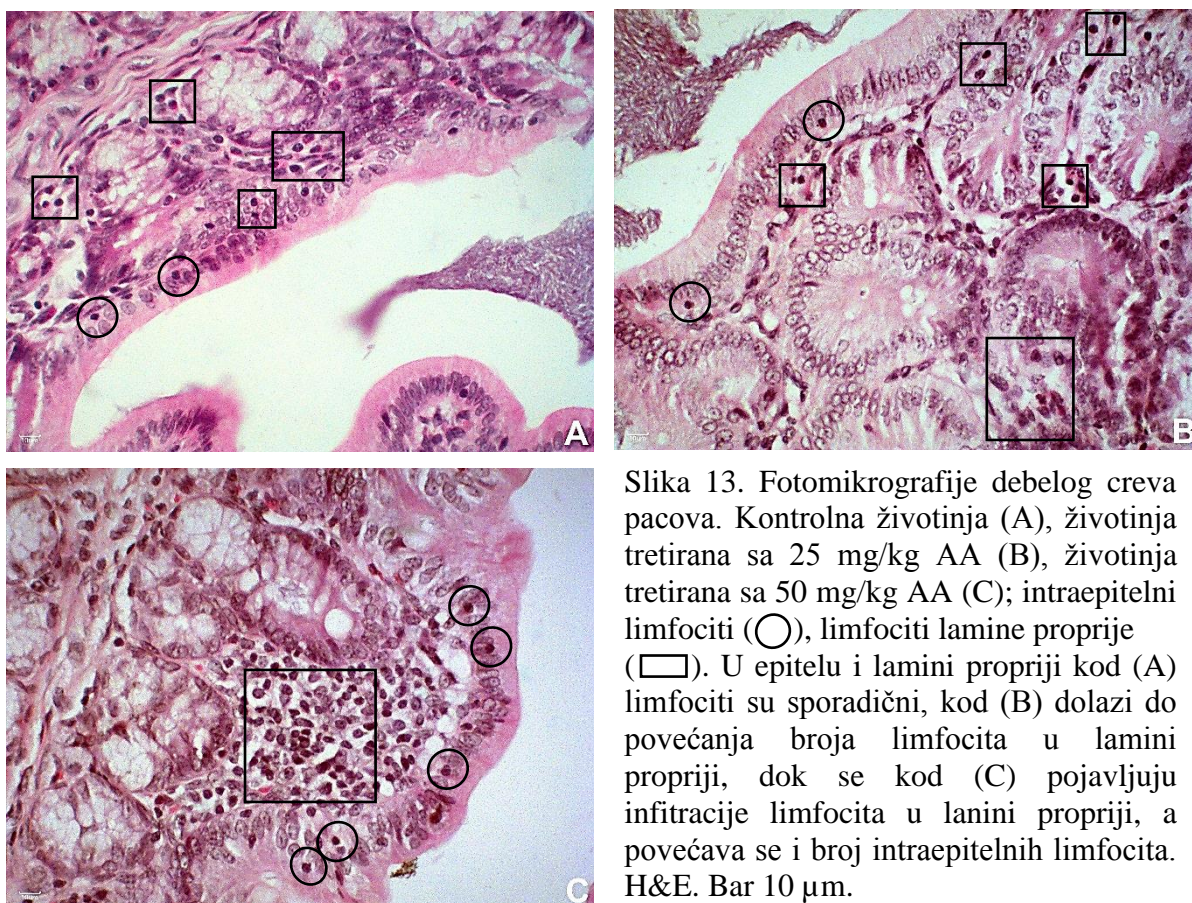
* $p < 0.05$



Grafikon 18. Srednja vrednost i standardna devijacija za MUC2 pozitivne peharaste ćelije u donjem i gornjem delu kripe kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. * $p < 0.05$

4.1.1. Limfociti

Histološka i semikvantitativna analiza broja limfocita u mukozi debelog creva (Sl. 13, Tab. 9) pokazale su promene u broju limfocita uzrokovane aplikacijom AA. Kod kontrolnih životinja intraepitelni limfociti su pojedinačni i sporadično se sreću u lamini epitelijalis, dok su limfociti u lamini propriji takođe pojedinačni ali srednje brojni. U grupi pacova tretiranih nižom dozom AA nije bilo promena u broju intraepitelnih limfocita, ali se povećao broj limfocita u lamini propriji kolona. AA u dozi od 50 mg/kg doveo je do povećanja broja limfocita u oba posmatrana regiona mukoze kolona. Kod nekih životinja iz ove grupe bili su primetni veći infiltrati limfocita i drugih imunih ćelija u lamini propriji. Viša doza AA je dovela i do povećanja broja intraepitelnih limfocita (Sl. 13 C).



Slika 13. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C); intraepitelni limfociti (○), limfociti lamine proprije (□). U epitelu i lamini propriji kod (A) limfociti su sporadični, kod (B) dolazi do povećanja broja limfocita u lamini propriji, dok se kod (C) pojavljuju infiltracije limfocita u lamini propriji, a povećava se i broj intraepitelnih limfocita. H&E. Bar 10 μ m.

Tabela. 9. Semikvantitativna analiza zastupljenosti limfocita u mukozi kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom

Životinja	a	b	c	d	e
Kontrola					
L. epithelialis	2	1	2	1	1
L. propria	2	1	2	1/2	1/2
25 mg/kg					
L. epithelialis	2	1	1	1	1
L. propria	2/3	1	2/3	2	1
50 mg/kg					
L. epithelialis	2	2	1	1	2
L. propria	2	3	3	2	2

4.1.4. Eozinofili

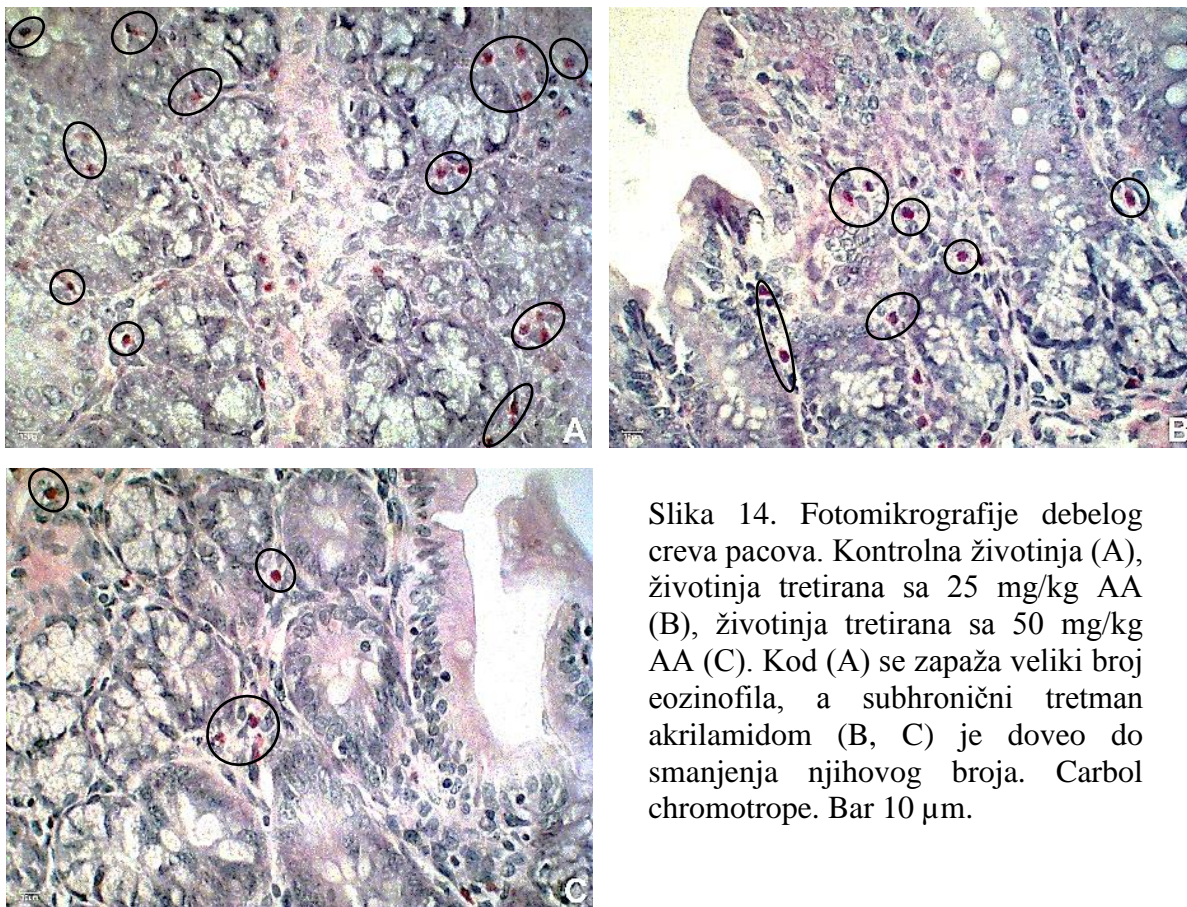
Histološkom analizom uzoraka kolona utvrđeno je da je subhronični tretman AA doveo do smanjenja broja eozinofila u lamini proprijii kolona (Sl. 14). Smanjenje broja eozinofila je bilo izraženije kod više doze AA (Sl. 14 C).

Statistička analiza broja eozinofila po vidnom polju je pokazala pad u broju eozinofila kod pacova tretiranih sa obe doze AA (Tab. 10, Graf. 19), ali ovo smanjenje je bilo statistički značajno samo kod tretmana višom dozom AA ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolne životinje.

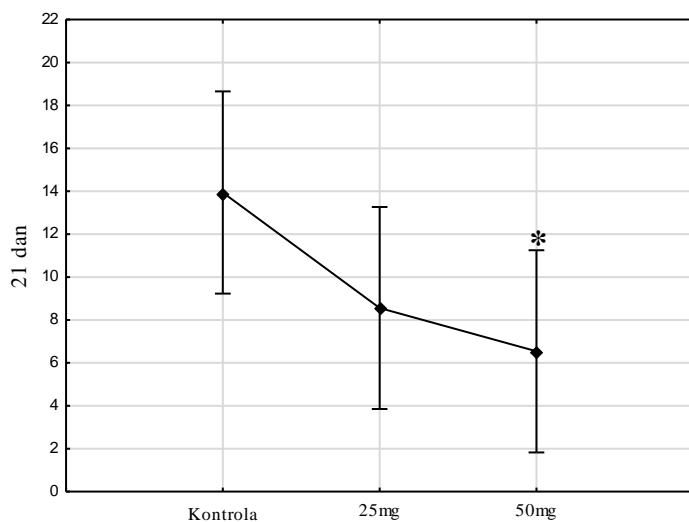
Tabela 10. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za broj eozinofila u lamini proprijii kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Eozinofili
K	13.94 ± 5.80
25 mg/kg AA	8.56 ± 5.30
50 mg/kg AA	6.54 ± 2.90*

* $p < 0.05$



Slika 14. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). Kod (A) se zapaža veliki broj eozinofila, a subhronični tretman akrilamidom (B, C) je doveo do smanjenja njihovog broja. Carbol chromotrope. Bar 10 µm.



Grafikon 19. Srednja vrednost i standardna devijacija za broj eozinofila u lamini propriji kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom. * $p < 0.05$

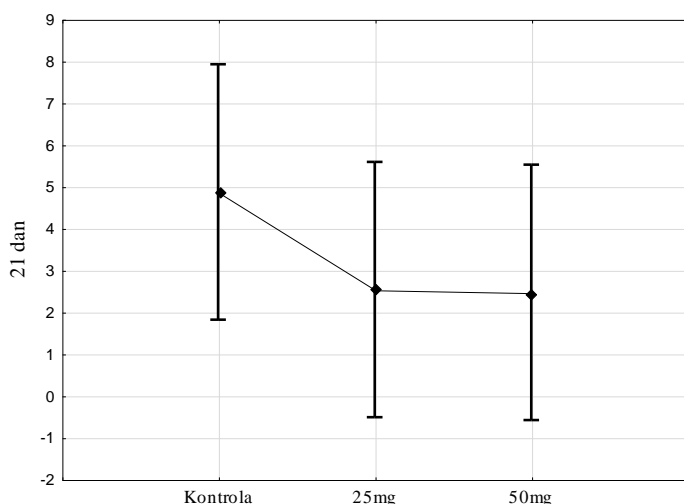
4.1.3. Mastociti

4.1.3.1. TB pozitivni mastociti

Na osnovu statističke analize rezultata možemo zaključiti da subhronični tretman AA nije uzrokovao signifikantne razlike u broju TB pozitivnih mastocita u submukozi kolona između kontrole i grupa tretiranih AA (Tab. 11, Graf. 20). Dobijeni numerički podaci ukazuju na pad u broju mastocita kod kontrolnih životinja u odnosu na AA tretirane jedinice, dok je kod AA tretiranih životinja broj TB pozitivnih mastocita približno isti.

Tabela 11. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za TB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Mastociti
K	4.87 ± 4.38
25 mg/kg AA	2.53 ± 2.16
50 mg/kg AA	2.47 ± 2.36



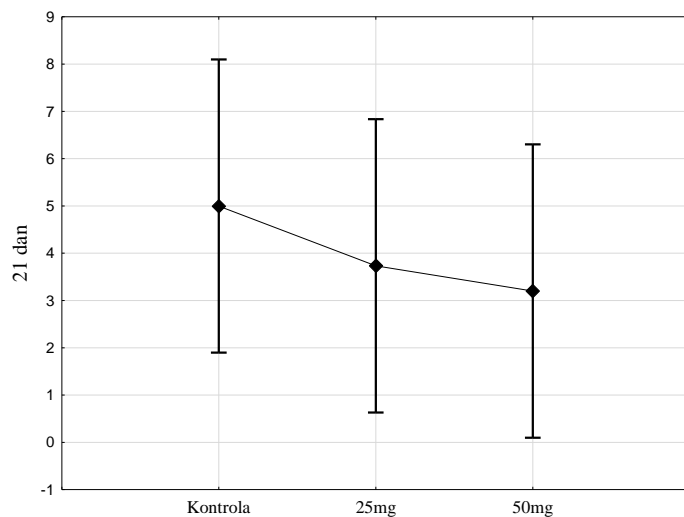
Grafikon 20. Srednja vrednost i standardna devijacija za TB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom.

4.1.3.2. HID-AB pozitivni mastociti

Statistička analiza numeričkih vrednosti ukupnog broja HID-AB pozitivnih mastocita pokazala je da nema statistički značajnih razlika između kontrole i AA tretiranih životinja, ali se zapaža trend linearnog opadanja broja mastocita u odnosu na povećanje doze AA (Tab. 12, Graf. 21).

Tabela 12. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za HID-AB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Mastociti
K	5.00 ± 4.33
25 mg/kg AA	3.73 ± 0.72
50 mg/kg AA	3.20 ± 3.05



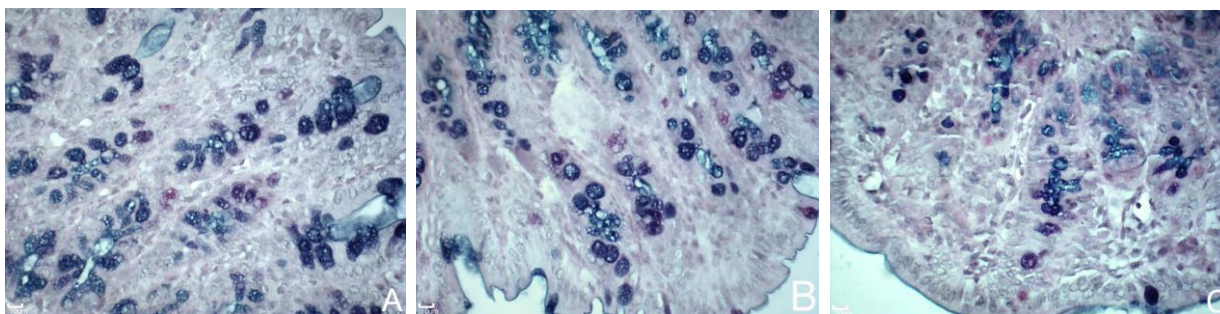
Grafikon 21. Srednja vrednost i standardna devijacija za HID-AB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon subhroničnog tretmana akrilamidom.

4.2. REZULTATI 24 h AKUTNOG IZLAGANJA AKRILAMIDU

4.2.1. Peharaste ćelije i sadržaj mucina

4.2.1.1. PAS-AB

Histološka analiza je pokazala pad u broju peharastih ćelija u gornjem delu kripte kod više doze AA u odnosu na kontrolu (Sl. 15). Navedeni nalaz potvrdile su semikvantitativna i statistička analiza uzoraka kolona koje su pokazale statistički signifikantan pad u ukupnom broju peharastih ćelija ($p < 0.05$) u gornjem delu kripte, kod više doze AA (Tab. 13, Graf. 25). Kod više doze AA zabeleženo je i statistički značajno smanjenje zastupljenosti peharastih ćelija sa kiselim mucinima ($p < 0.01$) u gornjem delu kripte (Tab. 13, Graf. 22). U donjem delu kripte, kod niže doze AA, zabeleženo je povećanje kiselih mucina u odnosu na kontrolu kao i statistički značajno smanjenje kiselih mucina ($p < 0.05$) kod više doze AA u odnosu na nižu dozu AA. Neutralni mucini su pokazali trend smanjenja u gornjem delu kripte i trend povećanja u donjem delu kripte u odnosu na kontrolu (Tab. 13, Graf. 23). Analizom peharastih ćelija sa miksom kiselih i neutralnih mucina dolazimo do zaključka da je kod niže doze AA došlo do povećanja u zastupljenosti navedenih ćelija u odnosu na kontrolu, dok je kod više doze AA u gornjem delu kripte došlo do pada u odnosu na kontrolu (Tab. 13, Graf. 24), ali navedene promene nisu bile statistički značajne.

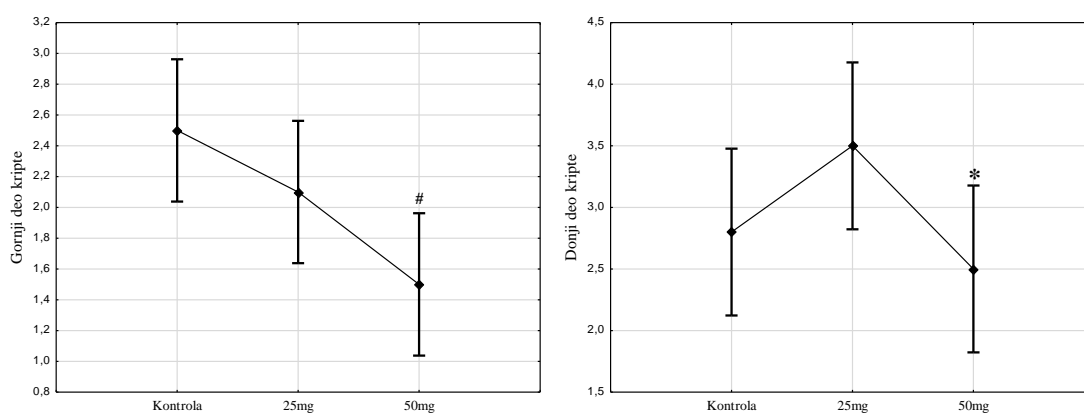


Slika 15. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). Vidi se distribucija kiselih (plave ćelije), neutralnih (pink ćelije) i miks mucina (ljubičaste ćelije) u peharastim ćelijama kolona u donjem i gornjem delu kripte, kao i pad u ukupnom broju peharastih ćelija kod (B, C) u gornjem delu kripte nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom. PAS-AB. Bar 10 μ m.

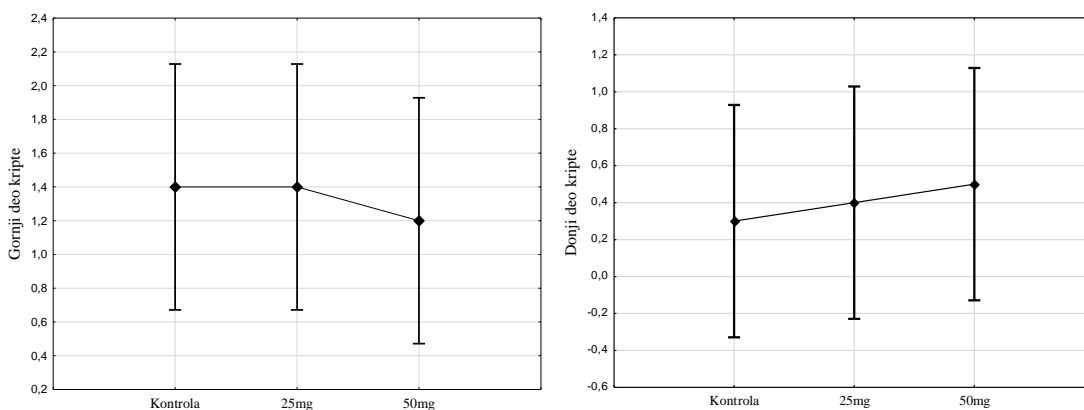
Tabela 13. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za mucine u peharastim ćelijama kolona bojene PAS-AB pH 2.5 metodom nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Deo kripe	Ukupni mucini	Neutralni mucini	Kiseli mucini	Mix neutralnih i kiselih mucina
K	Gornji	6.40 ± 0.82	1.40 ± 0.55	2.50 ± 0.50	2.50 ± 0.61
	Donji	3.50 ± 1.84	0.30 ± 0.67	2.80 ± 0.76	0.40 ± 0.89
25 mg/kg AA	Gornji	6.20 ± 1.60	1.40 ± 0.96	2.10 ± 0.55	2.70 ± 0.45
	Donji	4.60 ± 1.29	0.40 ± 0.55	3.50 ± 0.35	0.70 ± 0.67
50 mg/kg AA	Gornji	4.50 ± 1.41 ^a	1.20 ± 0.67	1.50 ± 0.35 ^c	1.80 ± 0.91
	Donji	3.70 ± 1.52	0.50 ± 0.71	2.50 ± 0.87 ^b	0.70 ± 0.45

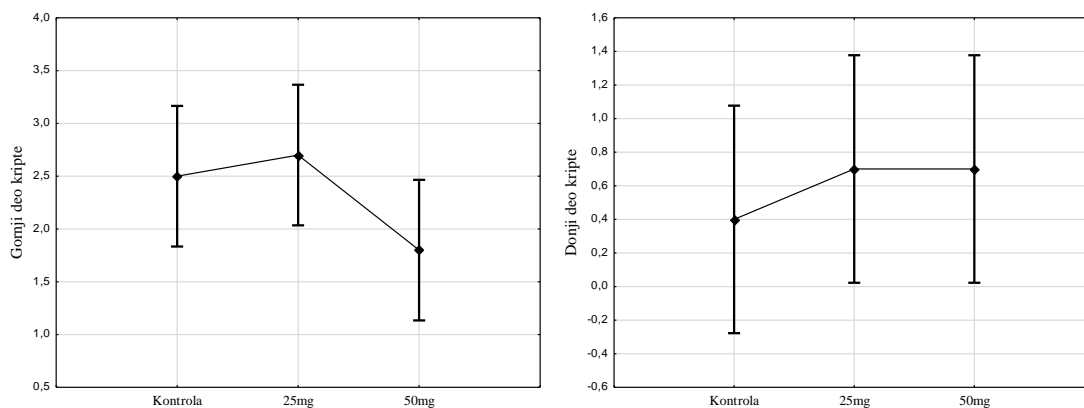
^a p<0.05 u odnosu na kontrolu, ^b p<0.05 u odnosu na 25 mg/kg AA, ^c p<0.01 u odnosu na kontrolu



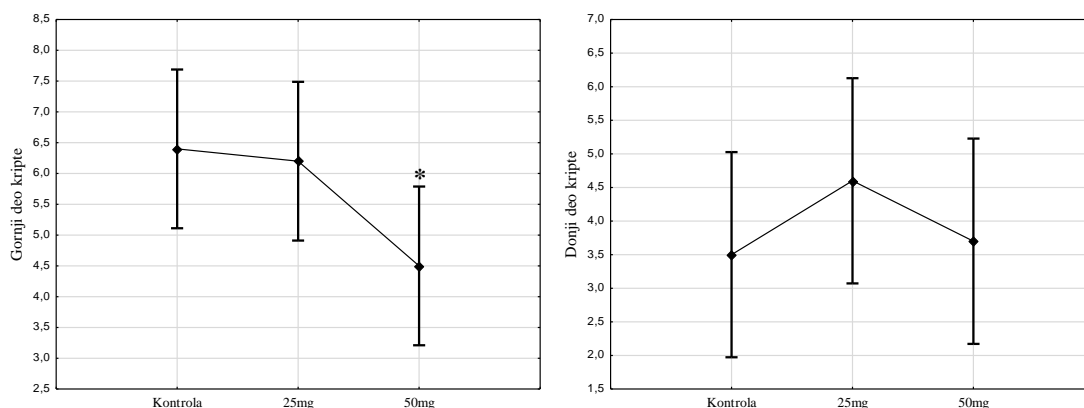
Grafikon 22. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa kiselim mucinima u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom. * p<0.05, # p<0.01



Grafikon 23. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa neutralnim mucinima u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom.



Grafikon 24. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa miksom kiselih i neutralnih mucina u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom.



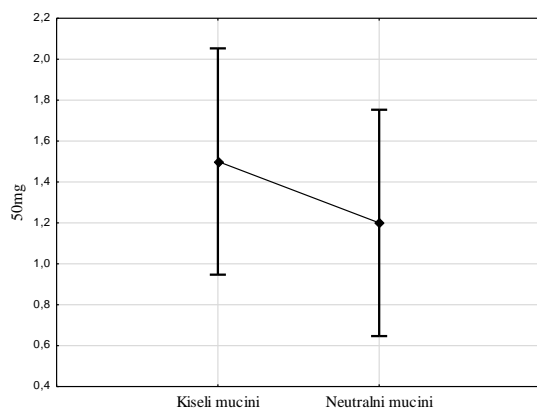
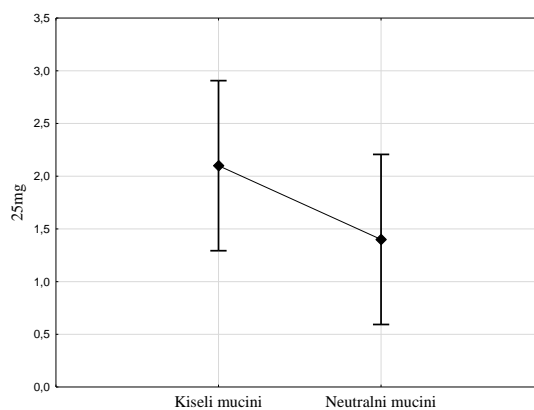
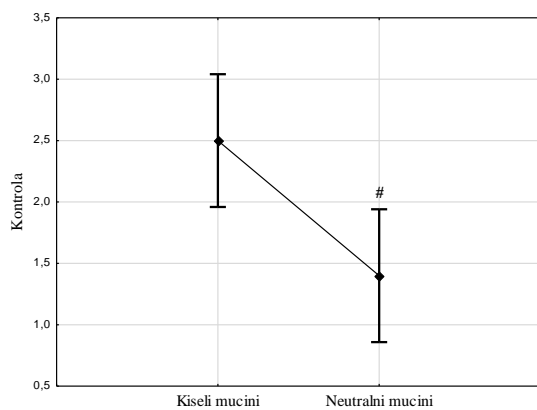
Grafikon 25. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju svih peharastih ćelija u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom. * $p < 0.05$

Na osnovu rezultata dobijenih izračunavanjem odnosa između neutralnih i kiselih mucina (Tab. 14) možemo primetiti da je u gornjem delu kripe (Graf. 26) došlo do linearnog povećanja ovog odnosa u odnosu na doze AA, dok je u donjem delu kripe (Graf. 27) kod niže doze AA došlo do pada u odnosu između neutralnih i kiselih mucina.

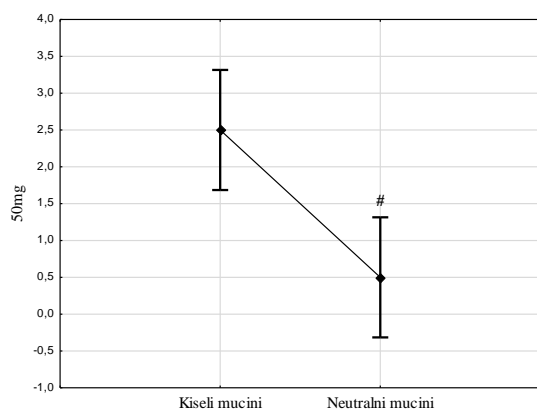
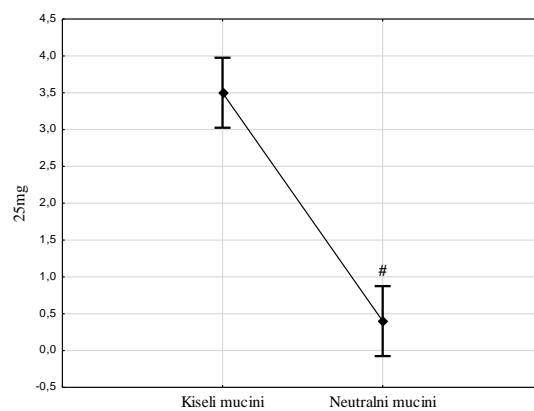
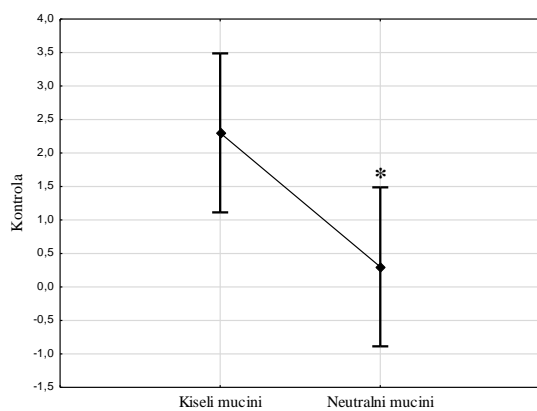
Tabela 14. Odnos neutralnih i kiselih mucina u peharastim ćelijama kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Tip mucina	Deo kripe	
		Gornji	Donji
K	NM/AM	0.56	0.11
25 mg/kg AA	NM/AM	0.67	0.11
50 mg/kg AA	NM/AM	0.80	0.2

NM: neutralni mucini, AM: kiseli mucini



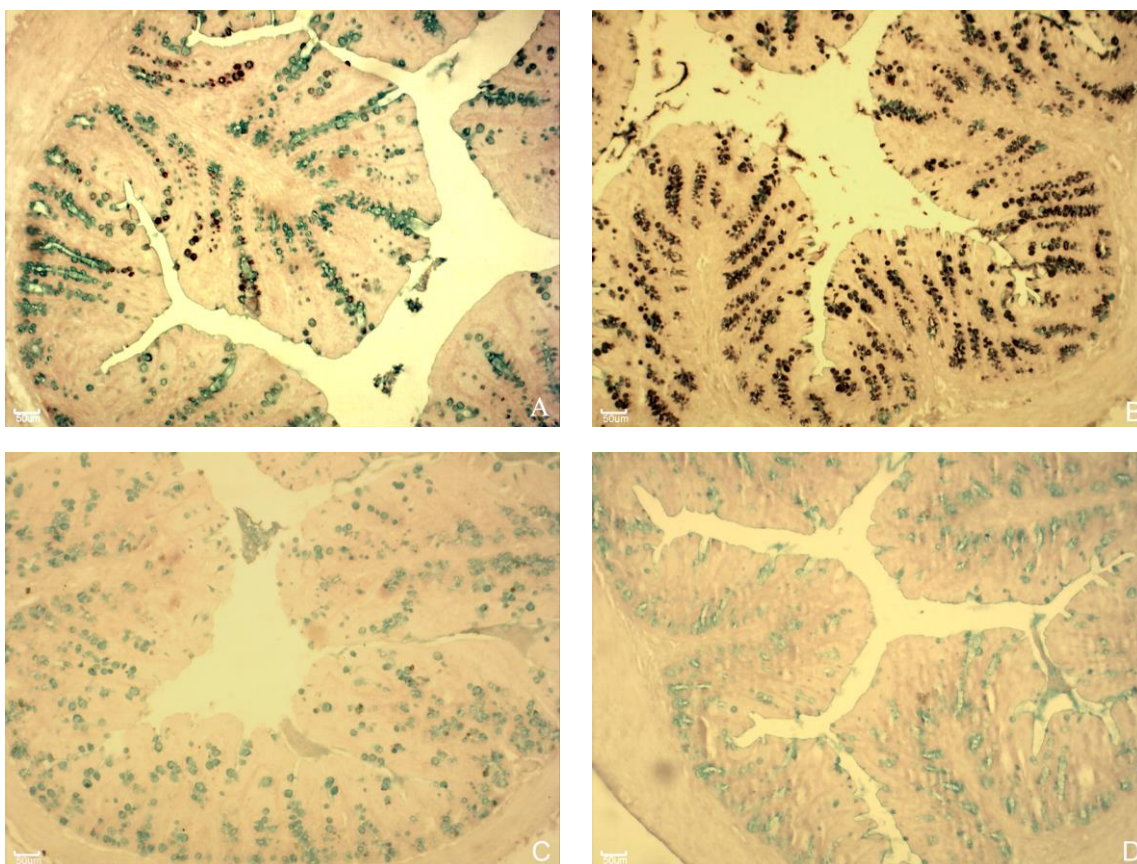
Grafikon 26. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharstih ćelija sa kiselim i neutralnim mucinima u gornjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom. # $p < 0.01$



Grafikon 27. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharstih ćelija sa kiselim i neutralnim mucinima u donjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$

4.2.1.2.HID-AB

Histološka analiza preseka kolona bojenih HID-AB metodom pokazala je veliku varijabilnost u zastupljenosti sulfo- i sijalomucina kod niže doze AA (Sl. 16). Kod nekih životinja su dominirali sulfomucini sa ponekom peharastom ćelijom sa sijalomucinima (Sl. 16 B), dok su kod drugih jedinki, iz iste ekperimentalne grupe, dominantno bile zastupljene peharaste ćelije sa sijalomucinimima (Sl. 16 C). U grupi životinja tretiranih višom dozom AA vidljivo je smanjenje broja peharastih ćelija u gornjem delu kripte (Sl. 16 D).



Slika 16. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). Kod (B) se zapaža dominacija sulfomucina (crne ćelije), a kod (C) dominacija sijalomucina (plave ćelije). Kod (D) se uočava mali broj peharastih ćelija u gornjem delu kripte nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom. HID-AB. Bar 50 μ m.

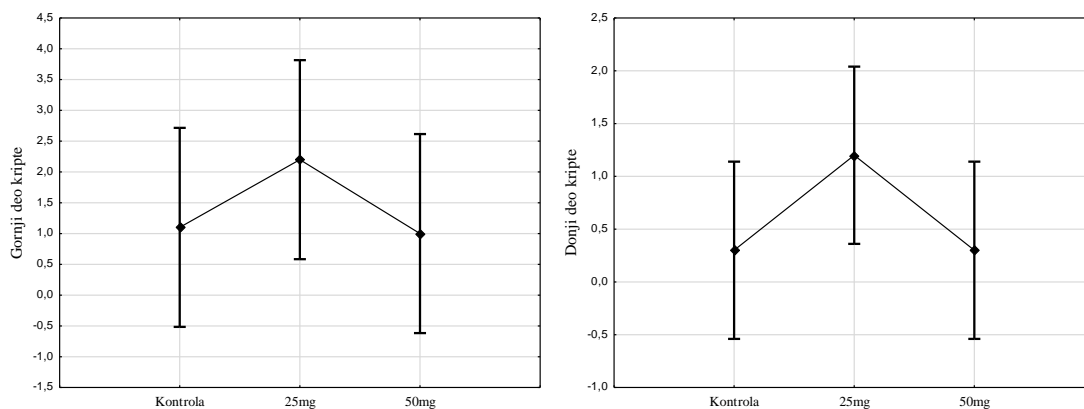
Statistička analiza numeričkih vrednosti pokazala je trend povećanja kod niže doze AA kao i trend smanjenja kod više doze AA za sve ispitivane tipove mucina (Tab. 15) sa izuzetkom sijalomucina u gornjem delu kripte kod niže doze. U gornjem delu kripte, kod više doze AA evidentirano je statistički signifikantno smanjenje sijalomucina ($p < 0.01$) u odnosu na kontrolu (Graf. 29). Ukupna zastupljenost peharastih ćelija kod više doze AA bila je statistički

signifikantno smanjena ($p < 0.05$) u odnosu na nižu dozu AA (Graf. 30). Zapaženo povećanje zastupljenosti sulfomucina kod niže doze AA nije bilo statistički značajno (Graf. 28).

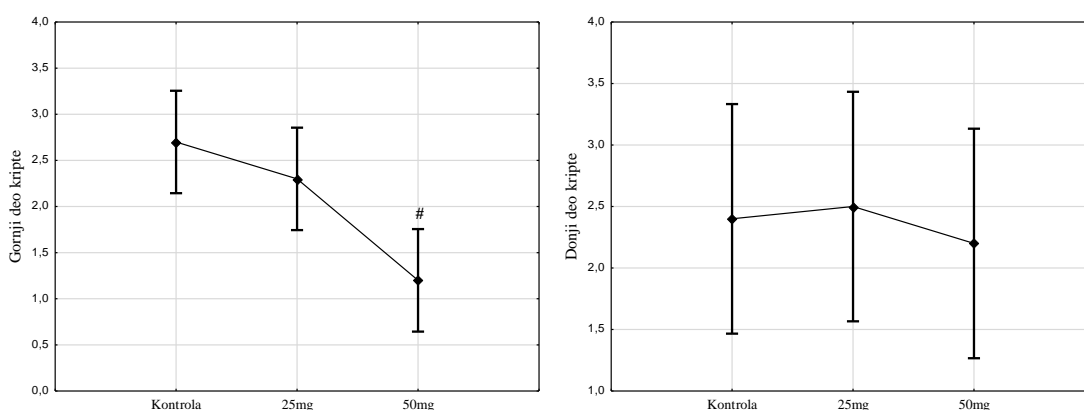
Tabela 15. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za mucine u peharastim ćelijama kolona bojene HID-AB pH 2.5 metodom nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Deo kripe	Ukupni mucini	Sijalomucini	Sulfomucini
K	Gornji	3.80 ± 1.83	2.70 ± 0.45	1.10 ± 1.60
	Donji	2.70 ± 0.84	2.40 ± 0.42	0.30 ± 0.67
25 mg/kg A	Gornji	4.50 ± 1.83	2.30 ± 0.45	2.20 ± 2.08
	Donji	3.70 ± 1.04	2.50 ± 0.87	1.20 ± 1.15
50 mg/kg A	Gornji	2.20 ± 1.83^a	$1.20 \pm 0.76^{b,a}$	1.00 ± 1.17
	Donji	2.50 ± 0.79	2.20 ± 1.35	0.30 ± 0.67

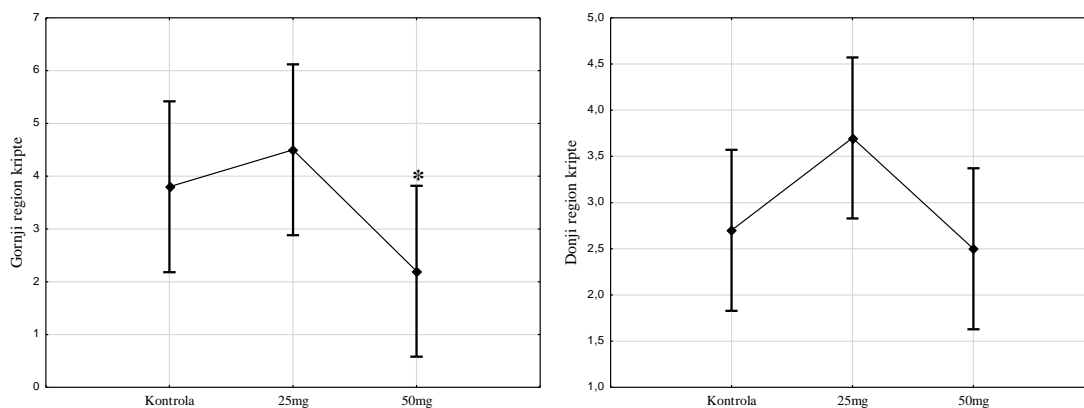
^a $p < 0.05$ u odnosu na 25 mg/kg AA, ^b $p < 0.01$ u odnosu na kontrolu



Grafikon 28. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa sulfomucinima u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom.

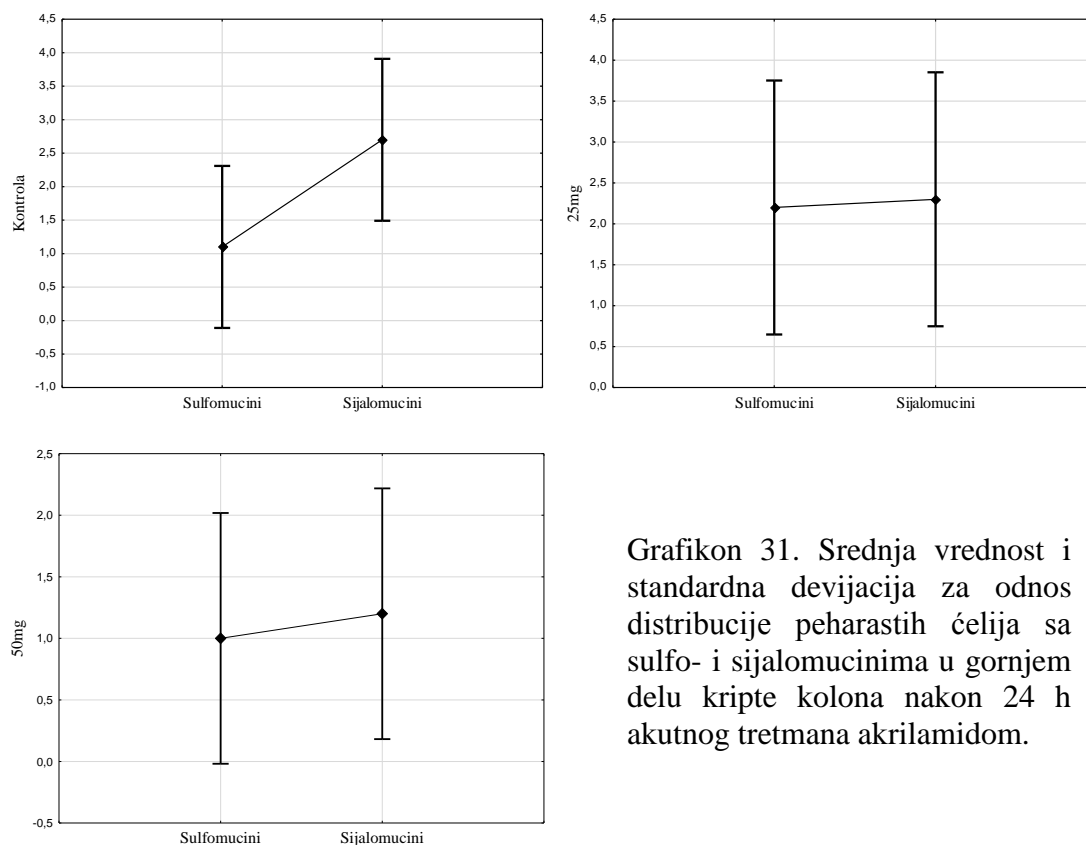


Grafikon 29. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa sijalomucinima u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom. # $p < 0.01$

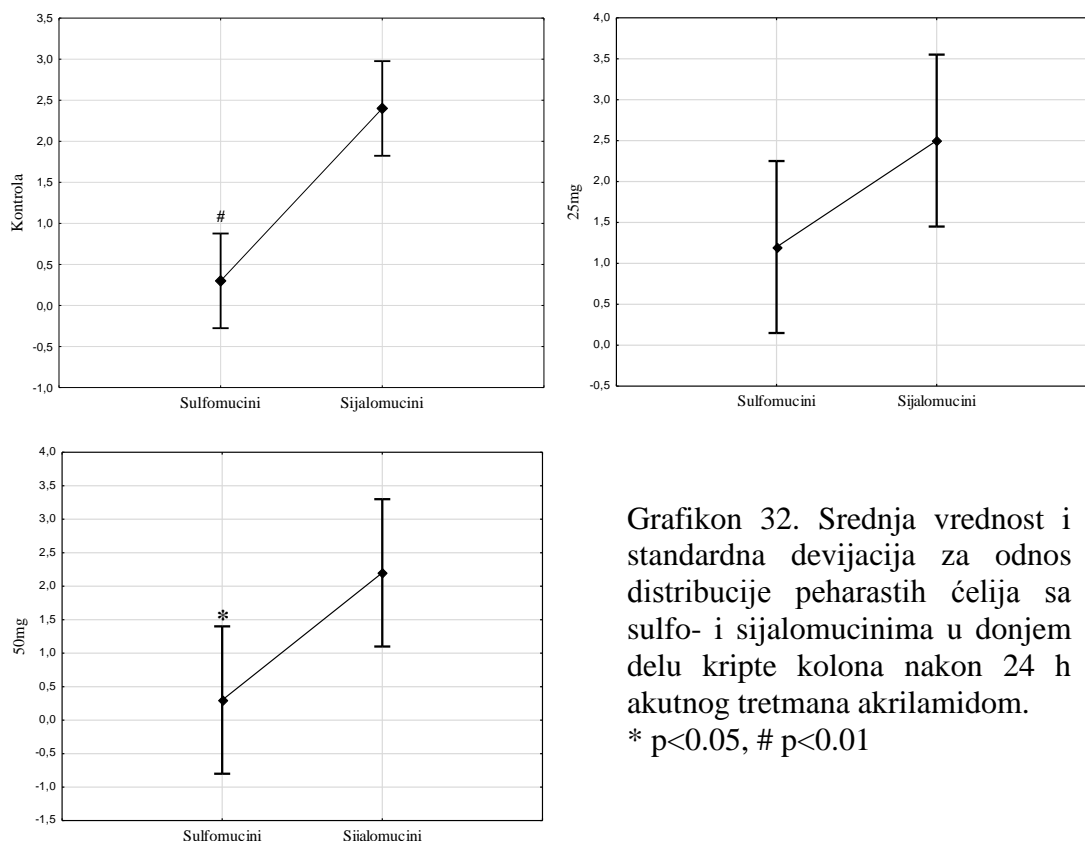


Grafikon 30. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju ukupnih peharastih ćelija u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom. * $p < 0.05$

Rezultati odnosa sulfo- i sijalomucina pokazali su da je ispitivani odnos u obe tretirane grupe i u oba dela kripe bio povećan u odnosu na kontrolu (Tab. 16). Kod niže doze AA, u gornjem delu kripe (Graf. 31), povećanje je bilo veće nego kod više doze AA, dok je u donjem delu kripe (Graf. 32) povećanje bilo linearno u odnosu na doze AA.



Grafikon 31. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharastih ćelija sa sulfo- i sijalomucinima u gornjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom.



Grafikon 32. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharastih ćelija sa sulfo- i sijalomucinima u donjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom.
* $p < 0.05$, # $p < 0.01$

Tabela 16. Odnos sulfo i sjialo mucina u peharastim ćelijama kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom

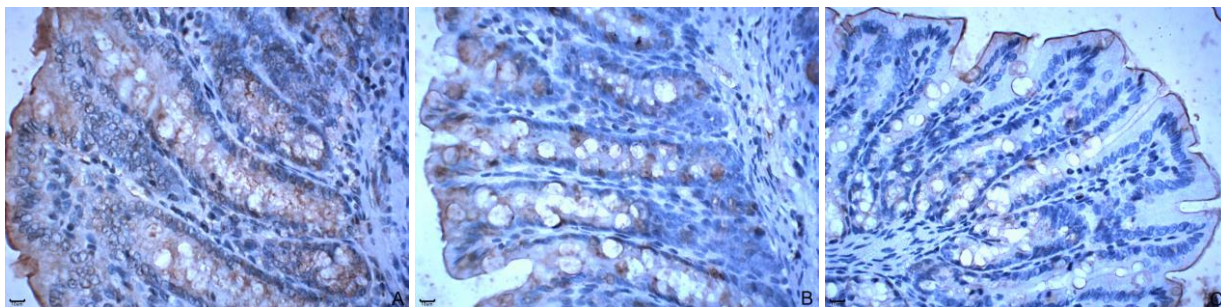
Eksp. grupa	Tip mucina	Deo kripe	
		Gornji	Donji
K	SuM/SiM	0.41	0.13
25 mg/kg AA	SuM/SiM	0.96	0.48
50 mg/kg AA	SuM/SiM	0.83	0.14

SuM: sulfomucini, SiM: sijalomucini

4.2.1.3. MUC2

Histološka analiza MUC2 pozitivnih peharastih ćelija epitela kolona pokazala je smanjenje u intenzitetu obojenosti pa tako i u prisutnosti MUC2 mucina u peharastim ćelijama pod uticajem AA (Sl. 17). Peharaste ćelije su kod kontrolnih životinja intenzivno obojene (Sl. 17 A), dok su kod tretiranih životinja slabije (Sl. 17 B) ili jedva vidljivo obojene (Sl. 17 C). Kod kontrolnih pacova na površini epitela se uočava debeo sloj mukusnog materijala (Sl. 17 A), a kod više doze AA taj sloj je predstavljen u vidu tanke linije na površini epitela (Sl. 17 C). Histološki nalaz potvrdila je statistička analiza koja je pokazala linearno smanjenje u količini MUC2 mucina u odnosu na doze AA (Tab. 17, Graf. 33). Navedeno smanjenje je bilo statistički signifikantno ($p < 0.01$) kod više doze AA, u oba dela kripe, u odnosu na kontrolu.

Takođe je zabeleženo statistički značajno smanjenje u količini MUC2 mucina ($p < 0.05$) kod više u odnosu na nižu dozu AA.

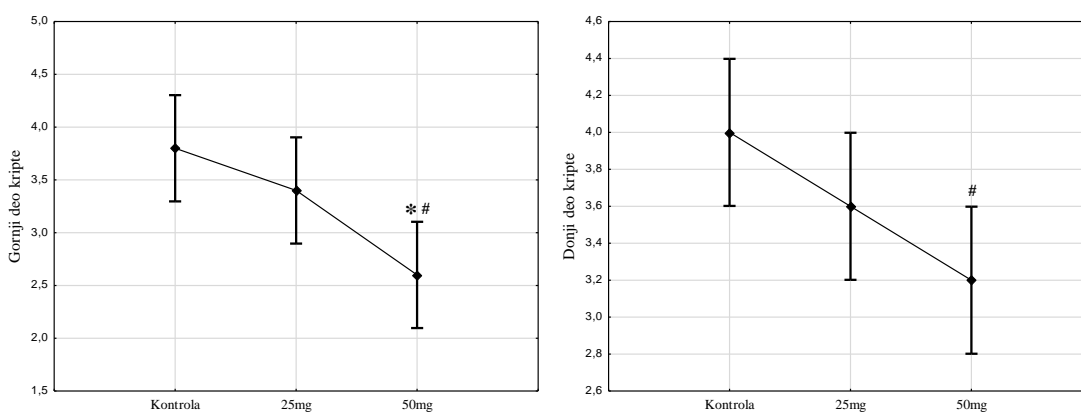


Slika 17. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). Intenzitet obojenosti peharastih ćelija opada pod uticajem 24 h akutnog tretmana akrilamidom (B, C). Anti-MUC2. Bar 10 μ m.

Tabela 17. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za MUC2 pozitivne peharaste ćelije kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Deo kripe	MUC2
K	Gornji	3.80 ± 0.45
	Donji	4.00 ± 0.00
25 mg/kg AA	Gornji	3.40 ± 0.55
	Donji	3.60 ± 0.55
50 mg/kg AA	Gornji	2.60 ± 0.55 ^{b,a}
	Donji	3.20 ± 0.45 ^b

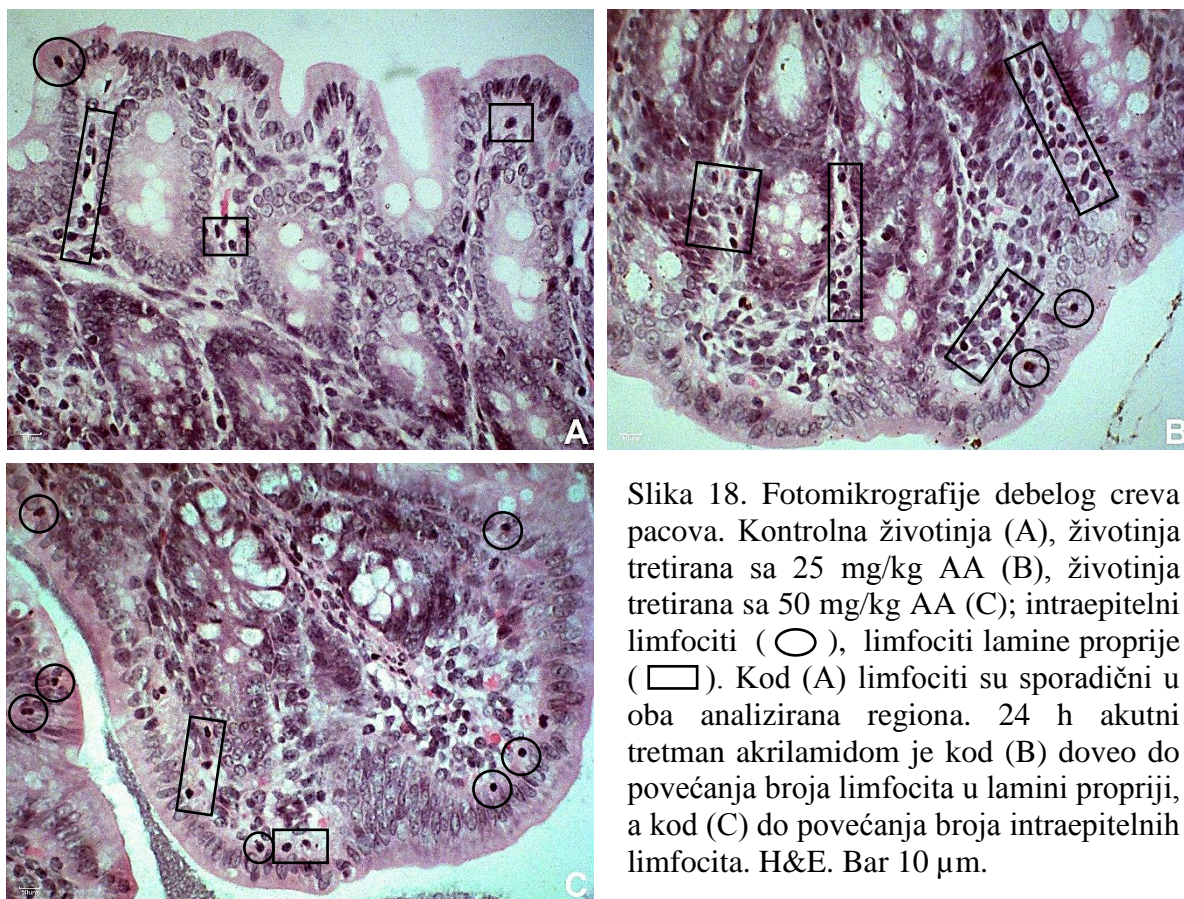
^a $p < 0.05$ u odnosu na 25 mg/kg AA, ^b $p < 0.01$ u odnosu na kontrolu



Grafikon 33. Srednja vrednost i standardna devijacija za MUC2 pozitivne peharaste ćelije u donjem i gornjem delu kripe kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom. * $p < 0.05$ u odnosu na nižu dozu AA, # $p < 0.01$ u odnosu na kontrolu

4.2.1. Limfociti

Dvadesetčetvoročasovni akutni tretman AA doveo je do povećanja broja limfocita u oba ispitivana dela mukoze debelog creva što je potvrđeno i histološkom i semikvantitativnom analizom uzoraka kolona (Sl. 18, Tab. 18). Kod kontrolnih jedinki intraepitelni limfociti su retki, dok su epiteli u lamini propriji pojedinačni, sporadični. Broj limfocita u lamini propriji se više povećao kod niže doze AA nego kod više doze AA u poređenju sa kontrolom. Kod životinja iz grupe koja je tretirana sa nižom dozom AA došlo je generalno do povećanja broja intraepitelnih limfocita, dok je kod više doze AA došlo do neznatnog povećanja u broju intraepitelnih limfocita kod većine jedinki.



Slika 18. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C); intraepitelni limfociti (○), limfociti lamine proprije (□). Kod (A) limfociti su sporadični u oba analizirana regiona. 24 h akutni tretman akrilamidom je kod (B) doveo do povećanja broja limfocita u lamini propriji, a kod (C) do povećanja broja intraepitelnih limfocita. H&E. Bar 10 μm.

Tabela. 18. Semikvantitativna analiza zastupljenosti limfocita u mukozi kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom

Životinja	a	b	c	d	e
Kontrola					
L. epithelialis	1	0/1	0/1	1	0/1
L. propria	1	1	1	1	1
25 mg/kg					
L. epithelialis	0/1	1	2	1/2	2
L. propria	1/2	2	1	1/2	2
50 mg/kg					
L. epithelialis	1	1	2/3	1	1/2
L. propria	1	1	1/2	2	1/2

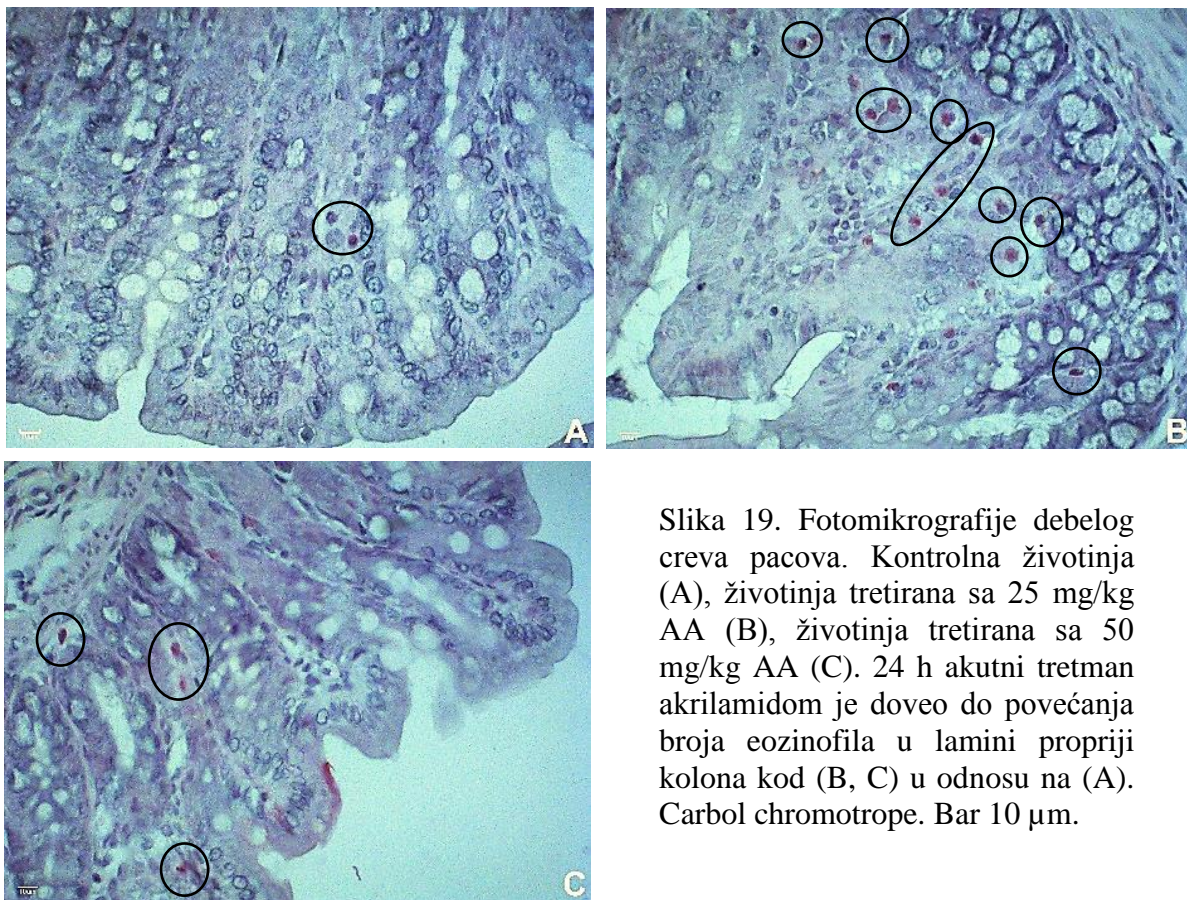
4.2.2. Eozinofili

Histološka analiza broja eozinofila po vidnom polju pokazala je da je došlo do povećanja broja eozinofila pod uticajem 24 h tretmana AA (Sl. 19). Navedeni tretman je imao veći uticaj na pacove tretirane nižom dozom AA nego na životinje tretirane višom dozom AA u odnosu na kontrolne jedinice.

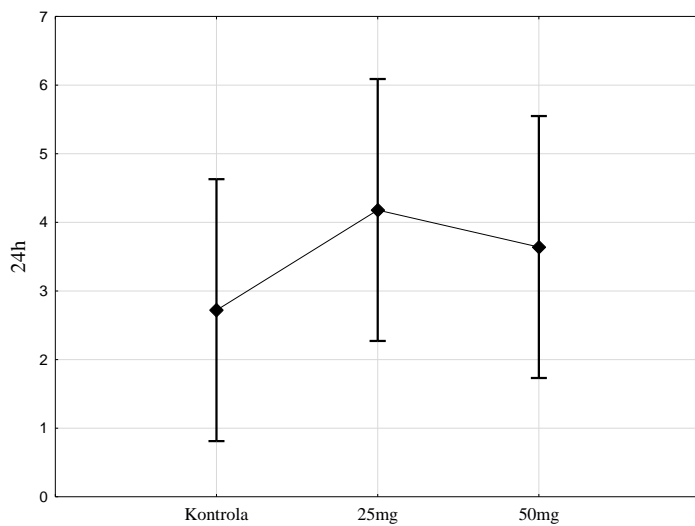
Histološke nalaze potvrdila je statistička analiza dobijenih numeričkih podataka za broj eozinofila po vidnom polju. Na osnovu statističke analize nema signifikantne razlike između kontrolne grupe i grupa kojima je aplikovan AA, ali se zapaža trend porasta broja eozinofila pod uticajem 24 h tretmana AA (Tab. 19, Graf. 34).

Tabela 19. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za broj eozinofila u lamini propriji kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Eozinofili
K	2.72 ± 1.76
25 mg/kg AA	4.18 ± 2.36
50 mg/kg AA	3.64 ± 1.69



Slika 19. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). 24 h akutni tretman akrilamidom je doveo do povećanja broja eozinofila u lamini propriji kolona kod (B, C) u odnosu na (A). Carbol chromotrope. Bar 10 μ m.



Grafikon 34. Srednja vrednost i standardna devijacija za broj eozinofila u lamini propriji kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom.

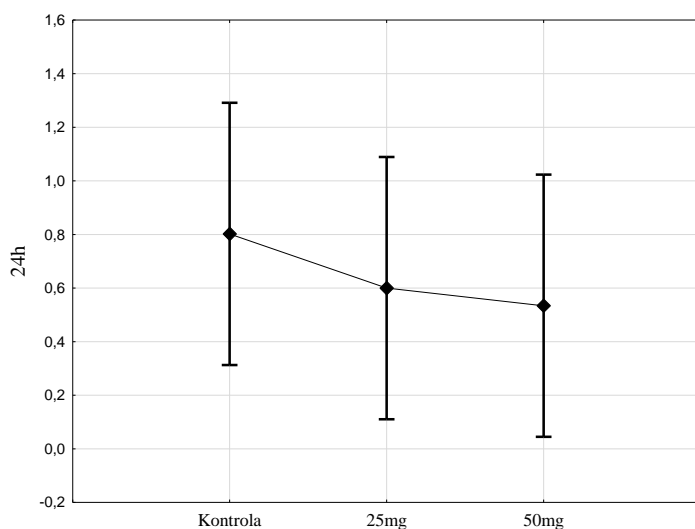
4.2.3. Mastociti

4.2.2.1. TB pozitivni mastociti

Statistička analiza pokazuje da nema signifikantne razlike između broja TB pozitivnih mastocita AA tretiranih i kontrolnih životinja (Tab. 20, Graf. 35). Postoji trend linearnog opadanja u broju TB pozitivnih mastocita sa povećanjem doze AA.

Tabela 20. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za TB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Mastociti
K	0.80 ± 0.29
25 mg/kg AA	0.60 ± 0.44
50 mg/kg AA	0.53 ± 0.69



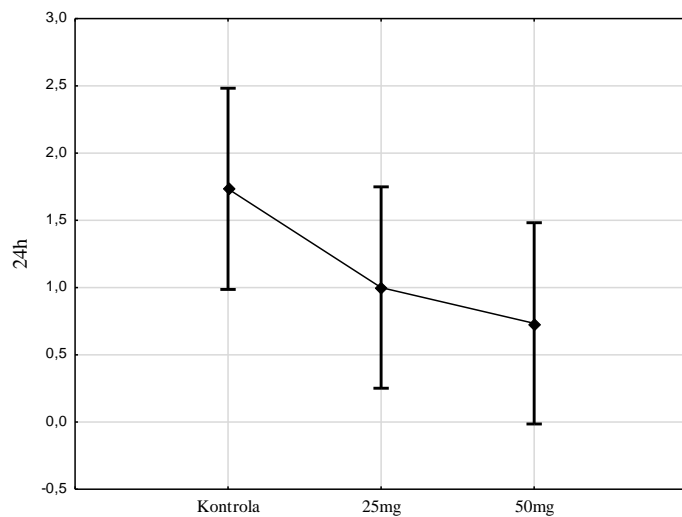
Grafikon 35. Srednja vrednost i standardna devijacija za TB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom.

4.2.2.2. HID-AB pozitivni mastociti

Statistička analiza broja HID-AB pozitivnih mastocita pokazala je trend opadanja kod AA tretiranih životinja u odnosu na kontrolu (Tab. 21, Graf. 36). Zapažene promene nisu bile statistički signifikantne. Kod više doze AA pad u broju mastocita ($p=0.06$) je bio izraženiji nego kod niže AA doze u odnosu na kontrolu.

Tabela 21. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za HID-AB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Mastociti
K	1.73 ± 0.90
25 mg/kg AA	1.00 ± 0.53
50 mg/kg AA	0.73 ± 0.83



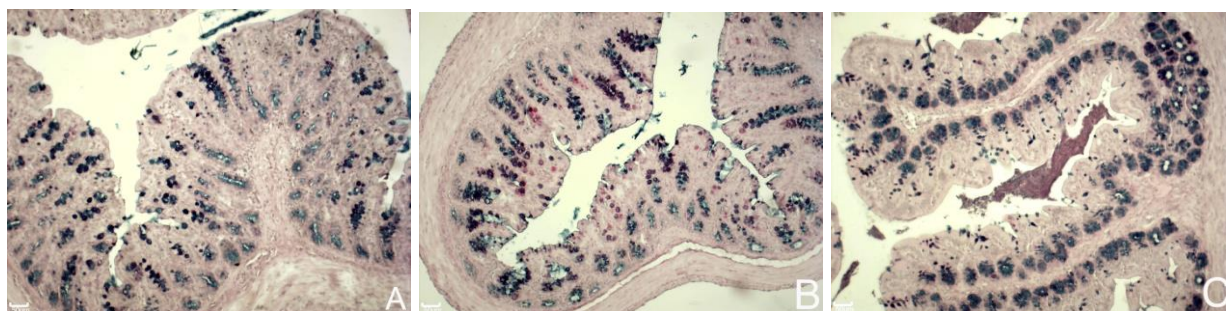
Grafikon 36. Srednja vrednost i standardna devijacija za HID-AB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon 24 h akutnog tretmana akrilamidom.

4.3. REZULTATI 72 h AKUTNOG IZLAGANJA AKRILAMIDU

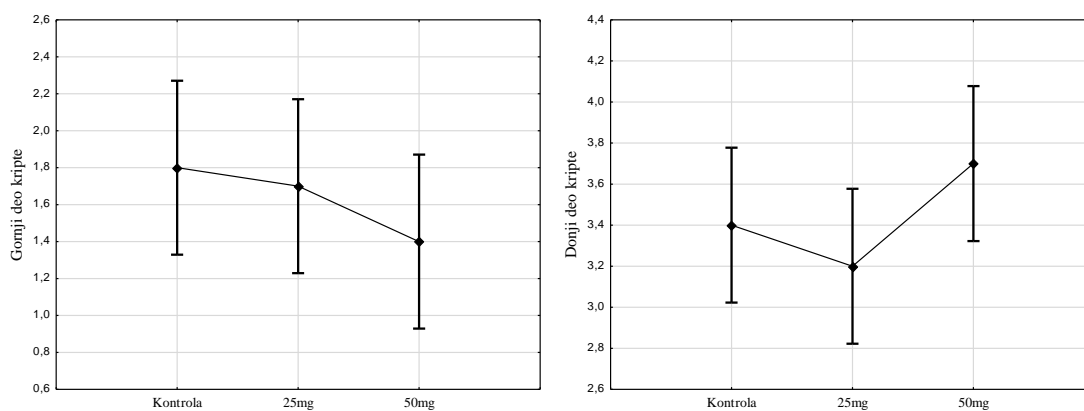
4.3.1. Peharaste ćelije i sadržaj mucina

4.3.1.1. PAS-AB

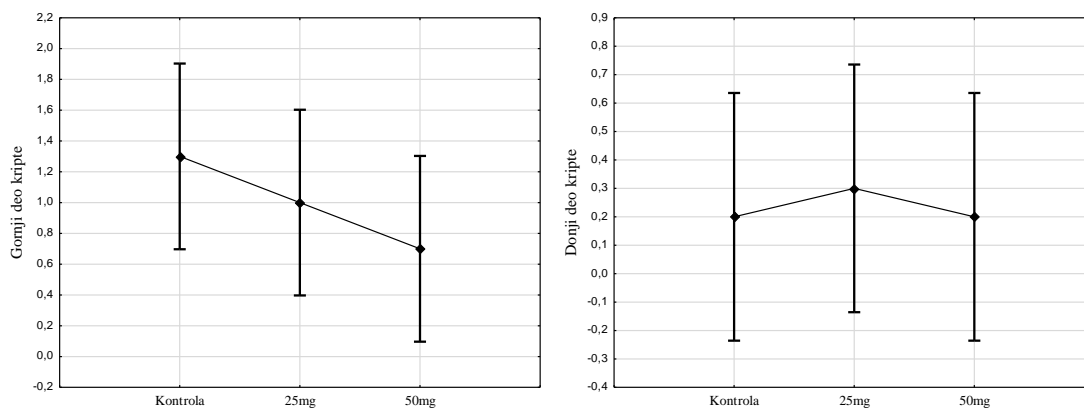
Histološka analiza preseka kolona pokazala je pad u broju ukupnih peharastih ćelija u gornjem delu kripe kod više doze AA (Sl. 20). Ove nalaze je potvrdila i statistička analiza na osnovu koje je evidentiran statistički značajan pad ukupnih peharastih ćelija ($p < 0.05$) u gornjem delu kripe kod više doze AA (Tab. 22, Graf. 40). Opadajući trend je zapažen u gornjem delu kripe, u obe tretirane grupe, kod svih ispitivanih tipova mucina, dok je u donjem delu kripe, kod više doze AA, pokazan rastući trend za sve mucine osim za neutralne (Tab 22, Graf. 37-40).



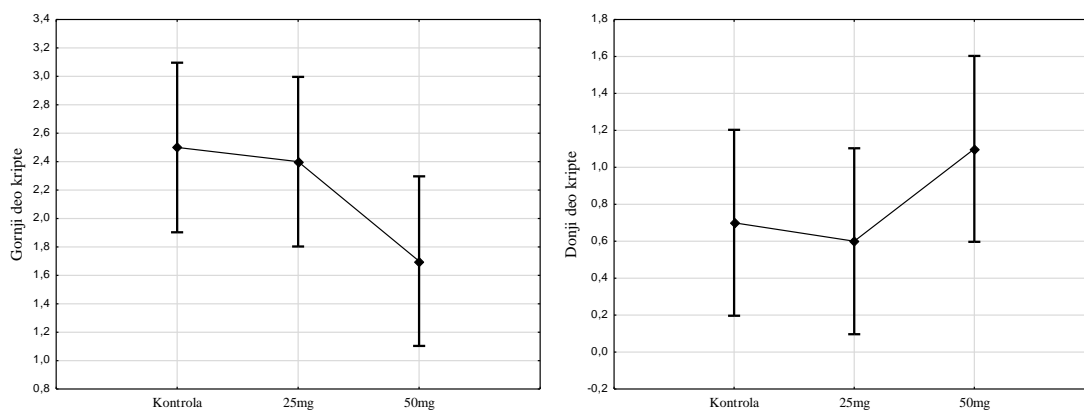
Slika 20. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). Vidi se distribucija kiselih (plave ćelije), neutralnih (pink ćelije) i miks mucina (ljubičaste ćelije) u peharastim ćelijama kolona u donjem i gornjem delu kripe, kao i pad u ukupnom broju peharastih ćelija kod (B, C) u gornjem delu kripe nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom. PAS-AB. Bar 50 µm.



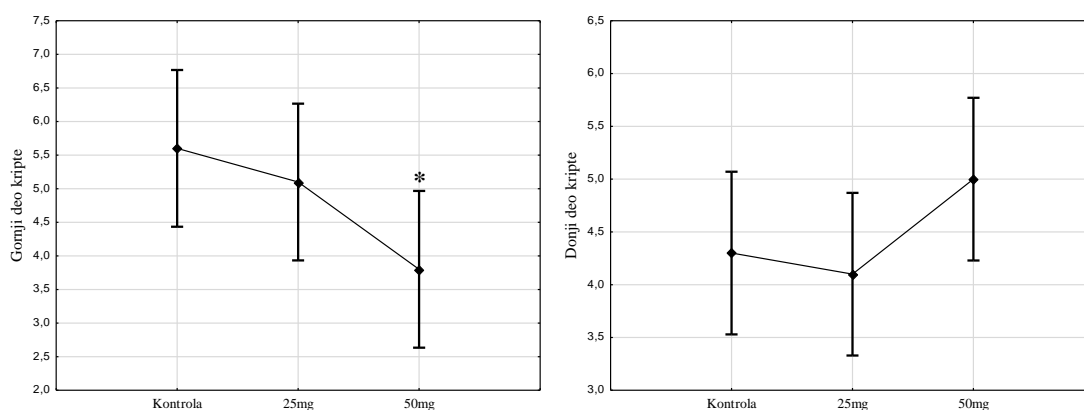
Grafikon 37. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa kiselim mucinima u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.



Grafikon 38. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa neutralnim mucinima u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.



Grafikon 39. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa miksom kiselih i neutralnih mucina u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.



Grafikon 40. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju svih peharastih ćelija u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom. * $p < 0.05$

Tabela 22. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za mucine u peharastim ćelijama kolona bojene PAS-AB pH 2.5 metodom nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Deo kripe	Ukupni mucini	Neutralni mucini	Kiseli mucini	Mix neutralnih i kiselih mucina
K	Gornji	5.60 ± 0.89	1.30 ± 0.27	1.80 ± 0.57	2.50 ± 0.61
	Donji	4.30 ± 0.84	0.20 ± 0.27	3.40 ± 0.22	0.70 ± 0.57
25 mg/kg AA	Gornji	5.10 ± 1.56	1.00 ± 0.87	1.70 ± 0.45	2.40 ± 0.55
	Donji	4.10 ± 1.0	0.30 ± 0.67	3.20 ± 0.57	0.60 ± 0.65
50 mg/kg AA	Gornji	3.80 ± 1.04 ^a	0.70 ± 0.57	1.40 ± 0.42	1.70 ± 0.67
	Donji	5.00 ± 0.50	0.20 ± 0.27	3.70 ± 0.27	1.10 ± 0.22

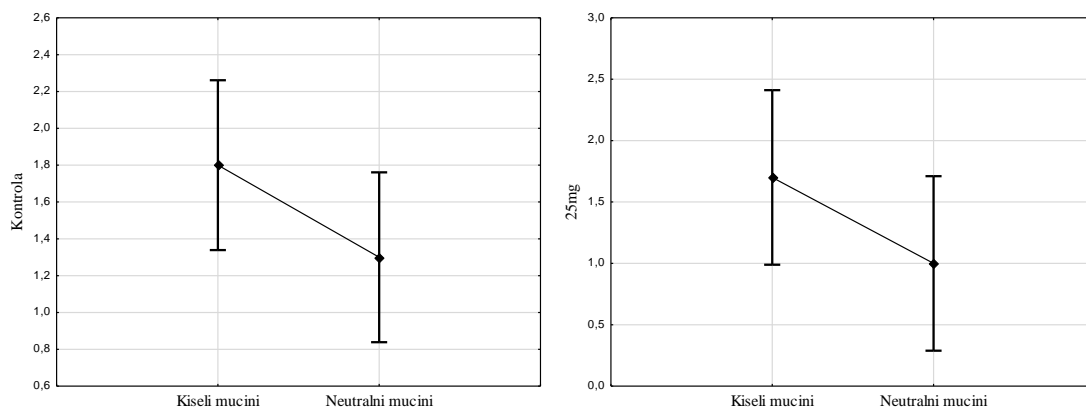
^a p<0.05 u odnosu na kontrolu

Rezultati statističke analize odnosa neutralnih i kiselih mucina su pokazali da je u donjem delu kripe, kod više doze AA došlo do povećanja navedenog odnosa mucina u odnosu na kontrolu (Tab. 23, Graf. 42). U gornjem delu kripe kod niže doze AA odnos neutralnih i kiselih mucina se povećao u poređenju sa kontrolom, dok se kod više doze AA ovaj odnos smanjio (Tab. 23, Graf. 41).

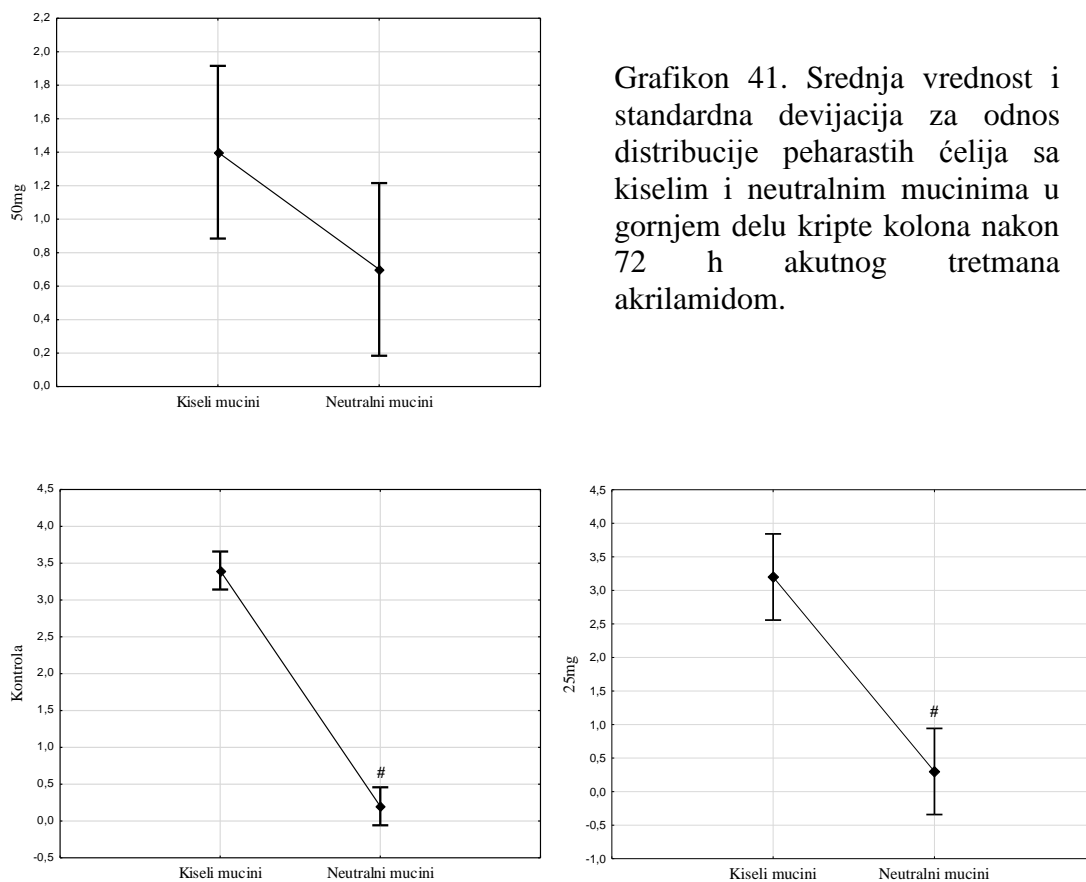
Tabela 23. Odnos neutralnih i kiselih mucina u peharastim ćelijama kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Tip mucina	Deo kripe	
		Gornji	Donji
K	NM/AM	0.72	0.06
25 mg/kg AA	NM/AM	0.59	0.09
50 mg/kg AA	NM/AM	0.50	0.05

NM: neutralni mucini, AM: kiseli mucini



Grafikon 41. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharstih ćelija sa kiselim i neutralnim mucinima u gornjem delu kripte kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.

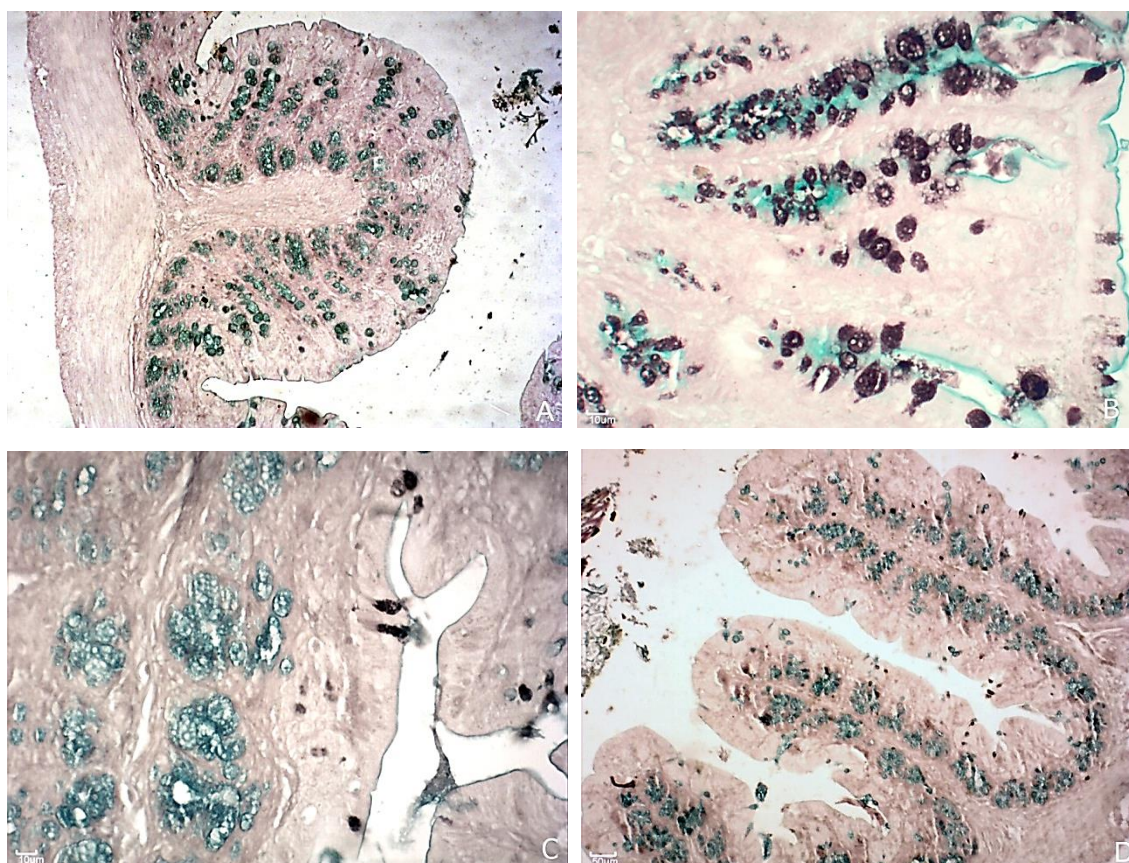


Grafikon 42. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharstih ćelija sa kiselim i neutralnim mucinima u gornjem delu kripte kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom. # $p < 0.01$

4.3.1.2.HID-AB

Histološka analiza preseka kolona pokazala je, isto kao i kod 24 h akutnog tretmana, veliku varijabilnost u zastupljenosti sulfo- i sijalomucina kod jedinki u okviru niže doze AA (Sl. 21 B, C), dok je kod više doze AA primetno smanjenje u broju peharastih ćelija u gornjem delu kripte (Sl. 21 D). Zapaženo je i odsustvo sulfomucina u donjem delu kripte kod kontrolnih životinja kao i kod jedinki tretiranih višom dozom AA.

Statistička analiza je potvrdila odsustvo sulfomucina kod više doze AA kao i kod kontrole (Tab. 24). Kvantitet sulfomucina je bio povećan kod niže doze AA u oba dela kripte u odnosu na kontrolu (Graf. 43). Sijalomucini su bili statistički signifikantno smanjeni ($p < 0.05$) kod niže doze AA u oba dela kripte u poređenju sa kontrolom, kao i kod više doze AA u odnosu na nižu dozu AA ($p < 0.05$) (Tab. 24, Graf. 44). U gornjem delu kripte, u sve tri eksperimentalne grupe, ukupna zastupljenost peharastih ćelija je bila ista, dok se u donjem delu kripte zapaža blagi porast njihovog broja uporedo sa povećanjem doze AA u poređenju sa kontrolom (Tab. 24, Graf. 45).

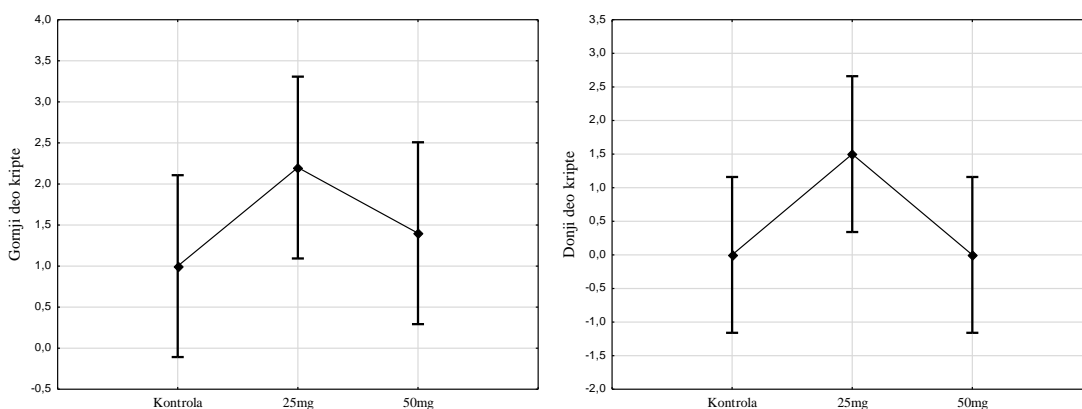


Slika 21. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). Kod (B) se zapaža dominacija sulfomucina (crne ćelije), a kod (C) dominacija sijalomucina (plave ćelije). Kod (D) se uočava mali broj peharastih ćelija u gornjem delu kripte nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom. HID-AB. Bar 10 μ m (B, C); 50 μ m (A, D).

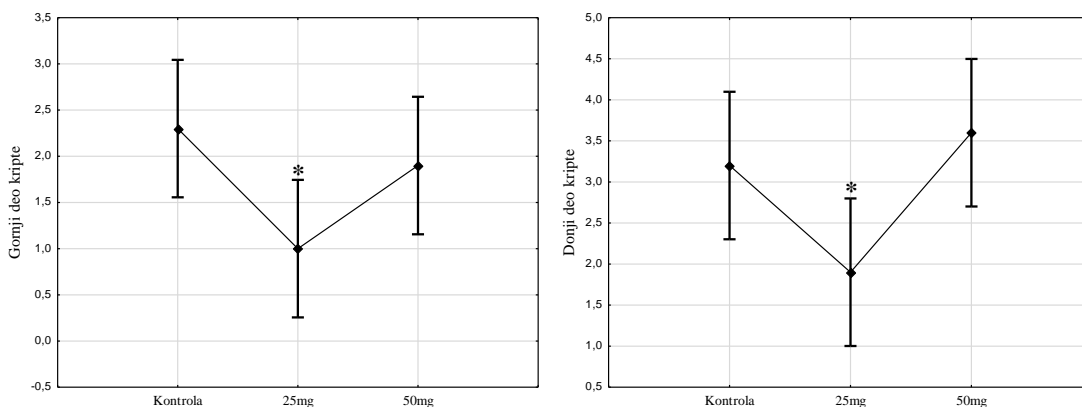
Tabela 24. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za mucine u peharastim ćelijama kolona bojene HID-AB pH 2.5 metodom nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Deo kripe	Ukupni mucini	Sijalomucini	Sulfomucini
K	Gornji	3.30 ± 0.84	2.30 ± 0.91	1.00 ± 0.35
	Donji	3.20 ± 0.45	3.20 ± 0.45	0.00 ± 0.00
25 mg/kg A	Gornji	3.20 ± 1.04	1.00 ± 0.94 ^a	2.20 ± 1.89
	Donji	3.40 ± 0.65	1.90 ± 1.52 ^a	1.50 ± 2.06
50 mg/kg A	Gornji	3.30 ± 0.57	1.90 ± 0.22	1.40 ± 0.42
	Donji	3.60 ± 0.22	3.60 ± 0.22 ^b	0.00 ± 0.00

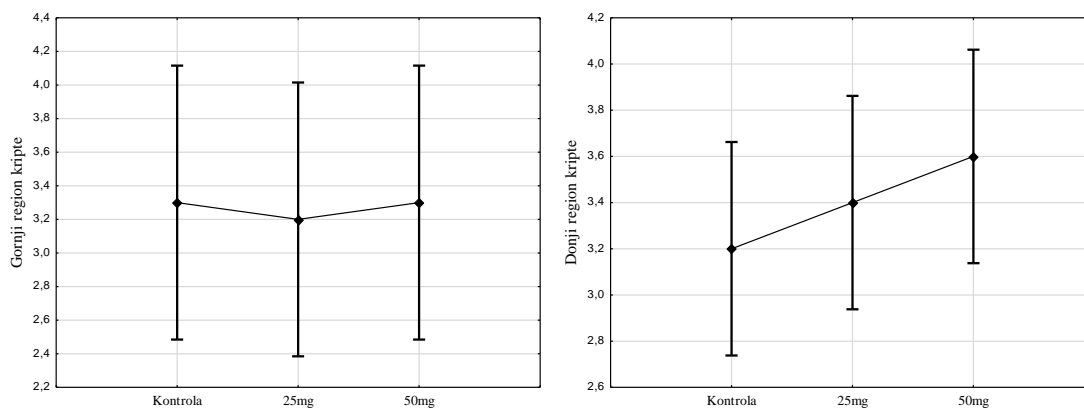
^a p<0.05 u odnosu na kontrolu, ^b p<0.05 u odnosu na 25 mg/kg AA



Grafikon 43. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa sulfomucinima u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.



Grafikon 44. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju peharastih ćelija sa sijalomucinima u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom. * p<0.05



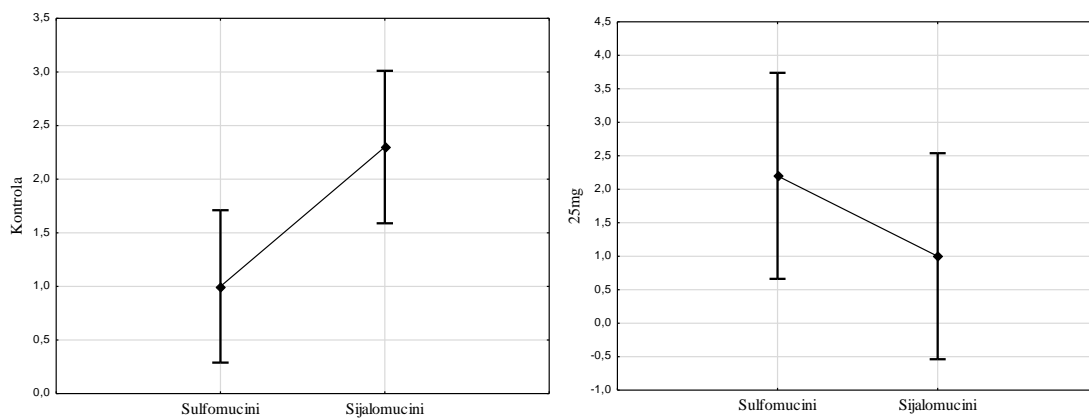
Grafikon 45. Srednja vrednost i standardna devijacija za distribuciju ukupnih peharastih ćelija u gornjem i donjem delu kripe kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.

Rezultati dobijeni analizom odnosa sulfo- i sijalomucina pokazali su veće promene kod tretmana nižom dozom AA nego kod tretmana višom dozom AA u odnosu na kontrolu (Tab. 25). U gornjem delu kripe odnos sulfo- i sijalomucina se povećao kod niže doze AA dok se kod više doze smanjio u poređenju sa kontrolom (Graf. 46). U donjem delu kripe promene u odnosu sulfo- i sijalomucina su zapažene samo kod niže doze AA u odnosu na kontrolu (Graf. 47).

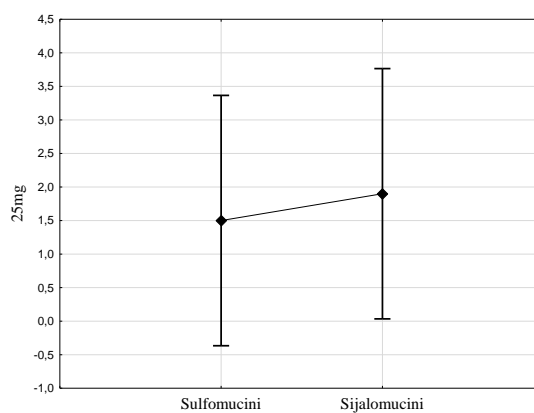
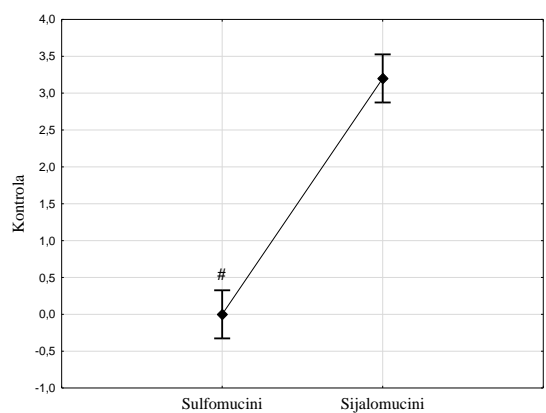
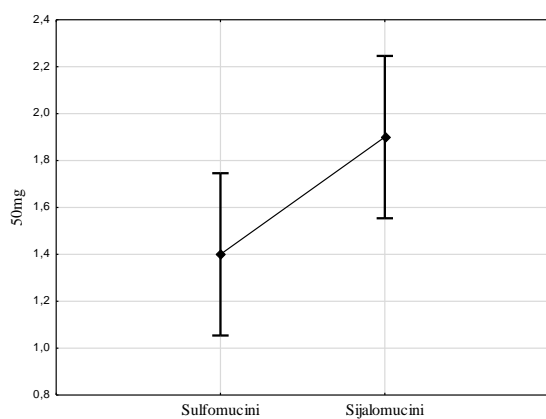
Tabela 25. Odnos sulfo- i sijalomucina u peharastim ćelijama kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Tip mucina	Deo kripe	
		Gornji	Donji
K	SuM/SiM	0.43	0.00
25 mg/kg AA	SuM/SiM	2.20	0.79
50 mg/kg AA	SuM/SiM	0.74	0.00

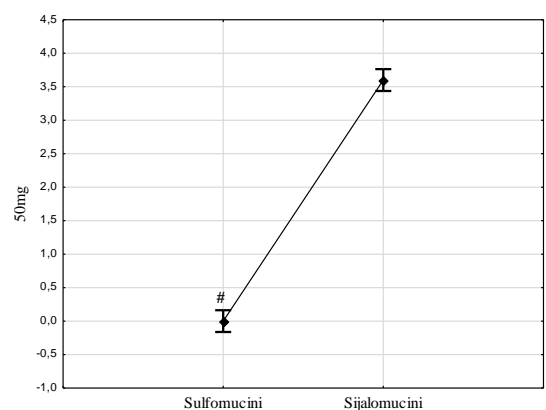
SuM: sulfomucini, SiM: sijalomucini



Grafikon 46. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharastih ćelija sa sulfo- i sijalomucinima u gornjem delu kripe kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.

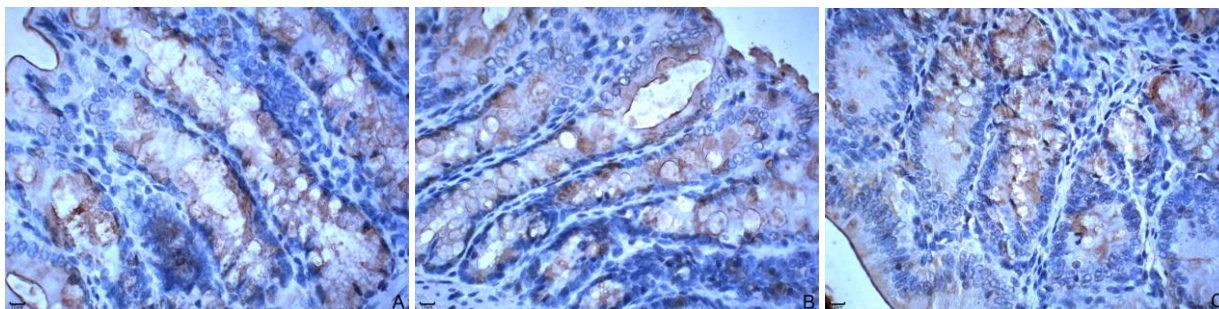


Grafikon 47. Srednja vrednost i standardna devijacija za odnos distribucije peharastih ćelija sa sulfo- i sijalomucinima u donjem delu kripe kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.
$p < 0.01$



4.3.1.3. MUC2

Histološkom analizom je utvrđeno smanjenje u količini MUC2 pozitivnih peharastih ćelija u epitelu Liberkinovih kripti kolona kod više doze AA u odnosu na kontrolu (Sl. 22). Zastupljenost MUC2 ćelija kod niže doze AA bila je slična kao i kod kontrole.

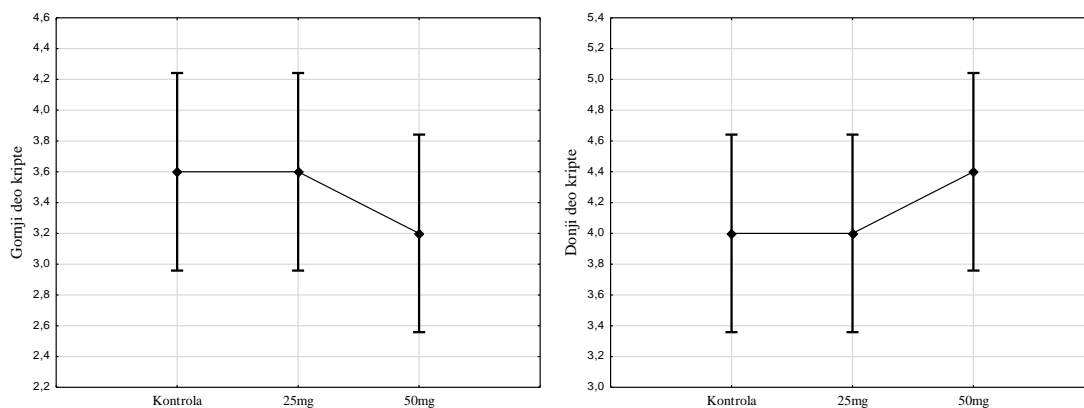


Slika 22. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). Intenzitet obojenosti peharastih ćelija je manji kod (C) u odnosu na (A), dok je kod (B) skoro isti kao kod (A) nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom. Anti-MUC2. Bar 10 μ m.

Na osnovu statističke analize signifikantno smanjenje ($p < 0.05$) MUC2 pozitivnih peharastih ćelija evidentirano je u gornjem delu kripte između više i niže doze AA (Tab. 26, Graf. 48). U donjem delu kripte, kod više doze AA, primećena je povećana distribucija MUC2 pozitivnih peharastih ćelija u odnosu na kontrolu, dok je u gornjem delu kripte, u okviru iste eksperimentalne grupe, zabeležen trend smanjenja broja MUC2 pozitivnih peharastih ćelija. Navedene promene nisu bile statistički signifikantne.

Tabela 26. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za MUC2 pozitivne peharaste ćelije kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Deo kripte	MUC2
K	Gornji	3.60 ± 0.55
	Donji	4.00 ± 0.71
25 mg/kg AA	Gornji	3.60 ± 0.89
	Donji	4.00 ± 0.71
50 mg/kg AA	Gornji	3.20 ± 0.45
	Donji	4.40 ± 0.55

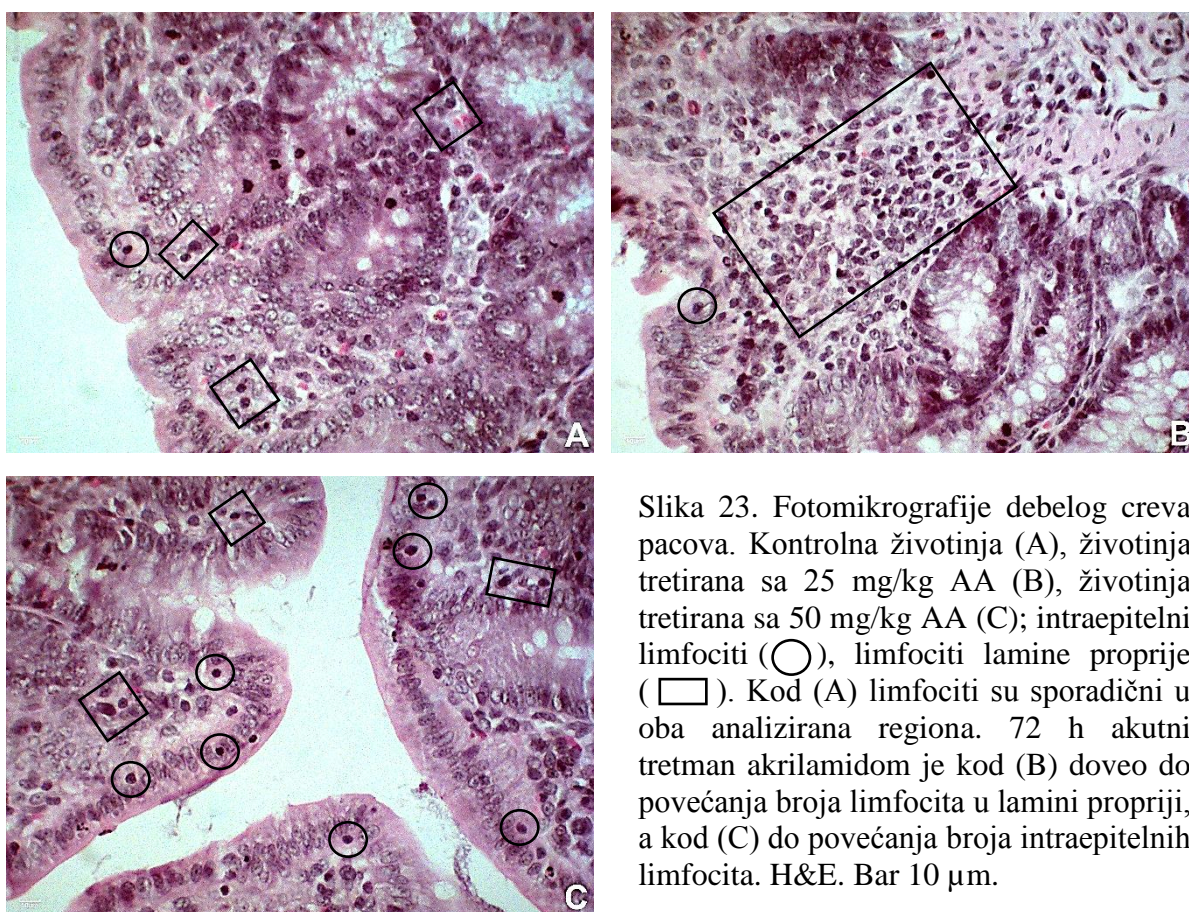


Grafikon 48. Srednja vrednost i standardna devijacija za MUC2 pozitivne peharaste ćelije u donjem i gornjem delu kripe kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.

4.3.1. Limfociti

Histološka analiza uzoraka kolona je pokazala da je 72 h akutni tretman AA doveo do povećanja broja limfocita kod tretiranih grupa u odnosu na kontrolu (Sl. 23). Kod kontrolnih pacova u kolonu se sreću sporadični limfociti kako u epitelu tako i u lamini propriji. Kod pacova tretiranih sa 25 mg/kg AA došlo je do malog povećanja broja intraepitelnih limfocita, dok je povećanje broja limfocita u lamini propriji bilo izraženije. Kod nekih pacova kojima je aplikovana niža doza AA zapažaju se veće infiltracije limfocita (Sl. 23 B). U debelom crevu životinja tretiranih sa višom dozom AA dominira porast broja intraepitelnih limfocita, dok je broj limfocita u lamini propriji bio skoro isti kao kod kontrolnih jedinki.

Semikvantitativna analiza potvrdila je nalaze dobijene histološkom analizom preseka debelog creva pacova. U tabeli 27 prikazani su brojevi kojima je označena zastupljenost limfocita u mukozi kolona kod svakog pojedinačnog pacova iz eksperimenta. Zapaža se da su intraepitelni limfociti u kontrolnoj grupi bili retki ili malobrojni, dok su limfociti u lamini propriji bili pojedinačni uglavnom malobrojni, a kod nekih životinja su bili zastupljeni u nešto većem broju. Kod niže doze AA došlo je do povećanja limfocita u oba ispitivana regiona mukoze kolona. Pacovi iz grupe tretirane višom dozom AA na tretman su reagovali povećanjem broja intraepitelnih limfocita i neznatnim povećanjem broja limfocita u lamini propriji debelog creva.



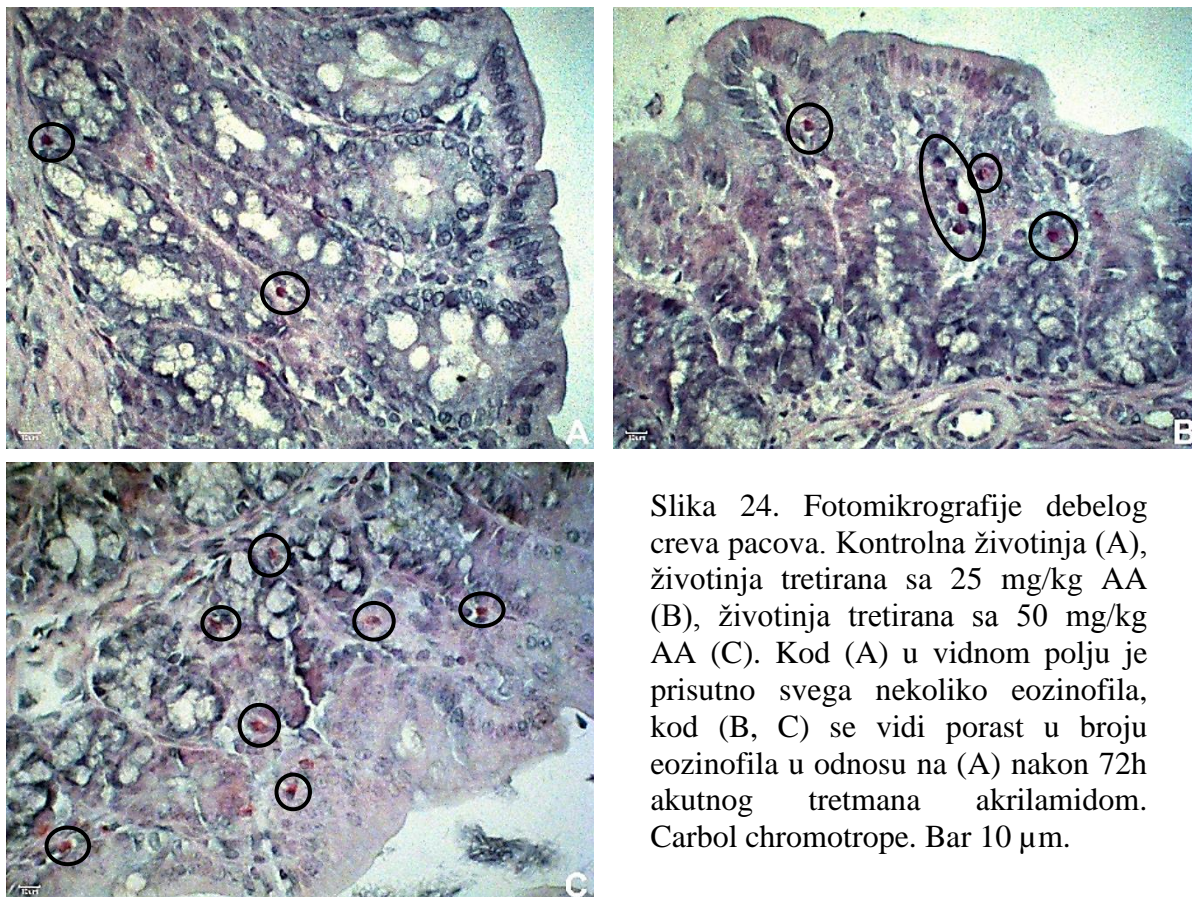
Slika 23. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C); intraepitelni limfociti (○), limfociti lamine proprije (□). Kod (A) limfociti su sporadični u oba analizirana regiona. 72 h akutni tretman akrilamidom je kod (B) doveo do povećanja broja limfocita u lamini propriji, a kod (C) do povećanja broja intraepitelnih limfocita. H&E. Bar 10 μ m.

Tabela. 27. Semikvantitativna analiza zastupljenosti limfocita u mukozi kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom

Životinja	a	b	c	d	e
Kontrola					
L. epithelialis	1	2	1/2	1	1
L. propria	1	1	2	1	2
25 mg/kg					
L. epithelialis	1	2	2	1/2	1
L. propria	2/3	1/2	1/2	2	1
50 mg/kg					
L. epithelialis	2	2	2	1/2	1/2
L. propria	2	1/2	1/2	1/2	1/2

4.3.2. Eozinofili

Histološka analiza uroraka kolona je pokazala da 72 h akutni tretman AA dovodi do povećanja broja eozinofila u lamini propriji tunike mukoze (Sl. 24). Na preparatima kontrolnih jedininki vide se pojedinačni sporadični eozinofili, dok su kod tretiranih životinja oni brojniji, a na nekim mestima i grupisani.

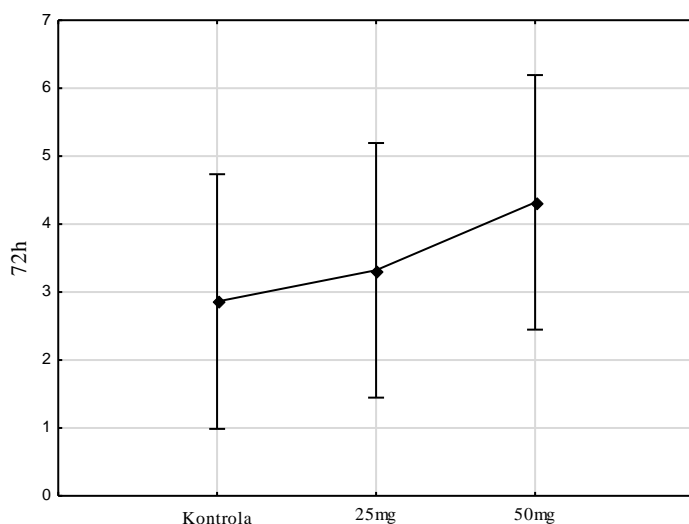


Slika 24. Fotomikrografije debelog creva pacova. Kontrolna životinja (A), životinja tretirana sa 25 mg/kg AA (B), životinja tretirana sa 50 mg/kg AA (C). Kod (A) u vidnom polju je prisutno svega nekoliko eozinofila, kod (B, C) se vidi porast u broju eozinofila u odnosu na (A) nakon 72h akutnog tretmana akrilamidom. Carbol chromotrope. Bar 10 µm.

Statistička analiza numeričkih podataka dobijenih analizom broja eozinofila po vidnom polju pokazala je da postoji trend povećanja broja eozinofila u kolonu nakon 72 h akutnog tretmana AA (Tab. 28, Graf. 49). Zapaženo povećanje broja eozinofila nije bilo statistički signifikantno ni u jednoj AA tretiranoj grupi životinja.

Tabela 28. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za broj eozinofila u lamini propriji kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Eozinofili
K	2.86 ± 2.05
25 mg/kg AA	3.32 ± 1.96
50 mg/kg AA	4.32 ± 1.74



Grafikon 49. Srednja vrednost i standardna devijacija za broj eozinofila u lamini propriji kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.

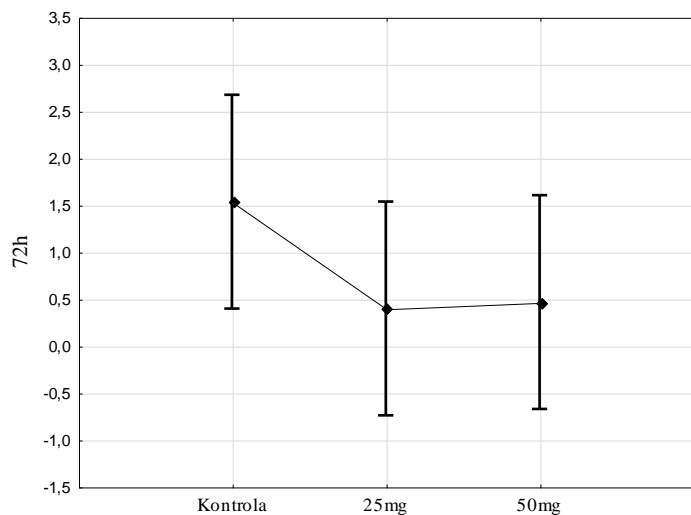
4.3.3. Mastociti

4.3.2.1. TB pozitivni mastociti

Statistička analiza numeričkih podataka dobijenih nakon analize broja TB pozitivnih mastocita nakon 72 h akutnog tretmana AA pokazala je da nema signifikantne razlike u broju mastocita između kontrolnih i AA tretiranih životinja (Tab. 29, Graf. 50). Međutim, uočava se smanjenje broja TB-pozitivnih mastocita sa povećanjem doze AA.

Tabela 29. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za TB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Mastociti
K	1.53 ± 1.87
25 mg/kg AA	0.40 ± 0.55
50 mg/kg AA	0.47 ± 0.56



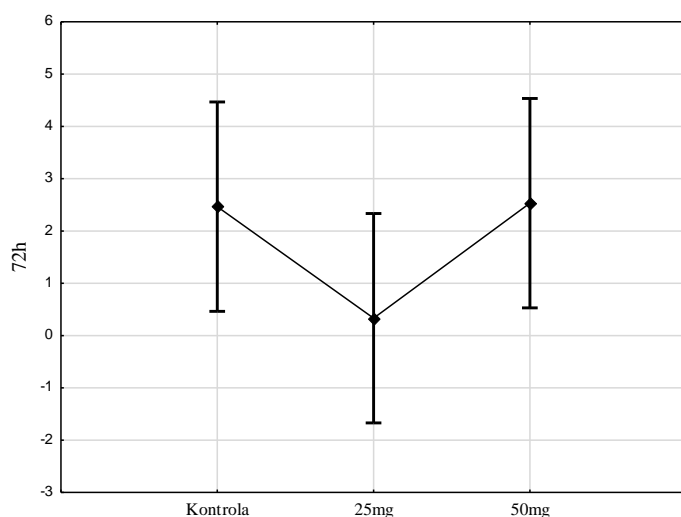
Grafikon 50. Srednja vrednost i standardna devijacija za TB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.

4.3.2.2. HID-AB pozitivni mastociti

Statistička analiza broja HID-AB pozitivnih mastocita je pokazala pad u njihovoj brojnosti kod niže doze AA i neznatni rast kod više doze AA u odnosu na kontrolne jedinice (Tab. 30, Graf. 51). Navedene promene nisu bile statistički značajne.

Tabela 30. Srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za HID-AB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom

Eksp. grupa	Mastociti
K	2.47 ± 2.79
25 mg/kg AA	0.33 ± 0.41
50 mg/kg AA	2.53 ± 2.17



Grafikon 51. Srednja vrednost i standardna devijacija za HID-AB pozitivne mastocite u submukozi kolona nakon 72 h akutnog tretmana akrilamidom.

5. DISKUSIJA

Sudbina molekula AA je kvalitativno slična kod svih do sada ispitivanih sisarskih vrsta, uključujući miševе, pacove i ljude (Fuhr i sar., 2006). Nakon studija koje su potvrdile da AA prolazi krv-placenta barijeru kod ljudi, kao i krv-mleko barijeru tokom laktacije zaključeno je da oralno uneti AA može da stigne do svih tkiva u ljudskom organizmu. Takođe je potvrđeno da se AA brzo apsorbuje nakon oralne administracije (Dybing i sar., 2005). Fuhr i sar. (2006) su ispitivali sudbinu AA unetog putem hrane na šest ljudskih dobrovoljaca i došli su do nalaza da je organizam apsorbovao većinu unete doze AA. Istraživanja vršena na svinjama su pokazala da nema razlike u apsorpciji AA ukoliko se on unese vodom ili hranom (Aureli i sar., 2007). Molekuli AA pasivnom difuzijom prolaze crevni epitel (Schabacker i sar., 2004) i u velikom stepenu bivaju apsorbirani u njemu (Zödl i sar., 2007). Hamzalioglu and Gökmen (2015) su pokazali da količina AA unetog sa hranom ne mora da odgovara njegovoj bioraspoloživosti jer na to utiču i uslovi sredine kao i hemijski sastav same hrane. Oni su izveli eksperiment u kome su pratili *in vitro* digestiju hrane bogate AA u duodenumu, želucu i kolonu. Na osnovu tog eksperimenta zaključili su da se bioraspoloživost AA tokom digestije keksa smanjuje, dok se tokom digestije pomfrita povećava. Svoj nalaz su objasnili visokim procentom asparagina u krompiru koji je glavni prekursor u sintezi AA.

Više od trećine hrane koju dnevno unesu stanovnici USA i Evrope sadrži AA (Armstrong, 2009; Mucci and Wilson, 2008) i veći deo unetog AA se apsorbuje (Fuhr et al., 2006). Poznato je da deca unesu mnogo više AA po kilogramu telesne težine nego odrasli, imajući u vidu njihov način ishrane, što dnevno može da dosegne i do 3.4 μg bw (Dybing et al., 2005). Fuhr i sar. (2006) su preračunali da porcija od 150 g pomfrita sadrži 938 μg AA što je 12.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw, a to je dvadeset puta više od preporučene dnevne doze AA. Cilj našeg rada je bio da se evaluirе efekat AA u dozama koje su poznate da izazivaju kancer kod pacova (Johnson et al., 1986; Friedman et al., 1995), na morfologiju zida debelog creva kao i na tuniku mukozu kolona kod juvenilnih pacova.

U okviru tunike mukoze subhronični tretman AA je doveo do povećanja V_{V1p} i smanjenja V_{V1ms} dok je V_{V1e} ostala nepromenjena u odnosu na kontrolu. Epitel predstavlja anatomsku i funkcionalnu barijeru tako da je neoštećena lamina epitelijalis od vitalnog značaja za očuvanje homeostaze kolona (McGuckin i sar., 2009; Lievin-Le Moal i Servin, 2006). Na osnovu histološke analize možemo zaključiti da je povećanje V_{V1p} posledica infiltracije imunih ćelija, uglavnom limfocita, u laminu propriju. Možemo pretpostaviti da je AA narušio odnos između epitela i mikroorganizama u kolonu što je dovelo do infiltracije imunih ćelija u laminu propriju kao što je pokazano u nekoliko drugih studija (Roda i sar., 2010; Schoffen i

sar., 2014). Isti efekat AA je imao i na gastričnu mukozu (El-Mehi i El-Sherif, 2015) kod koje je došlo do infiltracije imunih ćelija usled oštećenja mukusne barijere i erozije epitela.

Debljina lamine muskularis mukoze je kod pacova sa smanjenim unosom hrane (Schoffen i sar., 2014) bila veća kod tretmana u odnosu na kontrolne životinje što je u suprotnosti sa našim nalazom gde je pod uticajem AA V_{Vms} snižena u odnosu na kontrolu. De Sousa i sar. (2008) su radili evaluaciju histopatološki promena zida kolona, u delovima bez crevnog sadržaja, tokom diverzionog kolitisa koji je trajao šest, odnosno dvanaest nedelja. Njihovo istraživanje je pokazalo da je kod životinja čiji su delovi kolona bili bez crevnog sadržaja tokom dvanaest nedelja došlo do signifikantnog smanjenja debljine lamine muskularis mukoze u odnosu na životinje koje su bile podvrgnute eksperimentu tokom šest nedelja.

V_{Vtm} je kod obe tretirane grupe u okviru našeg subhroničnog tretmana AA bila povećana u odnosu na kontrolu, a kod niže doze to povećanje je bilo statistički značajno. Infiltracija limfocita koja je primećena kod tretiranih životinja je takođe izraženija kod niže doze AA. Infiltracija limfocita može biti uzrok povećane V_{Vtm} kod AA tretiranih pacova slično kao što se desilo kod životinja koje su bile na tretmanu smanjenog unosa hrane (Schoffen i sar., 2014). Na primeru eksperimentalno izazvanog kolitisa kod pacova, sandom je potvrđeno prisustvo inflamatornog infiltrata u vezivnom tkivu debelog creva, kao i povećana debljina zida distalnog kolona (Lied i sar., 2012). Za razliku od našeg nalaza, AA je u želucu izazvao signifikantno smanjenje debljine tunike mukoze što je posledica deskvamacije i erozije gastričnog epitela (El-Mehi i El-Sherif, 2015).

Naš nalaz o linearnom opadanju V_{Vts} u odnosu na doze AA je u saglasnosti sa nalazima Dobrowolski i sar. (2012) koji su pokazali da tretman AA dovodi do pada u debljini tunike submukoze u tankom crevu miševa. Za razliku od njih, Tomaszewaska i sar. (2014) su pokazali smanjenje debljine tunike submukoze u jejunumu i njeno povećanje u duodenumu tek rođenih zamorčića čijim majkama je aplikovan AA tokom gestacije. U navedenom eksperimentu ustanovljena je dominacija kolagena tipa I u duodenumu, dok je u jejunumu pod uticajem AA zapaženo smanjenje kolagena tipa I i povećanje kolagena tipa III. Prema Tomaszewaska i sar. (2014) smanjenje V_{Vts} u tankom crevu zamorčeta, pod uticajem AA, može biti posledica promena u Majsnerovom nervnom pleksusu. U prilog navedenoj činjenici ide podatak da Majsnerov nervni pleksus direktno inerviše laminu muskularis mukoze (Schoffen i sar., 2014). Kod pacova koji su bili na tretmanu smanjenog unosa hrane debljina tunike submukoze se smanjila kao i u našem eksperimentu (Schoffen i sar., 2014). S obzirom da su Tomaszewaska i sar. (2014) pokazali da je kolagen u crevima reaktivan na tretman AA možemo pretpostaviti da su promene u volumenu kolagena uticale na promene u V_{Vts} u

našem subhroničnom eksperimentu. Takođe, treba imati u vidu da je kolagen ekstracelularna struktura podložna promenama pod uticajem raznih faktora, kao i da se njegov kvalitet i kvantitet menjaju tokom postnatalnog života pacova (Lu i sar, 2005; Van Ginneken i Weyns, 2004), a najviše tokom prva dva meseca života.

Rezultati naše stereološke analize su pokazali promene u V_{vtms} pod uticajem AA. Debljina tunike mukoze je usko povezana sa motilitetom creva, a kontrakcije tunike muskularis su od presudnog značaja za peristaltičke pokrete debelog creva. Roldi i sar. (2009) su pokazali redukciju u broju mijenteričnih neurona u kolonu kao i smanjenje debljine tunike muskularis kod pacova sa dijabetesom u poređenju sa zdravim jedinkama. Zaključili su da je redukcija u debljini tunike muskularis kod životinja sa dijabetesom posledica smanjenog broja mijenteričnih neurona. Schoffen i sar. (2014) su zabeležili redukciju u debljini tunike muskularis debelog creva nakon eksperimenta u kome su pacovima smanjili unos hrane za 50% u odnosu na kontrolne životinje. Zapaženu atrofiju mišića su objasnili smanjenom količinom unetih nutrijenata, posebno amino kiselina važnih za sintezu proteina u mišićima kolona. Nasuprot predhodno navedenim nalazima, eksperiment na pacovima koji su hranjeni hranom sa visokim sadržajem celuloze je pokazao signifikantno povećanje veličine glatko mišićnih ćelija u distalnom kolonu pacova (Stark i sar., 1995). AA je poznati neurotoksikant kod životinja i ljudi (Parzefall, 2008; US EPA, 2010). LoPachin i sar. (2002) su pokazali da su nervni završeci primarno mesto na kome se ispoljava neurotoksičnost AA, dok su Rao i sar. (2014) dokazali da periferni neurotoksikanti koji utiču na autonomna nervna vlakna mogu dovesti do poremećaja u gastrointestinalnom traktu. AA, takođe, utiče na relativni refraktorni period mišićnog akcionog potencijala i usporava mišićnu kondukciju (Anderson, 1982; Ko i sar., 1999) i dovodi do smanjene lokomotorne aktivnosti (Seale i sar., 2012).

Crevni epitel je obložen mukusom koga sekretuju peharaste ćelije i on predstavlja prvu liniju odbrane od fizičkih i hemijskih povreda izazvanih unetom hranom, mikroorganizmima i mikrobijalnim produktima. Glavnu komponentu mukusa čine mucini, veliki glikoproteinski molekuli koji se sastoje od proteinskog jezgra povezanog sa oligosaharidima. Mucini na površini epitela imaju tendenciju agregacije i stvaranja gela (Bansil i Turner, 2006).

Iako mukus predstavlja barijeru za prodor mikroorganizama on istovremeno predstavlja i dom za komensalne bakterije koje kolonizuju debelo crevo. Komensalne bakterije se pomoću specifičnih adhezina vezuju za oligosaharide u sastavu mucina u gornjem mukusnom sloju debelog creva (Bansil i Turner, 2006; Dharmani i sar., 2009). Debljina mukusa u kolonu je četiri puta veća u odnosu na ostale delove digestivnog sistema, a 86% od ukupne debljine mukusa čini njegov spoljašnji sloj koji se jedini i obnavlja nakon sukcijske mukusa u

eksperimentalnim uslovima (Atuma i sar., 2001). Visok nivo akumulacije mukusa u debelom crevu je od ključnog značaja za obezbeđivanje pogodne životne sredine za komensalnu mikrofloru. Zdrav intestinalni epitel i njegov mukusni sloj imaju toleranciju na komensalne mikroorganizme jer poseduju sposobnost razlikovanja komensalne mikroflore od patogenih mikroorganizama na osnovu njihovog molekularnog obrazca (Kim i Ho, 2010). Intestinalna komensalna mikroflora zavisi od mukusnog sloja i nesvarenih ugljenih hidrata koji predstavljaju kako mesto za vezivanje tako i izvor energije za njihov rast i opstanak. Različiti oligosaharidi su evoluirali da omoguće simbiozu sa komensalnim mikroorganizmima i da izbegnu kolonizaciju i invaziju patogenih mikroorganizama (Lievin-Le Moal i Servin., 2006; Dharmani i sar., 2009). Komensalna mikroflora kao i produkti njihovog metabolizma utiču na sintezu i sekreciju mucina na nekoliko načina: direktnom aktivacijom, aktivacijom signalnih puteva ili preko bioaktivnih faktora sintetisanih od strane epitelnih ćelija ili ćelija lamine proprije (Kim i Ho, 2010).

Balans i stalna interakcija između mukusnog sloja, intestinalnih epitelih ćelija, mikroorganizama i imunog sistema domaćina su od esencijalnog značaja u očuvanju homeostaze debelog creva (Lievin-Le Moal i Servin., 2006; Dharmani i sar., 2009). Oštećena mukusna barijera će rezultirati poremećajem u intestinalnoj homeostazi što za posledicu ima povećanu permeabilnost epitela koja će dovesti do inflamacije i oštećenja peharastih ćelija (Lievin-Le Moal i Servin, 2006; McGuckin i sar., 2009). Na regulaciju sekrecije mukusa utiču brojni faktori, među njima: NO, prostaglandini, razni neurotransmiteri i hormoni (Plaisancie i sar., 1998), mikrobijalni produkti, toksini, citokini, faktori rasta (Kim i Ho, 2010). Na konformaciju mucina utiče i pH vrednost, utvrđeno je da pri niskim pH vrednostima dolazi do odvajanja nekih hidrofилnih domena unutar mucina, što kao posledicu ima promenu u naelektrisanju samog molekula mucina (Bansil i Turner, 2006). Brojne studije su pokazale da dijetetski faktori, takođe, mogu uticati na broj peharastih ćelija kao i na količinu i heterogenost mucina (McCracken i sar., 1995; Sharma i sar., 1995; Moens i Veldhoen, 2011), a mogu dovesti i do promena u sekretornoj aktivnosti peharastih ćelija (Satchithanandam i sar., 1990).

Kvalitativne i kvantitativne promene u ekspresiji ili sekreciji mucina mogu uticati na efikasnost mukusne barijere što može dovesti do značajnih fizioloških i patoloških posledica po organizam (Corfield i sar., 2000). Fizičke karakteristike mucina (posedovanje hidrofobnih i hidrofилnih regiona) kao i širok dijapazon interakcija (sposobnost građenja vodoničnih i elektrostatičkih veza) sa drugim supstancama su u direktnoj vezi sa njihovom fiziološkom funkcijom u zdravom i bolesnom kolonu (Bansil i Turner, 2006).

Prema našim nalazima subhronični tretman AA je doveo do pada u zastupljenosti svih ispitivanih mucina. Tretman AA je izazvao smanjenje u sintezi MUC2 mucina, PAS-pozitivnih mucina, AB-pozitivnih mucina u donjem delu kripte, sijalo- i sulfomucina. Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da je AA uticao kako na proteinsku komponentu mucina tako i na glikane vezane za proteinsku osnovu.

MUC2 mucini kao najzastupljeniji sekretujućuci mucini u kolonu odgovorni su za formiranje dvoslojnog mukusnog sistema u debelom crevu (Johansson, 2010). Smanjena ekspresija MUC2 mucina zapažena je u subhroničnom i 24 h akutnom eksperimentu. Naši rezultati su pokazali da AA dovodi do promena u sekretornom mehanizmu peharastih ćelija izazivajući tako redukciju ekspresije MUC2 mucina. U odsustvu MUC2 mucin nema unutrašnjeg mukusnog sloja i bakterije mogu da dođu u kontakt sa crevnim epitelom (Johansson i Hansson, 2013). Značaj mukusne barijere je pokazan u studijama koje su se bavile istraživanjima na miševima bez MUC2 mucina, ti miševi su spontano razvijali inflamaciju (Van der Sluis i sar., 2006) i intestinalne tumore (Velcich i sar., 2002). Lan i sar. (2015) su pokazali da visoko-proteinska dijeta smanjuje broj MUC2 mucina i peharastih ćelija sa neutralnim mucinima u mukozi kolona što je slično kao u našem subhroničnom i 24 h akutnom eksperimentu.

Kod 72 h akutnog eksperimenta AA je izazvao povećanje MUC2 mucina kod više doze, dok je kod niže doze zastupljenost MUC2-pozitivnih peharastih ćelija bila ista kao i kod kontrolnih pacova. Povećana ekspresija MUC2 mucina zapažena je kod kolorektalnog kancera (Kim i sar., 1996).

Rezultati našeg eksperimenta su pokazali da subhronični tretman AA dovodi do povećane distribucije kiselih mucina u gornjem delu kripte i smanjene distribucije neutralnih mucina u donjem delu kripte. Od velikog značaja za homeostazu kolona je što je organizam uspeo da održi normalnu količinu kiselih mucina nakon tretmana AA i tako sačuva integritet zaštitnog mukusnog sloja. Pokazano je da kiseli mucini formiraju bolju zaštitnu barijeru protiv translokacije mikroorganizama u odnosu na neutralne mucine (Deplancke i Gaskins, 2001). Odnos neutralnih i kiselih mucina je, takođe, u padu kod tretiranih životinja u poređenju sa kontrolnim pacovima. Balans između kiselih i neutralnih mucina esencijalan je za odgovarajuću konzistenciju mukusa koja je neophodna za adekvatnu zaštitu intestinalnog epitela od mehaničkih povreda i mikroorganizama (Sharma i sar., 1995). AA je doveo do pada odnosa neutralnih i kiselih mucina što je posledica smanjene zastupljenosti peharastih ćelija sa neutralnim mucinima i povećane zastupljenosti peharastih ćelija sa kiselim mucinima kod AA tretiranih životinja u odnosu na kontrolne jedinke. U gastičnoj mukozi, kod AA tretiranih

pacova, primećene su slabo AB-pozitivne peharaste ćelije u vratnom regionu kao i prominentno AB-obojene peharaste ćelije u bazalnom delu gastričnih žlezdi (El-Mehi i El-Sherif, 2015). Autori predpostavljaju da su uočene AB-pozitivne peharaste ćelije u bazalnom delu gastričnih žleza ustvari bazalne ćelije koje su počele da sintetišu mucine da bi doprinele odbrambenom mehanizmu želuca protiv intoksikacije AA.

Na osnovu dinamike u produkciji mucina možemo zaključiti da AA utiče na proces maturacije peharastih ćelija u kriptama kolona. Tokom životnog ciklusa i maturacije peharastih ćelija mucini, koje ove ćelije izlučuju, menjaju karakter. U novonastalim peharastim ćelijama, u donjem delu kripte, mucini pokazuju sadržaj neutralnih mucina, a uporedo sa procesom migracije i maturacije mucini sazrevaju u pravcu sadržaja kiselih mucina karakterističnih za adultni tip ćelija (Anđelković i sar., 2001). Smanjena distribucija peharastih ćelija sa neutralnim mucinima ukazuje na veću zrelost mucina u kolonu tretiranih jedinki imajući u vidu da AA može povećati potencijal deobe peharastih ćelija. Pokazano je da AA signifikantno smanjuje broj proliferišućih ćelija kao i broj ćelijskih mitozu u epitelu kripte tankog creva, dok se broj apoptotičkih ćelija povećava pod uticajem AA (Dobrowolski i sar., 2012; Tomaszewska i sar., 2014).

Naš nalaz u vezi distribucije neutralnih i kiselih mucina u kolonu pacova tretiranih AA sličan je kao i u eksperimentu u kome je pacovima smanjen unos hrane za 50% (Schoffen i sar., 2014). U navedenom radu autori su zaključili da je smanjena količina peharastih ćelija sa neutralnim mucinima narušila zaštitnu ulogu mukusa što je omogućilo mikroorganizmima kontakt sa epitelom. To je dalje aktiviralo proces migracije imunih ćelija u laminu propriju kolona i dovelo do povećanja njenog volumena. Naši nalazi su u potpunosti u skladu sa nalazima navedenih autora, tako da možemo izvesti zaključak da je do infiltracije limfocita u laminu propriju došlo usled smanjene distribucije peharastih ćelija sa neutralnim mucinima pod uticajem subhroničnog tretmana AA.

Za razliku od subhroničnog tretmana u oba akutna eksperimenta, u donjem delu kripte količina neutralnih mucina se povećala dok su kiseli mucini varirali u odnosu na aplikovanu dozu AA. 24 h nakon aplikacije AA došlo je do povećanja odnosa neutralnih i kiselih mucina, dok se posle 72 h taj odnos u gornjem delu kripte smanjio a u donjem delu kripte je varirao u zavisnosti od doze AA. Možemo zaključiti da jedna doza AA dovodi od ubrzane diferencijacije peharastih ćelija što je u suprotnosti sa efektima dugotrajnog izlaganja epitela kolona delovanju AA.

Okuyama i sar. (1998) su kvantifikovali promene u sadržaju fosfolipida u mukusu tankog creva zečeva od rođenja do 28 dana života. Zaključak navedene studije je da sadržaj

fosfolipida u mukusu progresivno raste sa uzrastom zečeva. Tek sa 28 dana starosti zečevi su imali isti sadržaj fosfolipida kao i odrasle jedinke. Dokazano je da mlade jedinke imaju povećanu intestinalnu permeabilnost za makromolekule i visok stepen traslokacije bakterija u odnosu na adultne jedinke (Udall i sar., 1981). Obe ove odlike mladih životinja opadaju tokom prvog meseca života nakon čega se izjednačavaju sa vrednostima za odrasle jedinke. S obzirom da se navedene promene dešavaju tokom istog životnog doba predpostavlja se da promene u fosfolipidima utiču na proces maturacije zaštitnog mukusnog sloja u crevima (Okuyama i sar., 1998). Sva tri naša eksperimenta su počela 23. PND u vreme kada još uvek nije postignuta kompletna maturacija mukusnog sloja, a akutni eksperimenti su i završeni pre maturacije mukusa.

Ugljenohidratni deo mucina je determinisan ekspresijom specifičnih glikozil transferaza, što znači da je glikozilacija genetski uslovljena. Faktori sredine mogu uticati na ekspresiju transferaza i tako modulisati glikozilaciju mucina (Linden i sar., 2008). Ovaj strukturni diverzitet mucina omogućava organizmu da se bori sa različitim i promenljivim patogenima. Takođe, nivo ekspresije MUC gena i stepen glikozilacije mucina karakteriše varijabilnost zaštitne uloge mucina.

Prathima i Harendra-Kumar (2012) su analizirali zastupljenost mucina u gornjem delu gastrointestinalnog trakta i došli su do nalaza da je količina miks mucina bila povećana kod lezija ezofagusa, a miks i neutralnih mucina u neoplazijama želuca i duodenuma. Navedeni nalazi su slični kao u našem 24 h akutnom eksperimentu.

U našem tretmanu je došlo generalno do pada vrednosti ispitivanih parametara nakon aplikacije AA. AA je doveo do smanjenja u debljini sve tri tunike kao i do smanjene zastupljenosti neutralnih mucina nakon subhroničnog eksperimenta. Naši nalazi su slični nalazima drugih autora koji su pratili pacove sa izmenjenim režimom ishrane ili poremećajima u ishrani usled dijabetesa (Schoffen i sar., 2014; Roldi i sar., 2009). Kod mladih pacova kojima je u hranu dodavano ovseno brašno došlo je do suprotnih efekata (Drzikova i sar., 2007) u odnosu na predhodno spomenute eksperimente. Ovseno brašno, a posebno mekike pravljene od tog brašna su uticale na poboljšanje zdravlja mukoze kolona ispitivanih životinja kao što je i očekivano. Tako je kod tih pacova došlo do povećanja volumena pojedinačnih lamina i tunika kao i volumena celog zida kolona. Upotreba ovsenog brašna tokom šest nedelja pozitivno je uticala i na broj peharastih ćelija povećavši broj peharastih ćelija sa kiselim mucinima i ukupni broj peharastih ćelija u epitelu. Navedeni tretman je, takođe, povećao broj mitotičkih ćelija i smanjio broj apoptotičkih ćelija. Imajući u vidu izgled zdrave mukoze pacova koji su bili sličnog uzrasta kao i životinje u našem

eksperimentu jasniji nam je šetan uticaj AA na zid kolona kao i na peharaste ćelije epitela kolona.

Dobrowolski i sar. (2012) su pokazali da je nakon hroničnog tretmana AA došlo do signifikantnog smanjenja apsorptivne površine tankog creva kod miševa. Takođe, u istom eksperimentu AA je uticao na morfologiju kripti koje predstavljaju metabolički najaktivniji deo creva. Slično je pokazalo i istraživanje koje su sprovedeli Tomaszewska i sar. (2014) u kome je AA doveo do pada u broju peharastih ćelija i broju intaktnih resica, dok je broj oštećenih resica bio veći što je rezultiralo smanjenjem apsorptivne površine duodenuma. U istom eksperimentu, u jejunumu, došlo je do povećanja broja peharastih ćelija pod uticajem AA, ali se apsorptivna površina smanjila kao i u duodenumu.

El-Mehi i El-Sherif (2015) su pokazali da AA izaziva morfološke promene u gastričnoj mukozi u vidu deskvamacije i erozije površinskog epitela i vaskularne opstrukcije. U okviru istog eksperimenta AA je signifikantno povećao nivo antioksidativnih markera kao i markera apoptoze u gastričnoj mukozi ispitivanih pacova. Prema navedenim autorima glavni uzrok alteracija u gastričnoj mukozi, u njihovom eksperimentu, je oksidativni stres. Sadek i sar. (2012) su, takođe, došli do zaključka da AA dovodi do rasta lipidne peroksidacije u gastričnoj mukozi kao i do povećane potrošnje antioksidativnih enzima za odbranu od slobodnih radikala indukovanih prisustvom AA u tkivu. Oksidativni stres je detektovan i kod Caco-2 ćelijske kulture kao posledica aplikacije AA (Rodriguez-Ramiro i sar., 2011; Chen i sar., 2016). Pokazano je da AA dovodi do povećanja lipidne peroksidacije i smanjenja antioksidativnih parametara u tkivu tankog u debelog creva remeteći tako oksidativni/antioksidativni balans u tkivu što za rezultat ima pojavu oksidativnog stresa u ćelijama (Altinoz i sar., 2015; Erdemli i sar., 2015). S obzirom da je u našem subhroničnom i 24 h akutnom eksperimentu došlo je do smanjene ekspresije MUC2 mucina možemo pretpostaviti da je AA izazvao oksidativni stres u peharastim ćelijama kolona i tako poremetio normalni ćelijski signaling.

Histološka i statistička analiza u našem radu pokazala je da AA dovodi do promena u distribuciji i zastupljenosti sulfo- i sijalomucina u kolonu juvenilnih pacova nakon subhroničnog i oba akutna tretmana. Deplancke i Gaskins (2001) su evaluirali obrazac ekspresije kiselih mucina na eksperimentalnom modelu diverzionog kolitisa i došli su do sličnih nalaza kao i mi. Pokazali su da su sulfomucini prisutni u gornjem delu kripe, dok su sijalomucini predominantni u donjem delu kripe. Isti raspored sulfo- i sijalomucina potvrđen je i kod miševa koji su hranjeni hranom sa visokim procentom masti (Mastrodonato i sar.,

2014). Promene u količini sulfo- i sijalomucina primećene su kod inflamatornih bolesti creva kao i kod kolorektalnog kancera (Corfield i sar., 1999).

Mucini su negativno naelektrisani zahvaljujući prisustvu sulfatnih grupa i sijalinskih kiselina (Allen i sar., 1998). Ukoliko dođe do odvajanja ovih negativno naelektrisanih monosaharida od oligosaharidnog lanca koji ulazi u sastav mucina doći će do gubitka negativnog naelektrisanja sekretovanih mucina što se dovodi u vezu sa kolorektalnim obolenjima (Corfield i sar., 2000). U našem subhroničnom eksperimentu, u donjem delu kriptе, peharaste ćelije sa sulfomucinima nisu evidentirane što je rezultiralo dominacijom sijalomucina. Odsustvo sulfomucina je primećeno i nakon 72 h akutnog eksperimenta i to u donjem delu kriptе kod kontrolnih pacova i jedinki tretiranih sa 50mg/kg AA. Odnos sulfo- i sijalomucina je opao nakon subhroničnog i 24 h akutnog eksperimenta, dok se nakon 72 h akutnog eksperimenta spomenuti odnos povećao. Kod oba naša akutna eksperimenta histološkom analizom uzoraka je uočena velika varijabilnost u zastupljenosti sulfo- i sijalomucina kod jedinki u okviru iste eksperimentalne grupe. Tako je kod nekih životinja bila izražena dominacija sulfomucina sa ponekom peharastom ćelijom sa sijalomucinima, a kod drugih jedinki dominantno su bile zastupljene peharaste ćelije sa sijalomucinimima. Yusuf i sar. (2005) su došli do nalaza da zaštita gastrične mukoze od destruktivnih agenasa zavisi od integriteta sijalinske kiseline koja ulazi u sastav mucina i da desijalinizacija mucina može dovesti do degradacije mukusa pa tako i do narušavanja mukusne barijere u želucu. Postoje i suprotni nalazi na osnovu kojih sulfomucini imaju važnu ulogu u održavanju normalne fiziološke funkcije kolona jer su, za razliku od sijalomucina, manje degradabilni od strane bakterijskih glikozidaza i proteaza domaćina (Deplancke i Gaskins, 2001). Redukcija sulfomucina u kolonu (Corfield i sar., 1992) i rektumu (Dawson i sar., 2009) karakteristična je za ulcerativni kolitis i inflamatorne crevne bolesti (Raouf i sar., 1992) kod ljudi. Grupa japanskih naučnika (Tobisawa i sar., 2010; Kawashima, 2012) pokazala je da sulfatacija mucina ima zaštitnu funkciju u eksperimentalnom kolitisu kod miševa. Njihov nalaz ukazuje na smanjenu infiltraciju limfocita u eksperimentalnom kolitisu kod kontrolnih miševa za razliku od miševa koji nemaju sulfotransferazu (GlcNAc6ST-2) koja je ključna u biosintezi sulfomucina kod miševa. Fu i sar. (2011) su pokazali da su O-vezani glikani esencijalni za eksperisiju i sekretujućih i membranskih mucina pa tako i za integritet mukusnog sloja, samim tim gubitak ovih glikana utiče na ekspresiju i funkciju intestinalnih mucina. Njihovi rezultati pokazuju da gubitak O-glikana usled poremećaja u glikozilaciji dovodi do smanjene količine sekretovanih mucina kao i do promena u unutrašnjem sloju mukusne barijere. Navedene promene omogućavaju mikroorganizmima kontakt sa intestinalnim epitelom što

vremenom dovodi do nastanka spontanog kolitisa kod miševa. Poremećaj u glikozilaciji mucina dovodi do jednako ozbiljnih komplikacija u kolonu kao i kod životinja koje su bile potpuno lišene MUC2 mucina (Fu i sar., 2011). Alteracije u glikozilaciji proteinskog jezgra mucina, u vidu odsecanja delova oligosaharidnih lanaca, zabeležene su i kod kolorektalnog kancera (Kim i Ho, 2010).

Rezultati oba naša akutna eksperimenta pokazuju smanjenje u broju peharastih ćelija, bojenih PAS-AB i HID-AB metodom, u gornjem delu kripte kod više doze AA što je najverovatnije posledica egzocitoze mucina iz peharastih ćelija. Povećana sekrecija mucina zabeležena je u gastričnoj mukozi nakon njenog izlaganja AA (El-Mehi i El-Sherif, 2015). Masivna egzocitoza mucina predstavlja vid zaštite, odnosno prvu liniju odbrane od unetog štetnog agensa i pokušaj organizma da očuva integritet mukusne barijere (Specian i Oliver, 1991; Linden i sar., 2008). Peharaste ćelije u gornjem delu kripte kao i mucini uskladišteni u njima predstavljaju važan faktor u zaštiti epitela, u slučaju oštećenja mukusnog sloja ti mucini mogu biti momentalno oslobođeni i tako reparirati oštećenje i sprečiti da mikroorganizmi i drugi štetni agensi dođu u kontakt sa intestinalnim epitelom. Mucini u gornjem delu kripte imaju značajniju ulogu u posredovanju u interakcijama između domaćina i mikroorganizama, dok su promene u hemotipovima mucina, koje su inicijalno izazvane bolešću, uočljivije u donjem delu kripte gde se nalaze manje diferencirane peharaste ćelije (Croix i sar., 2011).

Grupa istraživača iz Brazila ispitivala je kvantitet neutralnih i kiselih mucina (Nonose i sar., 2009) kao i sulfo- i sijalomucina (Martinez i sar., 2010) u izazvanom diverzionom kolitisu kod pacova i došla do nalaza koji je sličan našim rezultatima. Njihovi eksperimenti su pokazali pad u količini svih ispitivanih mucina u nefunkcionalnim delovima kolona koji su bili bez crevnog sadržaja za razliku od delova kolona sa crevnim sadržajem.

Digestivni sistem predstavlja najveći imuni organ u telu, to je od izuzetnog značaja za održanje homeostaze organizma imajući u vidu da je on konstantno izložen materijama iz spoljašnje sredine. Reakcije mukoznog imunog sistema su generalno usmerene na toleranciju i imunosupresiju. Ukoliko neki štetni agens ipak probije fizičku i hemijsku barijeru aktivira se intestinalni imunitet kao poslednji mehanizam za očuvanje intestinalne homeostaze pre aktiviranja sistemskog imunog odgovora.

T limfociti imaju važnu ulogu u održanju tolerancije mukoznog imunog sistema. Limfociti u okviru lamine proprije su u stanju da utiču na proliferaciju i diferencijaciju epitelnih ćelija duž kripte sekretujući citokine i druge bioaktivne molekule, limfociti tako predstavljaju medijatore intercelularnih interakcija (Roda i sar., 2010). Takođe, i intraepitelni limfociti imaju ulogu u proliferaciji, diferencijaciji i homeostazi intestinalnih ćelija (Dahan i sar., 2007). Kerneis i sar.

(1997) su pokazali da limfociti iz Pajerovih ploča mogu da indukuju diferencijaciju Caco-2 ćelija u M ćelije što potvrđuje hipotezu o uticaju limfocita na diferencijaciju intestinalnog epitela. Dokazano je i na proteinskom i na molekularnom nivou da intraepitelni limfociti ekspresuju molekule tesnih, adherentnih i pukotinskih veza (Inagaki-Ohara i sar., 2005) i tako utiču na funkcionisanje intestinalne epitelne barijere.

S obzirom da eozinofili učestvuju u održavanju integriteta gastrointestinalnog tkiva promene u broju eozinofila dovode do promena u mukusnom sloju i sastavu mikroflore kolona, pa tako i do narušavanja homeostaze mukoze (Chu i sar., 2014). Glavni bazni protein koji se oslobađa nakon aktivacije i degranulacije eozinofila utiče na sekreciju mucina i povećava permeabilnost intestinalnog epitela (Lamousé-Smith i Furuta, 2006) delujući na okludin, protein koji ulazi u sastav okludentnih veza između enterocita (Furuta i sar., 2005).

U homeostazi mastociti imaju regulatornu ulogu u odnosu na tkivu u kome se nalaze, dok u inflamaciji imaju ulogu u regulisanju imunog odgovora organizma. Oslobođanjem proinflamatornih medijatora mastociti iniciraju odgovor urođenog imuniteta što može dovesti do povećane epitelne sekrecije, do ubrzanih peristaltičkih pokreta creva ili alarmiranja enteričkog nervnog sistema u gastrointestinalnom traktu (Bischoff, 2009). Mastociti imaju i imunomodulatornu ulogu u epitelu, endotelu i nervnom sistemu (Da Silva i sar., 2014). Interakcija između mastocita i neurona doprinosi održanju intestinalne homeostaze jer se zahvaljujući njoj reguliše transport jona, vaskularna permeabilnost, sekrecija mukusa i gastrointestinalni motilitet (Van Nassauw i sar., 2007).

Histamin koji se oslobađa aktivacijom mastocita ima višestruku ulogu u funkcionisanju intestinalne barijere. Aktiviranjem histaminskih receptora u crevima dolazi do dilatacije krvnih sudova i povećanja njihove permeabilnosti, kontrakcije glatkih mišića i povećane produkcije mukusa od strane peharastih ćelija (Okumura i sar., 2003). Histamin deluje kao imunomodulator regulišući produkciju citokina od strane mnogih tipova imunih ćelija (Varadaradjalou i sar., 2003). Pored epitelnih ćelija histamin ostvaruje svoje dejstvo i na dendrične ćelije i T i B limfocite u mukozi creva modulišući tako imuni odgovor gastrointestinalnog sistema (Cherwinski i sar., 2005). Pokazano je da su proteaze oslobođene od strane mastocita tokom parazitskih infekcija odgovorne za povećanje epitelne paracelularne permeabilnosti kao i za redistribuciju ekspresije molekula koji učestvuju u formiranju tesnih veza između enterocita (Jeffery i Zhu, 2002; Wood, 2004; Chichlowski i sar., 2010). Neke studije su pokazale da povećana aktivnost gastrointestinalnih mastocita izaziva dijareju. Zaključeno je da dijareja predstavlja deo mukoznog odbrambenog mehanizma domaćina od mikroba, toksina i drugih štetnih supstanci (Bischoff, 2009).

Limfociti, mastociti i eozinofili su najzastupljenije ćelije koje ulaze u sastav GALT-a. Postoje brojni radovi koji govore o međusobnoj interakciji između ćelija mukoznog imuniteta. Kod inflamatornih bolesti creva pokazano je da mastociti i eozinofili interreaguju sa limfocitima što može uticati na enterički nervni sistem i funkciju glatkih mišića creva (Walker i sar., 2009). Mastociti i eozinofili su često kozavisni, mastociti indukuju migraciju eozinofila u mukoza što dovodi do njihove sopstvene aktivacije, proliferacije i degranulacije (Piliponsky i sar., 2001). Ovakav imuni odgovor može ostati lokalizovan samo na mukoza creva. Pokazano je da u mukozu creva eozinofili i mastociti komuniciraju sa T limfocitima (Walker i sar., 2009), a kod inflamatornih bolesti creva je dokazano postojanje tesne veze između mastocita i enteričkog nervnog sistema (Rijnierse i sar., 2007). Dominantni neurotransmiter enteričkog nervnog sistema je serotonin koji utiče na mišiće, sekreciju epitelnih i enterohromafnih ćelija i na vaskularni sistem (Mawe i sar., 2006). Serotonin je, takođe, i potentni hemoatraktant za eozinofile, a dovodi i do migracije mastocita (Boehme i sar., 2004). Eozinofili stimulišu aktivaciju T limfocita i degranulaciju mastocita što stimuliše kontrakcije glatke muskulature (Walker i sar., 2009). Mastociti promovišu nakupljanje T limfocita na mesto infekcije, a imaju i funkciju antigen prezentujućih ćelija i prezentuju antigene T limfocitima (Abraham i St John, 2010). Takođe, i T limfociti mogu modulisati aktivnost mastocita produkcijom određenih citokina koji dovode do degranulacije mastocita ili direktnim kontaktom sa mastocitima (Mekori i Metcalfe, 1999).

Postoji nekoliko radova koji se bave uticajem AA na broj limfocita iako je njegova imunotoksičnost odavno dokazana, dok uticaj AA na mastocite i eozinofile u tkivu kolona nije ispitivan. AA svoj toksični efekat na imuni sistem kod pacova ostvaruje tako što dovodi do povećanja težine slezine, timusa i metenteričnih limfnih čvorova (Zaidi i sar., 1994). Navedeni autori su zabeležili i smanjenu celularnost slezine, timusa i koštane srži pod uticajem AA, kao i signifikantno smanjenje broja cirkulišućih limfocita. Imunotoksičnost AA pokazali su i Yener i sar. (2013) u čijem eksperimentu je došlo do smanjenja broja cirkulišućih limfocita kao i do histopatoloških lezija u Pajerovim pločama ileuma. Svoj nalaz da AA dovodi do redukcije broja cirkulišućih limfocita autori su objasnili uticajem AA na mitotske deobe ćelija koštane srži. Dok su nalaz o smanjenju veličine Pajerovih ploča i regresije veličine njihovih germinativnih centara, kao i smanjen broj limfocita u Pajerovim pločama objasnili oralnom administracijom AA. Njihov zaključak je da je AA imao i sistemski i lokalni efekat na imuni sistem pacova. Fang i sar. (2014) su ispitivali imunotoksičnost AA na ženke miševa i došli su do zaključka da AA, u visokim dozama, ima toksičan efekat na celularni i humoralni imunitet. U njihovom eksperimentu AA je izazvao

pad telesne težine miševa, kao i smanjenje težine slezine i timusa. Kod svih grupa tretiranih AA zabeležen je pad u broju cirkulićućih limfocita. Histološke promene u vidu atrofije slezine, timusa i limfnih žlezda zapažene su kod najviše doze AA (36 mg/kg). Promene u mukoznoj membrani tankog creva i Pajеровim pločama ileuma nisu uočene ni u jednoj AA tretiranoj grupi miševa. Oni su zaključili da je AA toksičan za T limfocite, a da visoke doze AA ispoljavaju sistemsku toksičnost i mogu kompromitovati funkciju celokupnog imunog sistema.

Genotoksičnost AA je, takođe, predmet mnogih istraživanja. U *in vivo* istraživanjima je pokazano da AA izaziva DNK oštećenja na ćelijama koštane srži miševa (Alzahrani, 2011). Naučnici su došli do nalaza da je AA genotoksičan za humane limfocite jer izaziva oštećenja DNK, kao i da remeti proces obnove molekula DNK (Blasiak i sar., 2004). Ovaj nalaz su potvrdila i novija istraživanja. *In vitro* eksperiment izveden na kulturi humanih limfocita pokazao je da AA indukuje blagu razmenu sestrinskih hromatida (*sister chromatide exchange*, koristi se kao citogenetički marker i pokazatelj DNK oštećenja) i to samo pri veoma visokim dozama, dok glicidamid ima mnogo veći genotoksični potencijal i dovodi do znatnog povećanja razmene sestrinskih hromatida kod humanih limfocita (Pingarilho i sar., 2013).

U našem subhroničnom eksperimentu AA je izazvao pad u broju svih ispitivanih ćelija GALT-a. Došlo je do pada u broju eozinofila, mastocita i limfocita, sa izuzetkom intraepitelnih limfocita kod više doze AA. Zapaženo smanjenje broja imunih ćelija bilo je signifikantno jedino kod eozinofila i to u grupi pacova tretiranih višom dozom AA.

Efekat AA na imune ćelije u tkivu kolona je bio isti u oba akutna tretmana. Mastociti su na akutni tretman AA odreagovali isto kao i u subhroničnom tretmanu, u tretiranim grupama je došlo da pada u broju mastocita u odnosu na kontrolne jedinke. Izuzetak su bili HID-AB pozitivni mastociti u grupi životinja tretiranoj višom dozom AA nakon 72 h akutnog tretmana, njihov broj je bio skoro isti kao i kod kontrola. U oba akutna tretmana došlo je do nesignifikantnog povećanja broja eozinofila i limfocita u tkivu debelog creva pacova. 24 h akutni tretman je imao izraženije dejstvo kod niže nego kod više doze AA, s obzirom da je kod grupe tretirane sa 25 mg/kg AA došlo do većeg porasta u broju eozinofila i limfocita u lamini propriji nego u grupi tretiranoj višom dozom AA.

U rezultatima našeg eksperimenta primetna je razlika između subhroničnog i akutnog efekta AA na imune ćelije u tkivu kolona. Subhronični tretman AA je izazvao smanjenje broja limfocita, eozinofila i mastocita u debelom crevu pacova. Dobijeni nalaz se može objasniti potvrđenom imunotoksičnošću i genotoksičnošću AA (Zaidi i sar., 1994; Yener i sar., 2013; Fang i sar., 2014; Pingarilho i sar., 2013), kao i njegovim uticajem na ćelije koštane srži

(Zaidi i sar., 1994; Alzahrani, 2011). Naš subhronični tretman AA je mogao izazvati sistemsku toksičnost kao što je pokazano u eksperimentu koji su izveli Fang i sar., (2014) i tako uticati na ceo organizam, a posebno na mukozni i sistemski imuni sistem pacova. Za razliku od subhroničnog tretmana AA, akutni tretmani su kratko trajali da bi doveli do sistemskog odgovora mukoznog imunog sistema, ali je zato primećeno nakupljanje limfocita i eozinofila u kolonu tretiranih jedinki kao posledica tretmana.

Broj mastocita u vezivnom tkivu kolona bio je relativno mali, kretao se u rasponu od 0 do 15 ćelija po preseku debelog creva. S obzirom na mali broj mastocita tokom kvantifikacije nije vršena njihova podela na intaktne i degranulisane nego je obređen samo njihov apsolutni broj. U okviru naše laboratorije rađena su ispitivanja o uticaju AA na broj mastocita na neke druge organe pacova, na kožu i jetru. Pokazano je da je subhronični tretman AA u dozi od 25 mg/kg izazvao povećanje broja mastocita u koži, ali promene nisu bile signifikantne (Obuća, 2012). 24 h akutni tretman AA je kod niže doze doveo do signifikantnog povećanja broja mastocita u koži sa posebnim naglaskom na degranulisane mastocite (Bojović, 2012). Slični rezultati su dobijeni i kod više doze AA, volumenska i numerička gustina degranulisanih mastocita su se signifikantno povećale, dok se volumenka gustina intaktnih mastocita signifikantno smanjila u AA tretiranoj grupi (Kapetan, 2015). Tretman AA od 50 mg/kg je nakon subhroničnog izlaganja doveo do povećanja broja mastocita u vezivnom tkivu jetre, sa signifikantnim promenama u volumenu intaktnih mastocita (Kovac i sar., 2015). Rezultati dobijeni ispitivanjem uticaja AA na mastocite u vezivu debelog creva su u suprotnosti sa našim nalazima o efektu AA na broj mastocita u koži i jetri. Razlog smanjenja broja mastocita u kolonu pacova u subhroničnom i oba akutna tretmana može biti u njihovoj potpunoj degranulaciji pod uticajem AA. Naši nalazi su u korelaciji sa nalazima Bischoff i sar. (1996) čiji su rezultati pokazali da je kod inflamatornog obolenja creva došlo do smanjenja broja TB-pozitivnih mastocita, a imunohistohemijskom analizom je potvrđeno da je uzrok smanjenog broja mastocita bila njihova degranulacija. S obzirom na činjenicu da u okviru intestinalne mukoze postoji komunikacija između limfocita, eozinofila i mastocita (Walker i sar., 2009) možemo pretpostaviti da je degranulacija mastocita imala uticaja na nakupljanje limfocita i eozinofila nakon 24 h i 72 h akutnog tretmana AA.

Toluidin plavo je metoda bojenja koja se koristi za prikaz mastocita još od 19. veka (Rönberg i sar., 2012), a danas se upotrebljava za rutinsku demonstraciju mastocita u tkivu. Vezivanjem toluidin plavog za granule mastocita dolazi do metahromatske reakcije koja omogućava vizualizaciju ćelija. Granule mastocita sadrže brojne bioaktivne molekule, a neke od njih su: biogeni amini (histamin, serotonin), citokini, proteoglikani (heparin, hondroitin

sulfat) i brojne proteaze (himaza, triptaza, karboksipeptidaza) (Duelli i sar., 2009; Rönnberg i sar., 2012). Proteoglikani, koji se nalaze u mastocitima, se sastoje od malog proteinskog jezgra koje je izrazito sulfatisano, a samim tim i negativno naelektrisano (Duelli i sar., 2009). Proteoglikani mastocita sadrže brojne glikozaminoglikane, a na osnovu ponavljajućih jedinica disaharida, koji ulaze u sastav glikozaminoglikana, se određuje i klasa proteoglikana (Barrett i Pearce, 1991). Proteoglikani imaju veoma važnu ulogu u mastocitima, oni regulišu pakovanje i skladištenje sekretornih granula, a utiču i na njihovo oslobađanje (Rönnberg i sar., 2012). Uspešnost navedenih funkcija proteoglikana iz mastocita direktno zavisi od stepena sulfatacije i količine negativnog naelektrisanja (Duelli i sar., 2009). Prisustvo sulfatisanih glikozaminoglikana u mastocitima ukazuje na njihov afinitet za HID komponentu iz HID-AB metode bojenja. U našem radu mastociti su bojeni sa Toluidin plavim kao i sa HID-AB. Primećen je nešto veći broj HID-pozitivnih mastocita u odnosu na TB-pozitivne mastocite u okviru iste grupe. U prilog našim rezultatima ide nalaz Fletcher i Triantafyllou (2007) koji su na osnovu svojih ispitivanja različitih metoda bojenja za prikaz mastocita u mukoznim žlezdama lasice preporučili HID-AB metodu kao najpouzdaniju s obzirom na mali broj mastocita koji je tipičan za mukozna tkiva lasice. AA je imao isti efekat na HID-pozitivne i TB-pozitivne mastocite, došlo je do linearnog smanjenja broja mastocita u odnosu na aplikovanu dozu AA. Jedini izuzetak su bili HID-pozitivni mastociti u grupi tretiranoj sa višom dozom AA nakon 72 h akutnog tretmana, njihov broj je bio isti kao i kod kontrolnih životinja, dok je u istoj eksperimentalnoj grupi došlo do pada u broju TB-pozitivnih mastocita. Smanjen broj HID-pozitivnih mastocita može biti posledica dejstva AA na stepen sulfatacije proteoglikana u granulama mastocita, što je u korelaciji sa našim nalazima o uticaju AA na sulfomucine iz peharastih ćelija.

Intraepitelni limfociti predstavljaju prvu liniju odbrane u sklopu intestinalnog imuniteta i njihov broj je veći u tankom nego u debelom crevu (Fuell i sar., 2015). U kolonu intraepitelni limfociti prvenstveno imaju ulogu u stimulaciji reparacije oštećenog epitela (Born i sar., 2010), dok u tankom crevu doprinose integritetu tesnih međućelijskih veza ispoljavajući svoj efekat na fosforilaciju okludina (Dalton i sar., 2006). Kober i sar. (2014) su pokazali da odsustvo intraepitelnih limfocita kod miševa dovodi do alteracija u ekspresiji i glikozilaciji mucina, kao i do promena u broju peharastih ćelija, ali je mukusni sloj pti tome ostao intaktan. Autori su zaključili da promene u glikozilaciji mucina mogu dovesti do narušavanja mukusne barijere kao i do promena u sastavu i metabolizmu mikroflore kolona miševa. To ukazuje na značaj intraepitelnih limfocita u očuvanju intestinalnog epitela i u njihovoj zaštiti organizma od prodora mikroorganizama (Kober i sar., 2014; Fuell i sar., 2015). AA je u

našem eksperimentu izazvao smanjenje ukupnog broja peharastih ćelija, došlo je i do alteracija u sastavu i odnosu ispitivanih tipova mucina u peharastim ćelijama, dok je broj intraepitelnih limfocita bio povećan u oba akutna eksperimenta kao i kod više doze AA u subhroničnom eksperimentu. S obzirom na očuvanost generalne morfologije epitela kolona možemo pretpostaviti da je povećan broj intraepitelnih limfocita uspeo da održi homeostazu epitela. Pokazano je da keratinocitni faktor rasta koji sekretuju intraepitelni limfociti pozitivno utiče na dubinu kripti kao i na količinu mucina u peharastim ćelijama (Kober i sar., 2014), odnosno generalno doprinosi reparaciji intestinalnog epitela (Chen i sar., 2002).

AA u našem eksperimentu je, takođe, doveo i do povećanja broja limfocita u lamini propriji. Poznato je da postoji međusobna komunikacija između navedenih populacija limfocita u okviru intestinalne mukoze, pa tako intraepitelni limfociti prenose informacije limfocitima u lamini propriji i obrnuto (Dahan i sar., 2007; Dahan i sar., 2009). In vitro studije na humanim T limfocitima iz lamine proprije su pokazale da ovi limfociti, između ostalog, utiču i na povećanje broja intraepitelnih limfocita (MacDonald i Spencer, 1990). Dahan i sar. (2009) su pokazali da limfociti iz lamine proprije imaju važnu ulogu u diferencijaciji intestinalnih epitelih ćelija, kao i da je za tu ulogu ključna njihova komunikacija sa limfocitima iz epitela. Na osnovu svih navedenih činjenica možemo pretpostaviti da su i T limfociti iz lamine proprije imali uticaja na očuvanje integriteta epitela kolona tokom subhroničnog i akutnog tretmana AA.

Plaisancie i sar. (1998) su svojim eksperimentom dokazali da peharaste ćelije reaguju na medijatore produkovane od strane nerava, eneteroendokrinih ćelija i imunog sistema. Oni su, između ostalog, pokazali da neke komponente granula mastocita indukuju blago povećanje sekrecije mucina u kolonu, dok serotonin dovodi do potpune egzocitoze mucina što rezultira kavitacijom peharastih ćelija. U oba naša akutna eksperimenta AA je u grupama tretiranim višom dozom izazvao signifikantni pad u ukupnim mucinima, što je histološki bilo vidljivo kao smanjen broj peharastih ćelija u gornjem delu kripte. Moguće je da su mastociti inicirali potpunu egzocitozu mucina iz peharastih ćelija u gornjem delu kripti kolona AA tretiranih pacova.

U oba naša akutna eksperimenta AA je prouzrokovao povećanje broja eozinofila u mukozni kolona što je u korelaciji sa nalazima Nurullahoglu-Atalik i sar. (2013). Navedeni autori su ispitivali uticaj hroničnog efekta malih doza AA na mokraćnu bešiku. Njihov histopatološki nalaz je pokazao povećanje broja eozinofila u tretiranim grupama pacova u odnosu na kontrolne jedinice. Povećanje broja eozinofila je detektovano kod: pacijenata sa ulceroznim kolitisom (Lampinen i sar., 2005), eksperimentalnog kolitisa kod miševa (Masterson i sar.,

2015) i adenokarcinoma debelog creva (Peter i sar., 2015). Kod svih navedenih bolesti ustanovljeno je da eozinofili imaju protektivnu ulogu u tkivu. Eozinofili u gastrointestinalnom sistemu potpomažu remodelovanje tkiva i tako omogućavaju ponovno uspostavljanje narušene homeostaze tkiva tokom i nakon bolesti. Predpostavljamo da je nakupljanje eozinofila u kolonu nakon akutnih tretmana AA imalo ulogu u očuvanju homeostaze mukoze koja je bila narušena aplikacijom AA.

U našem subhroničnom i oba akutna eksperimenta eozinofili i limfociti su na isti način odreagovali na tretman AA što je pokazano i u nekim drugim uslovima. U akutnoj fazi astme pokazana je međusobna zavisnost između aktivacije limfocita i broja eozinofila (Kocak i sar., 2006). Međutim, u *in vivo* eksperimentima nije pronađen dokaz o postojanju direktne veze između ova dva tipa imunih ćelija, osim što je dokazana njihova kolokalizacija (Berek, 2016). *In vitro* studije su pokazale da glavni bazni protein koji se oslobađa degranulacijom eozinofila utiče na proliferaciju T i B limfocita što govori o njegovom mogućem uticaju na limfocite i u *in vivo* uslovima (Bystrom i sar., 2011). Navedeni podaci mogu objasniti rezultate dobijene u našim eksperimentima, odnosno isti odgovor limfocita i eozinofila na aplikaciju AA.

6. ZAKLJUČEK

Na osnovu histološke, semikvantitativne i stereološke analize uzoraka kolona prepubertalnih pacova soja Wistar tretiranih AA u subhroničnom i dva akutna tretmana mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Generalna morfologija zida debelog creva je ostala očuvana nakon subhroničnog tretmana AA, ali je stereološka analiza pokazala promene u volumenskoj njegovih gustini tunika i lamina. AA je izazvao povećanje volumenske gustine tunike mukoze i njenih lamina, dok se volumenska gustina tunike submukoze i tunike muskularis smanjila. Signifikantne promene su ustanovljene na lamini propriji (povećanje) i tunici submukozi (smanjenje), u obe AA tretirane grupe (25mg/kg i 50mg/kg). Sve navedene promene govore o negativnom uticaju AA na epitelnu, vezivnu i mišićnu komponentu zida kolona sa naglašenim štetnim efektom na vezivno tkivo debelog creva.
2. Histološka analiza je pokazala pad u broju peharastih ćelija kod životinja tretiranih sa AA u dozi od 50 mg/kg, dok je semikvantitativnom analizom potvrđen i pad u zastupljenosti skoro svih ispitivanih tipova mucina u obe tretirane grupe i oba ispitivana dela kriptе.
 - a. Subhronični tretman AA izazvao je promene u glikanskom sastavu mucina u vidu smanjenja sulfomucina, sijalomucina, neutralnih mucina i miks mucina, ali i povećanja zastupljenosti kiselih mucina u gornjem delu kriptе. U ovom eksperimentu ustanovljeno je i smanjenje zastupljenosti MUC2 mucina kod životinja tretiranih AA. U gornjem delu kriptе ove promene su bile statistički signifikantne, a kod više doze i u donjem delu kriptе.
 - b. 24 h akutni tretman AA je izazvao diskretnije promene u zastupljenosti neutralnih i kiselih mucina u odnosu na subhronični eksperiment, i one su takođe išle u pravcu smanjenja. Kod niže doze AA došlo je do povećanja u zastupljenosti sulfomucina, dok su promene na sijalomucinima bile u pravcu opadanja njihove zastupljenosti. Viša doza AA imala je veći efekat na MUC2 mucine, i ovaj tretman je uzrokovao njihovo signifikantno smanjenje u oba dela kriptе.
 - c. 72 h akutni tretman AA je doveo do povećanja zastupljenosti kiselih i miks mucina u donjem delu kriptе, u grupi tretiranoj višom dozom AA, dok su vrednosti kiselih mucina bili u padu u odnosu na kontrole. Kod sijalomucina je zapaženo signifikantno smanjenje njihove zastupljenosti. Ovaj eksperiment je

- doveo da diskretnih promena u zastupljenosti MUC2 mucina i to samo u grupi tretiranoj sa višom dozom AA.
- d. Histološka analiza je pokazala da su u oba akutna eksperimenta u tretmanu nižom dozom AA kod nekih životinja dominirali sulfomucini sa ponekom peharastom ćelijom sa sijalomucinima, dok su kod drugih jedinki, iz iste ekperimentalne grupe, dominantno bile zastupljene peharaste ćelije sa sijalomucinimima.
 - e. U vezi sa uticajem AA na mucine u peharastim ćelijama kolona možemo zaključiti da AA izaziva promene i na ugljenohidratnoj i na proteinskoj komponenti mucina nakon subhroničnog i akutnog tretmana, s tim što su promene bile najizraženije nakon subhroničnog eksperimenta, a najmanje izražene nakon 72 h akutnog eksperimenta.
3. Tretman AA je imao uticaj i na imune ćelije u tkivu kolona. Subhronični tretman AA je izazvao smanjenje broja limfocita, eozinofila, a kod akutnih tretmana je primećeno nakupljanje limfocita i eozinofila u lamini propriji kolona kod AA tretiranih jedinki. Broj mastocita u tunici submukozi debelog creva je u sva tri eksperimenta bio smanjen kod AA tretiranih grupa životinja u odnosu na kontrole.
- a. U subhroničnom eksperimentu AA je izazvao pad u broju svih ispitivanih ćelija GALT-a (eozinofili, mastociti i limfociti), sa izuzetkom intraepitelnih limfocita kod više doze AA. Međutim, zapaženo smanjenje bilo je signifikantno jedino kod eozinofila u grupi pacova tretiranih višom dozom AA.
 - b. Oba akutna tretmana AA imala su isti efekat na imune ćelije u tkivu kolona, uzrokovali su nesignifikantno povećanje broja eozinofila i limfocita i pad broja mastocita.
 - c. 24 h akutni tretman je imao izraženije dejstvo kod tretmana nižom nego višom dozom AA, s obzirom da je kod grupe tretirane sa 25 mg/kg AA došlo do većeg porasta u broju eozinofila i limfocita u lamini propriji kolona nego u grupi tretiranoj višom dozom AA.
 - d. U vezi sa efektom AA na ćelije imunog sistema u kolonu izvodimo zaključak da duže izlaganje AA može izazvati sistemsku toksičnost mukoznog imunog sistema kolona. Nakon akutnog izlaganja AA dolazi do nakupljanja imunih ćelija u mukozi i submukozi debelog creva, što je znak da AA i nakon jedne aplikacije biva prepoznat od strane organizma kao štetna supstanca.

4. Na osnovu svih naših rezultata zaključujemo da AA ne utiče na generalnu morfologiju zida kolona prepubertalnih pacova, ali dovodi do suptilnijih promena kako u volumenu tunika i lamina, tako i do promena u sadržaju i količini mucina u peharastim ćelijama. Nakon dužeg izlaganja AA ima imunosupresivno dejstvo, dok jedna doza AA alarmira imuni sistem i izaziva nakupljanje limfocita i eozinofila u epitelu i vezivu kolona tretiranih životinja.

7. LITERATURA

Abraham SN, St John AL. 2010. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 10(6):440-452.

Abramsson-Zetterberg L. 2003. The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *Mutat Res.* 535:215-222.

Adler ID, Reitmeir P, Schmöller R, Schriever-Schwemmer G. 1994. Dose response for heritable translocation induced by acrylamide in spermatids of mice. *Mutat Res.* 309:285-291.

Adler ID. 1990. Clastrogenic effects of acrylamide in different germ-cell stage of male mice. In: Allen J, Bridges B, Lyon M, Moses M, Russell L. (Ed). *Biology of mammalian germ cell mutagenesis.* Banbury Report. Vol. 3. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 115-131.

Allam AA, El-Ghareeb AW, Abdul-Hamid M, El-Bakery A, Gad M, Sabri M. 2010. Effect of prenatal and perinatal acrylamide on the biochemical and morphological changes in liver of developing albino rat *Arch Toxicol.* 84:129-141.

Allen A, Hutton DA, Pearson JP. 1998. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int J Biochem Cell Biol.* 30(7):797-801.

Altinoz E, Turkoz Y, Vardi N. 2015. The protective effect of N-acetylcysteine against acrylamide toxicity in liver and small and large intestine tissues. *Bratisl Lek Listy.* 116(4):252-258.

Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Sehirli AO, Demiralp E, Sener G, Omurtag GZ. 2012. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep.* 39(4):4589-4596.

Alzahrani HA. 2011. Protective effect of l-carnitine against acrylamide-induced DNA damage in somatic and germ cells of mice. *Saudi J Biol Sci.* 18(1):29-36.

Anderson RJ. 1982. Alterations in nerve and muscle compound action potentials after acute acrylamide administration. *Environ Health Perspect.* 44:153-157.

Anđelković Z, Somer Lj, Perovic M, Avramović V, Milenkova Lj, Kostovska N, Petrović A. 2001. *Histološka građa organa.* Bonafides. Niš.

Armstrong DJ. 2009. Food chemistry and U.S. food regulations. *J Agric Food Chem.* 57(18):8180-8186.

Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280(5):G922-929.

- Aureli F, Di Pasquale M, Lucchetti D, Aureli P, Coni E. 2007. An absorption study of dietary administered acrylamide in swine. *Food Chem Toxicol.* 45(7):1202-1209.
- Award ME, Abdel-Rahman MS, Hassan SA. 1998. Acrylamide toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol in vitro.* 12:699-704.
- Badžek S, Lesko-Kelović V, Pleština S, Prejac J, Majerović M, Augustin G. 2012. Unutarstanični signalni putevi u karcinogenezi kolorektalnog tumora. *Acta Chir Croat.* 9: 25-34.
- Bansil R, Turner BS. 2006. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 11:164-70.
- Barrett KE, Pearce FL. 1991. Heterogeneity of mast cells. In: Uvnäs B (ed). *Histamine and Histamine Antagonists.* Berlin. Springer Berlin, Heidelberg. p. 93-117.
- Baum M, Fauth E, Fritzen S, Herrmann A, Mertes P, Rudolphi M, Spormann T, Zankl H, Eisenbrand G, Bertow D. 2005. Acrylamide and glycidamide: approach towards risk assessment based on biomarker guided dosimetry of genotoxic/mutagenic effects in human blood. In: Friedman and Mottaram (Ed). *Chemistry and safety of acrylamide in food.* Springer.77-88.
- Berek C. 2016. Eosinophils: important players in humoral immunity. *Clin Exp Immunol.* 183(1):57-64.
- Bergmark E, Calleman CJ, He F, Costa LG. 1993. Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 120(1):45-54.
- Bergstrom KS, Xia L. 2013. Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Glycobiology.*23(9):1026-37.
- Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, Meier PN, Trautwein C, Cetin Y, Maschek H, Stolte M, Gebel M, Manns MP. 1996. Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology.* 28(1):1-13.
- Bischoff SC. 2009. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol.* 31(2):185-205.
- Blasiak J, Gloc E, Wozniak K, Czechowska A. 2004. Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. *Chem Biol Interact.* 149(2-3):137-149.
- Blumberg RS. 1998. Current concepts in mucosal immunity. II. One size fits all: nonclassical MHC molecules fulfill multiple roles in epithelial cell function. *Am J Physiol.* 274(2 Pt 1):G227-231.
- Boehme SA, Lio FM, Sikora L, Pandit TS, Lavrador K, Rao SP, Sriramarao P. 2004. Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin. *J Immunol.* 173(6):3599-3603.

- Boettcher MI, Angerer J. 2005. Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 824(1-2):283-294.
- Bojović V. 2012. Efekat akutnog tretmana akrilamidom na mastocite kože. Master rad. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet.
- Born WK, Yin Z, Hahn YS, Sun D, O'Brien RL. 2010. Analysis of gamma delta T cell functions in the mouse. *J Immunol.* 184(8):4055-4061.
- Bull R., Robinson M, Stober JA. 1984b. Carcinogenic activity of acrylamide in the skin and lung of Swiss-ICR mice. *Cancer Lett.* 24(2):209-212.
- Bull RJ, Robinson M, Laurie RD, Stoner GD, Greisiger E, Meier JR, Stober J. 1984a. Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice. *Cancer Res.* 44:107-111.
- Bystrom J, Amin K, Bishop-Bailey D. 2011. Analysing the eosinophil cationic protein--a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respir Res.* 12:10.
- Camacho L, Latendresse JR, Muskhelishvili L, Patton R, Bowyer JF, Thomas M, Doerge DR. 2012. Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of Fischer 344 rats. *Toxicol Lett.* 2012 Jun 1;211(2):135-43.
- 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.
- Carere A. 2006. Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review. *Ann Ist Super Sanita.* 42(2):144-155.
- Carmack SW, Lash RH, Gulizia JM, Genta RM. 2009. Lymphocytic disorders of the gastrointestinal tract: a review for the practicing pathologist. *Adv Anat Pathol.* 16(5):290-306.
- Catalgol B, Ozhan G, Alpertunga B. 2009. Acrylamide-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Hum Exp Toxicol.* 28(10):611-617.
- Cesta MF. 2006. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol.* 34(5):599-608.
- Chen W, Su H, Xu Z, Bao T, Zheng X. 2016. Protective effect of wild raspberry (*Rubus hirsutus* Thunb.) extract against acrylamide-induced oxidative damage is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem.* 196:943-52.
- Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. 2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(22):14338-14343.

Cheroutre H, Kronenberg M. 2005. Mucosal T lymphocytes--peacekeepers and warriors. *Springer Semin Immunopathol.* 27(2):147-165. Epub.

Cheroutre H. 2005. IELs: enforcing law and order in the court of the intestinal epithelium. *Immunol Rev.* 206:114-131.

Cherwinski HM, Murphy CA, Joyce BL, Bigler ME, Song YS, Zurawski SM, Moshrefi MM, Gorman DM, Miller KL, Zhang S, Sedgwick JD, Phillips JH. 2005. The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and human mast cell function. *J Immunol.* 174(3):1348-1356.

Chichlowski M, Westwood GS, Abraham SN, Hale LP. 2010. Role of mast cells in inflammatory bowel disease and inflammation-associated colorectal neoplasia in IL-10-deficient mice. *PLoS One.* 5(8):e12220.

Chu VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J, Zänker M, Arbach O, Kruglov A, Berek C. 2014. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity.* 40(4):582-593.

Cianferoni A, Spergel JM. 2015. Eosinophilic Esophagitis and Gastroenteritis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 15(9):58.

Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M. 2000. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut.* 47(4):589-94.

Corfield AP, Myerscough N, Warren BF, Durdey P, Paraskeva CSR, Schauer R. 1999. Reduction of sialic acid O-acetylation in human colonic mucins in the adenoma-carcinoma sequence. *Glycoconj J.* 16(6):307-17.

Corfield AP, Wagner SA, Clamp JR, Kriaris MS, Hoskins LC. 1992. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect Immun.* 60(10):3971-3978.

Corfield AP. 2015. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim Biophys Acta.* 1850(1):236-252.

Croix JA, Carbonero F, Nava GM, Russell M, Greenberg E, Gaskins HR. 2011. On the relationship between sialomucin and sulfomucin expression and hydrogenotrophic microbes in the human colonic mucosa. *PLoS One.* 6(9):e24447.

Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet.* 7(5):349-359.

Da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. 2014. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem.* 62(10):698-738.

Dahan S, Roth-Walter F, Arnaboldi P, Agarwal S, Mayer L. 2007. Epithelia: lymphocyte interactions in the gut. *Immunol Rev.* 215:243-253.

Dahan S, Roth-Walter F, Martin AP, Arnaboldi P, Mayer L. 2009. Lymphoepithelial interactions: a new paradigm. *Ann N Y Acad Sci.* 1165:323-326.

Dalton JE, Cruickshank SM, Egan CE, Mears R, Newton DJ, Andrew EM, Lawrence B, Howell G, Else KJ, Gubbels MJ, Striepen B, Smith JE, White SJ, Carding SR. 2006. Intraepithelial gammadelta+ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection. *Gastroenterology.* 131(3):818-829.

Dawson PA, Huxley S, Gardiner B, Tran T, McAuley JL, Grimmond S, McGuckin MA, Markovich D. 2009. Reduced mucin sulfonation and impaired intestinal barrier function in the hyposulfataemic NaS1 null mouse. *Gut.* 58(7):910-9.

De Sousa MV, Priolli DG, Portes AV, Cardinalli IA, Pereira JA, Martinez CAR. 2008. Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. *Acta Cir Bras.* 23:417-424.

Deplancke B, Gaskins HR. 2001. Microbial modulation of innate defense: Goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr.* 73(6):1131S – 1341S.

DeSesso JM, Jacobson CF. 2001. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol.* 39(3):209-228.

Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, Chadee K. 2009. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun.* 1:123-35.

Dobrowolski P, Huet P, Karlsson P, Eriksson S, Tomaszewska E, Gawron A, Pierzynowski SG. 2012. Potato fiber protects the small intestinal wall against the toxic influence of acrylamide. *Nutrition.* 28:428-435.

Dourson M, Hertzberg R, Allen B, Haber L, Parker A, Kroner O, Maier A, Kohrman M. 2008. Evidence-based dose-response assessment for thyroid tumorigenesis from acrylamide. *Regul Toxicol Pharmacol.* 52:264-289.

Drzikova B, Florian S, Dongowski G. 2007. Histological and immunohistological evaluation of colon of rats fed dietary fibre-rich oat-based diets. *Nutrition.* 31:445-453.

Duda-Chodak A, Wajda Ł, Tarko T, Sroka P, Satora P. 2016. A review of the interactions between acrylamide, microorganisms and food components. *Food Funct.* 7(3):1282-1295.

Duelli A, Rönnerberg E, Waern I, Ringvall M, Kolset SO, Pejler G. 2009. Mast cell differentiation and activation is closely linked to expression of genes coding for the serglycin proteoglycan core protein and a distinct set of chondroitin sulfate and heparin sulfotransferases. *J Immunol.* 183(11):7073-7083.

Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TL, 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.* 43:365-410.

- Dybing E, Sanner T. 2003. Risk assessment of acrylamide in foods. *Toxicol Sci.* 75(1):7-15.
- El-Mehi AE, El-Sherif NM. 2015. Influence of acrylamide on the gastric mucosa of adult albino rats and the possible protective role of rosemary. *Tissue Cell.* 47:273-283.
- Elmore SA. 2006. Enhanced histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol.* 34(5):687-696
- Erdemli ME, Doğan Z, Çiğremiş Y, Akgöz M, Altinöz E, Geçer M, Türköz Y. 2015. Amelioration of subchronic acrylamide toxicity in large intestine of rats by organic dried apricot intake. *Turk J Biol* 39:872-878.
- Erdemli ME, Dogan Z, Cigremis Y, Akgoz M, Altinoz E, Gecer M, Turkoz Y. 2015. Amelioration of subchronic acrylamide toxicity in large intestine of rats by organic dried apricot intake. *Turk J Biol.* 39:872-878.
- Eriksson S. 2005. Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology. Doctoral thesis. Sweden, Stockholm University, Department of Environmental Chemistry.
- Erkekoglu P, Baydar T. 2014. Acrylamide neurotoxicity. *Nutr Neurosci.* 17(2):49-57.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2015. Scientific Opinion on acrylamide in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA Journal.* 13(6):4104.
- Exon JH. 2006. A review of the toxicology of acrylamide. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 9:397-412.
- Fang J, Liang CL, Jia XD, Li N. 2014. Immunotoxicity of acrylamide in female BALB/c mice. *Biomed Environ Sci.* 27(6):401-409.
- Fasano A, Uzzau S. 1997. Modulation of intestinal tight junctions by zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model. *J Clin Invest.* 99(6):1158-1164.
- Filipe MI. 1975. Mucous secretion in rat colonic mucosa during carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. A morphological and histochemical study. *Br J Cancer.* 32(1):60-77.
- Fletcher D, Triantafyllou A. 2007. Mast cells in the salivary glands and tongue of the ferret: demonstration and some histochemical observations. *Anat Histol Embryol.* 36(1):38-42.
- Friedman M, Dulak L, Stedham A. 1995. A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam Appl Toxicol.* 27, 95-105.
- Friedman M, Mottram D, editors. 2005. Chemistry and safety of acrylamide in food. New York. Springer Science-HBBusiness Media.

Friedman M. 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agr. Food Chem.* 51:4504-4526.

Friedman M. 2015. Acrylamide: inhibition of formation in processed food and mitigation of toxicity in cells, animals, and humans. *Food Funct.* 6(6):1752-1772.

Friedman MA, Zeiger E, Marroni DE, Sickles DW. 2008. Inhibition of nuclear kinesins (kfp2; KIFC5A) by acrylamide as a basis for establishing a genotoxicity threshold. *J. Agric. Food Chem.* 56:6024–6030.

Fu J, Wei B, Wen T, Johansson ME, Liu X, Bradford E, Thomsson KA, McGee S, Mansour L, Tong M, McDaniel JM, Sferra TJ, Turner JR, Chen H, Hansson GC, Braun J, Xia L. 2011. Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest.* 121(4):1657-1666.

Fuell C, Kober OI, Hautefort I, Juge N. 2015. Mice deficient in intestinal $\gamma\delta$ intraepithelial lymphocytes display an altered intestinal O-glycan profile compared with wild-type littermates. *Glycobiology.* 25(1):42-54.

Fuhr U, Boettcher MI, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A, Taubert D, Tomalik-Scharte D, Pournara P, Jakob V, Harlfinger S, Klaassen T, Berkessel A, Angerer J, Sörgel F, Schömig E. 2006. Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15:266-271.

Furuta GT, Nieuwenhuis EE, Karhausen J, Gleich G, Blumberg RS, Lee JJ, Ackerman SJ. 2005. Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 289(5):G890-897.

Gao J, Zhao Y, Zhu F, Ma Y, Li X, Miao H, Wu Y. 2016. Dietary exposure of acrylamide from the fifth Chinese Total Diet Study. *Food Chem Toxicol.* 87:97-102.

Garey J, Paule MG. 2010. Effects of chronic oral acrylamide exposure on incremental repeated acquisition (learning) task performance in Fischer 344 rats. *Neurotoxicol Teratol.* 32:220-225.

Gebreselassie NG, Moorhead AR, Fabre V, Gagliardo LF, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA. 2012. Eosinophils preserve parasitic nematode larvae by regulating local immunity. *J Immunol.* 188(1):417-425.

Generoso WM, Segal GA, Lockhart AM, Hughes LA, Cain KT, Cacheiro NL, Shelby MD. 1996. Dominant lethal mutations, heritable translocations, and unscheduled DNA synthesis induced in male mouse germ cells by glycidamide, a metabolite of acrylamide. *Mutat Res.* 371(3-4):175-183.

Gold BG, Griffin JW, Price DL. 1992. Somatofugal axonal atrophy precedes development of axonal degeneration in acrylamide neuropathy. *Arch Toxicol.* 66:57-66.

Gonnella PA, Neutra MR. 1984. Membrane-bound and fluid-phase macromolecules enter separate prelysosomal compartments in absorptive cells of suckling rat ileum. *Cell Biol.* 99(3):909-917.

Gray H. 1974. *Anatomy, descriptive and surgical*. Pick TP, Howden R (ed). Running press. Philadelphia.

Gunawardene AR, Corfe BM, Staton CA. 2011. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int J Exp Pathol.* 92(4):219-231.

Hagmar L, Tornqvist M, Nordander C, Rosen I, Bruze M, Kautiainen A, Magnusson AL, Malmberg B, Aprea P, Granath F, Axmon A. 2001. Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand J Work Environ Health.* 27(4):219-226.

Hagmar L, Wirfalt E, Paulsson B, Tornqvist M. 2005. Differences in hemoglobin adduct levels of acrylamide in the general population with respect to dietary intake, smoking habits and gender. *Mutat Res.* 580:157-165.

Halbleib JM, Sääf AM, Brown PO, Nelson WJ. 2007. Transcriptional modulation of genes encoding structural characteristics of differentiating enterocytes during development of a polarized epithelium in vitro. *Mol Biol Cell.* 18(11):4261-78.

Hamzalıoğlu A, Gökmen V. 2015. Investigation of the reactions of acrylamide during in vitro multistep enzymatic digestion of thermally processed foods. *Food Funct.* 6:109-114.

Hays SM, Aylward LL. 2008. Biomonitoring Equivalents (BE) dossier for acrylamide (AA) (CAS No. 79-06-1). *Regul Toxicol Pharmacol.* 51(3 Suppl):S57-67.

Hazardous Substances Data Bank Hazardous (HSDB). 2003. Acrylamide. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~BLQYG9:1>.

He FS, Zhang SL, Wang HL, Li G, Zhang ZM, Li FL, Dong XM, Hu FR. 1989. Neurological and electroneuromyographic assessment of the adverse effects of acrylamide on occupationally exposed workers. *Scand. J. Work Environ. Health.* 15:125-129.

Hershberg RM, Cho DH, Youakim A, Bradley MB, Lee JS, Framson PE, Nepom GT. 1998. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest.* 102(4):792-803.

Heudorf U, Hartmann E, Angerer J. 2009. Acrylamide in children--exposure assessment via urinary acrylamide metabolites as biomarkers. *Int J Hyg Environ Health.* 212(2):135-141.

Hirvonen T, Kontto J, Jestoi M, Valsta L, Peltonen K, Pietinen P, Virtanen SM, Sinkko H, Kronberg-Kippilä C, Albanes D, Virtamo J. 2010. Dietary acrylamide intake and the risk of cancer among Finnish male smokers. *Cancer Causes Control.* 21(12):2223-2229.

Hogervorst JG, de Bruijn-Geraets D, Schouten LJ, van Engeland M, de Kok TM, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Weijnenberg MP. 2014. Dietary acrylamide intake and the risk of colorectal cancer with specific mutations in KRAS and APC. *Carcinogenesis*. 35(5):1032-1038.

Hogervorst JGF, Schouten LJ, Konings EJM, Golgbohm RA, van den Brandt PA. 2008. Dietary acrylamide intake is not associated with gastrointestinal cancer risk. *J Natur*. 138:2229-2236.

Humbles AA, Lu B, Friend DS, Okinaga S, Lora J, Al-Garawi A, Martin TR, Gerard NP, Gerard C. 2002. The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(3):1479-1484.

Inagaki-Ohara K, Sawaguchi A, Suganuma T, Matsuzaki G, Nawa Y. 2005. Intraepithelial lymphocytes express junctional molecules in murine small intestine. *Biochem Biophys Res Commun*. 331(4):977-983.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 1994. Some industrial chemicals. Acrylamide. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/mono60-16.pdf>.

International Programme on Chemical Safety (IPCS). 1985. Acrylamide Environmental Health Criteria 49. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc49.htm>.

Jeffery P, Zhu J. 2002. Mucin-producing elements and inflammatory cells. *Novartis Found Symp*. 248:51-68.

Ji K, Kang S, Lee G, Lee S, Jo A, Kwak K, Kim D, Kho D, Lee S, Kim S, Kim S, Hiuang YF, Wu KY, Choi K. 2013. Urinary levels of N-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)-cysteine (AAMA), an acrylamide metabolite, in Korean children and their association with food consumption. *Sci Total Environ*. 456-457:17-23.

JIFSAN/NCFST. 2002. Overview of Acrylamide Toxicity and Metabolism. JIFSAN/NCFST Workshop on Acrylamide in Food. Toxicology and Metabolic Consequences Working Group.

Johansson MEV, Ambort D, Pelaseyed T, Schütte A, Gustafsson JK, Ermund A, Subramani DB, Holmén-Larsson JM, Thomsson KA, Bergström JH, van der Post S, Rodriguez-Piñeiro AM, Sjövall H, Bäckström M, Hansson GC. 2011. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci*. 68(22):3635-3641.

Johansson MEV, Hansson GC. 2013. Mucus and the goblet cell. *Dig Dis*. 31(0):305–309.

Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(39):15064-15069.

Johansson MEV. 2010. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes*. 1(1):51–4.

- Johansson MEV. 2012. Fast renewal of the distal colonic mucus layers by the surface goblet cells as measured by in vivo labeling of mucin glycoproteins. *PLoS One*. 7(7):e41009.
- Johnson KA, Gorzinski SJ, Bodner KM, Campbell RA, Wolf CH, Friedman MA, Mast RW. 1986. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 85:154-168.
- Jung Y, Rothenberg ME. 2014. Roles and regulation of gastrointestinal eosinophils in immunity and disease. *J Immunol*. 193(3):999-1005.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2005. *Osnovi histologije: tekst i atlas*. Data status. Beograd.
- Kapetan N. 2015. *Histološke karakteristike mastocita kože pacova izlaganih akutnom delovanju akrilamida*. Master rad. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet.
- Karam SM. 1999. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci*. 4:D286-298.
- Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, Yang VW, Kaestner KH. 2002. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development*. 129(11):2619-2628.
- Kawashima H. 2012. Roles of the gel-forming MUC2 mucin and its O-glycosylation in the protection against colitis and colorectal cancer. *Biol Pharm Bull*. 35(10):1637-41.
- Kernéis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. 1997. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science*. 277(5328):949-952.
- Kim YS, Gum J Jr, Brockhausen I. 1996. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J*. 13(5):693-707.
- Kim YS, Ho SB. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroent Rep*. 12(5):319-30.
- Knutton S, Limbrick AR, Robertson JD. 1974. Regular structures in membranes. I. Membranes in the endocytic complex of ileal epithelial cells. *J Cell Biol*. 62(3):679-694.
- Ko MH, Chen WP, Lin-Shiau SY, Hsieh ST. 1999. Age-dependent acrylamide neurotoxicity in mice: morphology, physiology, and function. *Exp Neurol*. 158:37-46.
- Kober OI, Ahl D, Pin C, Holm L, Carding SR, Juge N. 2014. $\gamma\delta$ T-cell-deficient mice show alterations in mucin expression, glycosylation, and goblet cells but maintain an intact mucus layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 306(7):G582-593.

Kocak AK, Bor O, Yildiz B, Erdogan L, Us T. 2006. T-lymphocyte activation and the levels of eosinophilic cationic protein and interleukin-5 in asthmatic children with acute exacerbation and effect of glucocorticoid treatment. *Allergy Asthma Proc.* 27(4):371-377.

Konings EJ, Hogervorst JG, van Rooij L, Schouten LJ, Sizoo EA, van Egmond HP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. 2010. Validation of a database on acrylamide for use in epidemiological studies. *Eur J Clin Nutr.* 64(5):534-540.

Kovac R., Rajković V., Koledin I., Matavulj M. 2015. Mast cell infiltration in the juvenile rat liver following acrylamide following acrylamide intoxication. Conference on Food Quality and Safety, Health and Nutrition – NUTRICON 2015, Skopje, Republic of Macedonia. Book of Abstracts p 116.

Koyama N, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Takashima Y, Hayashi M, Matsufuji H, Yamagata K, Masuda S, Kinae N, Honma M. 2006. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res.* 603:151-158.

Kucharzik T, Lügering N, Schmid KW, Schmidt MA, Stoll R, Domschke W. 1998. Human intestinal M cells exhibit enterocyte-like intermediate filaments. *Gut.* 42(1):54-62.

Kunisawa J, Takahashi I, Kiyono H. 2007. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol Rev.* 215:136-153.

Kvarnhammar AM, Cardell LO. 2012. Pattern-recognition receptors in human eosinophils. *Immunology.* 136(1):11-20.

Lahdetie J, Suutari A, Sjoblom T. 1994. The spermatid micronucleus test with the dissection technique detects the germ cell mutagenicity of acrylamide in rat meiotic cells. *Mutat Res.* 309:225-262.

Lakshmi D, Gopinath K, Jayanthi G, Anjum S, Prakash D, Sudhandiran G. 2012. Ameliorating effect of fish oil on acrylamide induced oxidative stress and neuronal apoptosis in cerebral cortex. *Neurochem Res.* 37(9):1859-1867.

Lalani EN, Williams R, Jayaram Y, Gilbert C, Chaudhary KS, Siu LS, Koumarianou A, Playford R, Stamp GW. 1999. Trefoil factor-2, human spasmolytic polypeptide, promotes branching morphogenesis in MCF-7 cells. *Lab Invest.* 79(5):537-546.

Lamousé-Smith ES, Furuta GT. 2006. Eosinophils in the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep.* 8(5):390-395.

Lampinen M, Rönnblom A, Amin K, Kristjansson G, Rorsman F, Sangfelt P, Säfsten B, Wagner M, Wanders A, Winqvist O, Carlson M. 2005. Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. *Gut.* 54(12):1714-1720.

Lan A, Andriamihaja M, Blouin JM, Liu X, Descatoire V, de Maredsous CD, Davila AM, Walker F, Tomé D, Blachier F. 2015. High-protein diet differently modifies intestinal

goblet cell characteristics and mucosal cytokine expression in ileum and colon. *J Nutr Biochem.* 26(1):91-8.

Lapadula DM, Bowe M, Carrington CD, Dulak L, Friedman M, Abou-Donia MB. 1989. In vitro binding of ¹⁴C acrylamide to neurofilamen and microtubule proteins of rats. *Brain Res.* 481:157-161.

Larsson SC, Akesson A, Bergkvist L, Wolk A. 2009. Dietary acrylamide intake and risk of colorectal cancer in a prospective cohort of men. *Eur J Cancer.* 45:513-516.

Lied GA, Milde AM, Nylund K, Mujic M, Grimstad T, Hausken T, Gilja OH. 2012. Increased wall thickness using ultrasonography is associated with inflammation in an animal model of experimental colitis. *Clin Exp Gastroenterol.* 5:195-201.

Liévin-Le Moal V, Servin AL. 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 19:315–337.

Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. 2008. Mucin in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.* 1(3):183–97.

Lingnert H, Grivas S, Jägerstad M, Skog K, Törnqvist M, Åman P. 2002. Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. *Scan J of Nutrition.* 46 (4):159–172

Lobley RW. 1991. The Enterocyte and its Brush Border. *Mol Path Gastro Inf.* 58:1-8.

LoPachin RM, Gavin T. 2008. Acrylamide-induced nerve terminal damage: relevance to neurotoxic and neurodegenerative mechanisms. *J Agric Food Chem.* 56:5994-6003.

LoPachin RM, Lehning EJ. 1994. Acrylamide-induced distal axon degeneration: a proposed mechanism of action. *Neurotoxicology.* 15:247-260.

LoPachin RM, Ross JF, Lehning EJ. 2002. Nerve terminals as the primary site of acrylamide action: A hypothesis. *Neurotoxicology.* 23:43–59.

Lu X, Zhao J, Gregersen H. 2005. Small intestinal morphometric and biomechanical changes during physiological growth in rats. *J Biomech.* 38:417–426.

Lujan-Barroso L, González CA, Slimani N, Obón-Santacana M, Ferrari P, Freisling H, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Racine A, Katzke V, Kühn T, Tjønneland A, Olsen A, Quirós JR, Sánchez-Cantalejo E, Amiano P, Navarro C, Barricarte A, Khaw KT, Wareham N, Travis RC, Trichopoulou A, Bamia C, Benetou V, Saieva C, Grioni S, Tumino R, Vineis P, Mattiello A, Bueno-de-Mesquita HB, Siersema PD, Numans ME, Peeters PH, Ericson U, Wirfält E, Sund M, Johansson M, Weiderpass E, Skeie G, Riboli E, Boeing H, Duell EJ. 2014. Dietary intake of acrylamide and esophageal cancer risk in the european prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *Cancer Causes Control.* 25(5):639-646.

- Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal immunol.* 6(4):666-77.
- MacDonald TT, Spencer J. 1990. The role of activated T cells in transformed intestinal mucosa. *Digestion.* 46 Suppl 2:290-296.
- Manjanatha MG, Aidoo A, Shelton SD, Bishop ME, McDaniel LP, Lyn-Cook LE, Doerge DR. 2006. Genotoxicity of acrylamide and its metabolite glycidamide administered in drinking water to male and female big blue mice. *Environ Mol Mutagen.* 47:6-17.
- Marsh GM, Lucas LJ, Youk AO, Schall LC. 1999. Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occup Environ Med.* 56:181-190.
- Marsh MN. 1971. Digestive-absorptive functions of the enterocyte. *Ann R Coll Surg Engl.* 48(6):356-368.
- Martinez CA, Nonose R, Spadari AP, Máximo FR, Priolli DG, Pereira JA, Margarido NF. 2010. Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. *Acta Cir Bras.* 25(3):231-240.
- Masterson JC, McNamee EN, Fillon SA, Hosford L, Harris R, Fernando SD, Jedlicka P, Iwamoto R, Jacobsen E, Protheroe C, Eltzschig HK, Colgan SP, Arita M, Lee JJ, Furuta GT. 2015. Eosinophil-mediated signalling attenuates inflammatory responses in experimental colitis. *Gut.* 64(8):1236-1247.
- Mastrodonato M, Mentino D, Portincasa P, Calamita G, Liquori GE, Ferri D. 2014. High-fat diet alters the oligosaccharide chains of colon mucins in mice. *Histochem Cell Biol.* 142(4):449-459.
- Mawe GM, Coates MD, Moses PL. 2006. Review article: intestinal serotonin signalling in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 23(8):1067-1076.
- Mayer L. 2003. Mucosal immunity. *Pediatrics.* 111(6 Pt 3):1595-1600.
- McAdam K, Kimpton H, Vas C, Rushforth D, Porter A, Rodu B. 2015. The acrylamide content of smokeless tobacco products. *Chem Cent J.* 9:56.
- McCauley HA, Guasch G. 2015. Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends Mol Med.* 21(8):492-503.
- McCauley HA, Guasch G. 2015. Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends Mol Med.* 2015 Aug;21(8):492-503.
- McCracken BA, Gaskins HR, Ruwe-Kaiser PJ, Klasing KC, Jewell DE. 1995. Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning. *J Nutr.* 125(11):2838-45.

- McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, Newberry RD, Miller MJ. 2012. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103⁺ dendritic cells in the small intestine. *Nature*. 483(7389):345-349.
- McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G. 2009. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 15:100–113.
- McKay DM, Baird AW. 1999. Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut*. 44(2):283-289.
- Mekori YA, Metcalfe DD. 1999. Mast cell-T cell interactions. *J Allergy Clin Immunol*. 104(3 Pt 1):517-523.
- Miller H, Zhang J, Kuolee R, Patel GB, Chen W. 2007. Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J Gastroenterol*. 13(10):1477-86.
- Mishra A, Hogan SP, Lee JJ, Foster PS, Rothenberg ME. 1999. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J Clin Invest*. 103(12):1719-1727.
- Mishra A, Wang M, Pemmaraju VR, Collins MH, Fulkerson PC, Abonia JP, Blanchard C, Putnam PE, Rothenberg ME. 2008. Esophageal remodeling develops as a consequence of tissue specific IL-5-induced eosinophilia. *Gastroenterology*. 134(1):204-214.
- Moens E, Veldhoen M. 2012. Epithelial barrier biology: good fences make good neighbours. *Immunology*. 135(1):1-8.
- Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. 2001. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci*. 6:D1192-206.
- Montagne L, Crévieu-Gabriel I, Toullec R, Lallès JP. 2003. Influence of dietary protein level and source on the course of protein digestion along the small intestine of the veal calf. *J Dairy Sci*. 86(3):934-943.
- Mucci LA, Adami HO, Wolk A. 2006. Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. *Int J Cancer*. 118:169-173.
- Mucci LA, Dickman PW, Steineck G, Adami HO, Augustsson K. 2003. Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: Absence of an association in a population-based study in Sweden. *Br J Cancer*. 88:84-89.
- Mucci LA, Lindblad P, Steineck G, Adami HO. 2004. Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer. *Int J Cancer*. 109:774–776.
- Mucci LA, Sandin S, Balter K, Adami HO, Magnusson C, Weiderpass E. 2005. Acrylamide intake and breast cancer risk in Swedish women. *JAMA*. 293:1326–1327.
- Mucci LA, Wilson KM. 2008. Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *J Agric Food Chem*. 56:6013-6019.

National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS). 2002. Acrylamide.

https://www.nicnas.gov.au/data/assets/pdf_file/0019/4384/PEC_23_Acrylamide_Full_Report_PDF.pdf

Nicoletti C. 2000. Unsolved mysteries of intestinal M cells. *Gut*.47(5):735-739.

Noah TK, Donahue B, Shroyer NF. 2011. Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res*. 317(19):2702-2710.

Nonose R, Spadari AP, Priolli DG, Máximo FR, Pereira JA, Martinez CA. 2009. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream in rats. *Acta Cir Bras*. 24(4):267-275.

Nurullahoglu-Atalik E, Okudan N, Belviranlı M, Esen H, Yener Y, Celik I. 2013. Responses of acrylamide-treated rat bladders. *Bratisl Lek Listy*. 114(1):7-11.

Obón-Santacana M, Peeters PH, Freisling H, Dossus L, Clavel-Chapelon F, Baglietto L, Schock H, Fort-ner RT, Boeing H, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Menéndez V, Sanchez MJ, Larrañaga N, Huerta Castaño JM, Barricarte A, Khaw KT, Wareham N, Travis RC, Merritt MA, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Orfanos P, Masala G, Sieri S, Tumino R, Vineis P, Mattiello A, Bueno-de-Mesquita HB, Onland-Moret NC, Wirfält E, Stocks T, Idahl A, Lundin E, Skeie G, Gram IT, Wei-derpass E, Riboli E, Duell EJ. 2015. Dietary Intake of Acrylamide and Epithelial Ovarian Cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 24(1):291-297.

Obuća M. 2012. Efekat subhroničnog tretmana akrilamidom na mastocyte kože. Master rad. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet.

Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H, Okayama Y. 2003. Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcεRI. *Blood*. 102(7):2547-2554.

Okuyama H, Urao M, Lee D, Abe A, Drongowski RA, Harmon CM, Coran AG. 1998. Changes, with age, in the phospholipid content of the intestinal mucus layer of the newborn rabbit. *J Pediatr Surg*.33(1):35-38.

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.

Olstørn HB, Paulsen JE, Alexander J. 2007. Effects of perinatal exposure to acrylamide and glycidamide on intestinal tumorigenesis in Min/+ mice and their wild-type litter mates. *Anticancer Res*. 27(6B):3855-3864.

Ostanin DV, Brown CM, Gray L, Bharwani S, Grisham MB. 2010. Evaluation of the immunoregulatory activity of intraepithelial lymphocytes in a mouse model of chronic intestinal inflammation. *Int Immunol*. 22(12):927-939.

- Owen RL, Piazza AJ, Ermak TH. 1991. Ultrastructural and cytoarchitectural features of lymphoreticular organs in the colon and rectum of adult BALB/c mice. *Am J Anat.* 190(1):10-18.
- Pacchierotti F, Tiveron C, D'Archivio M, Bassani B, Cordelli E, Leter G, Spano M. 1994. Acrylamide-induced achromosomal damage in male mouse germ cells detected by cytogenetic analysis of one-cell zygotes. *Mutat Res.* 309:273-284.
- Parzefall W, 2008. Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food Chem Toxicol.* 46:1360–1364.
- Pearson JP, Brownlee IA. 2010. The interaction of large bowel microflora with the colonic mucus barrier. *Int J Inflam.* 2010:321426.
- Pelucchi C, Bosetti C, Galeone C, La Vecchia C. 2015. Dietary acrylamide and cancer risk: an updated meta-analysis. *Int J Cancer.* 136(12):2912-22.
- Pelucchi C, Galeone C, Levi F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Bosetti C, Giacosa A, La Vecchia C. 2006. Dietary acrylamide and human cancer. *Int J Cancer.* 118:467–471.
- Pennisi M, Malaguarnera 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.
- Peter CD, Shashidara R, Haragannavar VC, Samuel P, Sridhara SU, Gopalkrishna AH, Poojary S, Nayak SR, Sushanth AA. 2015. Assessment of tumour associated tissue eosinophilia (TATE) in oral squamous cell carcinoma using carbol chromotrope stain. *Int. J. Odontostomat.* 9(1):91-95.
- Philpott DJ, McKay DM, Mak W, Perdue MH, Sherman PM. 1998. Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced alterations in T84 epithelial permeability. *Infect Immun.* 66(4):1680-1687.
- Piliponsky AM, Pickholtz D, Gleich GJ, Levi-Schaffer F. 2001. Human eosinophils induce histamine release from antigen-activated rat peritoneal mast cells: a possible role for mast cells in late-phase allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 107(6):993-1000.
- Pingarilho M, Oliveira NG, Martins C, Gomes BC, Fernandes AS, Martins V, Labilloy A, de Lima JP, Rueff J, Gaspar JF. 2013. Induction of sister chromatid exchange by acrylamide and glycidamide in human lymphocytes: role of polymorphisms in detoxification and DNA-repair genes in the genotoxicity of glycidamide. *Mutat Res.* 752(1-2):1-7.
- Plaisancié P, Barcelo A, Moro F, Claustre J, Chayvialle JA, Cuber JC. 1998. Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am J Physiol.* 275(5 Pt 1):G1073-1084.

Plaisancié P, Barcelo A, Moro F, Claustre J, Chayvialle JA, Cuber JC. 1998. Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am J Physiol.* 275(5 Pt 1):G1073-1084.

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.

Prathima S, Harendra Kumar ML. 2012. Mucin profile of upper gastrointestinal tract lesions. *J Clin Biomed Sci.* 2 (4):185-191.

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:e73916.

Raju J, Sondagar C, Roberts J, Aziz SA, Caldwell D, Vavasour D, Mehta R. 2011. Dietary acrylamide does not increase colon aberrant crypt foci formation in male F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 49:1373-1380.

Rao DB, Jortner BS, Sills RC. 2014. Animal models of peripheral neuropathy due to environmental toxicants. *I. L. A. R. J.* 54:315–323.

Raouf AH, Tsai HH, Parker N, Hoffman J, Walker RJ, Rhodes JM. 1992. Sulphation of colonic and rectal mucin in inflammatory bowel disease: reduced sulphation of rectal mucus in ulcerative colitis. *Clin Sci (Lond).* 83(5):623-626.

Reber LL, Sibilano R, Mukai K, Galli SJ. 2015. Potential effector and immunoregulatory functions of mast cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 8(3):444-463.

Reséndiz-Albor AA, Esquivel R, López-Revilla R, Verdín L, Moreno-Fierros L. 2005. Striking phenotypic and functional differences in lamina propria lymphocytes from the large and small intestine of mice. *Life Sci.* 76(24):2783-2803.

Rijnierse A, Nijkamp FP, Kraneveld AD. 2007. Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacol Ther.* 116(2):207-235.

Roda G, Sartini A, Zambon E, Calafiore A, Marocchi M, Caponi A, Belluzzi A, Roda E. 2010. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 16:4264–4271.

Rodríguez-Ramiro I, Martín MÁ, Ramos S, Bravo L, Goya L. 2011a. Olive oil hydroxytyrosol reduces toxicity evoked by acrylamide in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. *Toxicology.* 288(1-3):43-48.

Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, Bravo L, Goya L, Martín MÁ. 2011b. 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.

Roldi LP, Pereira RVF, Tronchini EA, Rizo GV, Scoaris CR, Zanoni JN, Natali MRM. 2009. Vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation in diabetic rats: effects on the proximal colon. *BMC Gastroenterol.* 9:88.

Rönnerberg E, Melo FR, Pejler G. 2012. Mast cell proteoglycans. *J Histochem Cytochem.* 60(12):950-962.

Rothenberg ME. 2001. Gastrointestinal eosinophils. *Allergy.* 56 Suppl 67:139-155.

Russell L, Hunsicker PR, Cacheiro NL, Generoso WM. 1991. Induction of specific-locus mutations in male germ cells of the mouse by acrylamide monomer. *Mutat Res.* 262:101-107.

Sadek KM. 2012. Antioxidant and immunostimulant effect of carica papaya linn. Aqueous extract in acrylamide intoxicated rats. *Acta Inform Med.* 20(3):180-185.

Sakamoto J, Hashimoto K. 1986. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice; effects on fertility and sperm morphology. *Arch Toxicol.* 59:201-205.

Satchithanandam S, Vargofcak-Apker M, Calvert RJ, Leeds AR, Cassidy MM. 1990. Alteration of gastrointestinal mucin by fiber feeding in rats. *J Nutr.* 120(10):1179-84.

Schabacker J, Schwend T, Wink M. 2004. Reduction of acrylamide uptake by dietary proteins in a caco-2 gut model. *J Agric Food Chem.* 52(12):4021-4025.

Schettgen T, Kutting B, Hornig M, Beckmann MW, Weiss T, Drexler H, Angerer J. 2004. Trans-placental exposure of neonates to acrylamide-a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health.* 77:213-216.

Schettgen T, Weiss T, Drexler H, Angerer J. 2003. A first approach to estimate the internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany. *Int J Hyg Environ Health.* 206(1):9-14.

Schoffen JPF, Vicentini FA, Marcelino CG, Araujo EJA, Pedrosa MMD, Natali MRM. 2014. Food restriction beginning at lactation interferes with the cellular dynamics of the mucosa and colonic myenteric innervation in adult rats. *An Acad Cienc.* 86:1833-1847.

Seale SM, Feng Q, Agarwal AK, El-Alfy AT. 2012. Neurobehavioral and transcriptional effects of acrylamide in juvenile rats. *Pharmacol Biochem Behav* 101:77-84.

Sega GA, Alcota RP, Tancongco CP, Brimer PA. 1989. Acrylamide binding to the DNA and protamine of spermiogenic stages in the mouse and its relationship to genetic damage. *Mutat Res.* 216(4):221-230.

- 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.* 16:137-142.
- Segerback D, Calleman CJ, Schroeder JL, Costa LG, Faustman EM. 1995. Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl) guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of ¹⁴C acrylamide. *Carcinogenesis.* 16:1161-1165.
- Sharma R, Schumacher U, Ronaasen V, Coates M. 1995. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut.* 36(2):209-14.
- Shelby MD, Cain KT, Cornett CV, Generoso WM. 1987. Acrylamide: induction of heritable translocation in male mice. *Environ Mutagen.* 9(4):363-368.
- Shintoku Y, Kadosaka T, Kimura E, Takagi H, Kondo S, Itoh M. 2013. Intestinal mast cells and eosinophils in relation to *Strongyloides ratti* adult expulsion from the small and large intestines of rats. *Parasitology.* 140(5):626-631.
- Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, MacDonald N, Clewell H, Allen B, VanLandingham C. 2006. Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:481-608.
- Shiraishi Y. 1978. Chromosome aberrations induced by monomeric acrylamide in bone marrow and germ cells of mice. *Mutat Res.* 57:313-324.
- Sickles DW, Sperry AO, Testino A, Friedman M. 2007. Acrylamide effects on kinesin-related proteins of the mitotic/meiotic spindle. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222:111-121.
- Silva EM, Simon PW. 2005. Genetic, physiological, and environmental factors affecting acrylamide concentration in fried potato products. *Adv Exp Med Biol.* 561:371-386.
- Smith CJ, Perfetti TA, Mullens MA, Rodgman A, Doolittle DJ. 2000. "IARC group 2B Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem Toxicol.* 38(9):825-848.
- Snoeck V, Goddeeris B, Cox E. 2005. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* 7(7-8):997-1004.
- Solomon JJ, Fedyk J, Mukai F, Segal A. 1985. Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DMA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Res.* 45:3465-3470.
- Sorgel F, Weissenbacher R, Kinzig-Schippers M, Hofmann A, Illauer M, Skott A, Landersdorfer C. 2002. Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy.* 48:267-274.
- Specian RD, Oliver MG. 1991. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol.* 260(2 Pt 1):C183-193.

Spencer PS, Schaumburg HH. 1974a. A review of acrylamide neurotoxicity. Part I. Properties, uses and human exposure. *Can J Neurol Sci.* 1:151–169.

Spencer PS, Schaumburg HH. 1974b. A review of acrylamide neurotoxicity. Part II. Experimental animal neurotoxicity and pathologic mechanisms. *Can J Neurol Sci.* 1:170–192.

Sperandio B, Fischer N, Sansonetti PJ. 2015. Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies. *Semin Immunol.* 27(2):111-118.

Srivastava S, Sabri MI, Agrawal AK, Seth PK. 1986. Effects of single and repeated doses of acrylamide and bis-acrylamide on glutathione-S-transferase and dopamine receptors in rat brain. *Brain Res.* 371:319-323.

Stark A, Nyska A, Zuckerman A, Madar Z. 1995. Changes in intestinal tunica muscularis following dietary fiber feeding in rats. A morphometric study using image analysis. *Dig Dis Sci.* 40:960-966.

Stott-Miller M, Neuhouser ML, Stanford JL. 2013. Consumption of deep-fried foods and risk of prostate cancer. *Prostate.* 73(9):960-969.

Stringer AM, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Yeoh AS, Burns J, Keefe DM. 2007. Chemotherapy-induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA rat. *Exp Biol Med (Maywood).* 232(1):96-106.

Sumner SC, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzalez F, Ghanayem BI. 1999. Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem Res Toxicol.* 12:1110-1116.

Suzuki H. 2012. Age-dependent changes in intraepithelial lymphocytes (IELs) of the small intestine, cecum, and colon from young adult to aged mice. *Arch Gerontol Geriatr.* 55(2):261-270.

Tandrup T, Jakobsen J. 2002. Long-term acrylamide intoxication induces atrophy of dorsal root ganglion A-cells and of myelinated sensory axons. *J Neurocytol.* 31:79-87.

Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food. Chem.* 50, 4998–5006.

Taubert D, Glöckner R, Müller D, Schömig E. 2006. The garlic ingredient diallyl sulfide inhibits cytochrome P450 2E1 dependent bioactivation of acrylamide to glycidamide. *Toxicol Lett.* 164(1):1-5.

Tobisawa Y, Imai Y, Fukuda M, Kawashima H. 2010. Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice. *J Biol Chem.* 285(9):6750-6760.

Tomaszewska E, Dobrowolski P, Puzio I, Prost L, Kurlak P, Sawczuk P, Badzian B, Hulas-Stasiak M, Kostro K. 2014. Acrylamide-induced prenatal programming of intestine structure in guinea pig. *J Physiol Pharmacol.* 65:107–115.

Tran CP, Cook GA, Yeomans ND, Thim L, Giraud AS. 1999. Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. *Gut.* 44(5):636-642.

Tsuda H, Shimizu CS, Taketomi MK, Hasegawa MM, Hamada A, Kawata KM, Inui N. 1993. Acrylamide; induction of DNA damage, chromosomal aberrations and cell transformation without gene mutations. *Mutagenesis.* 8:23-29.

Tuohy KM, Hinton DJ, Davies SJ, Crabbe MJ, Gibson GR, Ames JM. 2006. Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota--implications for health. *Mol Nutr Food Res.* 50(9):847-857.

Tyl RW, Friedman MA. 2003. Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod Toxicol.* 17(1):1-13.

Tyl RW, Marr MC, Myers CB, Ross WP, Friedman MA. 2000. Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats. *Reprod Toxicol.* 14:147–157.

Udall JN, Pang K, Fritze L, Kleinman R, Walker WA. 1981. Development of gastrointestinal mucosal barrier. I. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr Res.* 15(3):241-244.

US Department of Health and Human services (HHS). 2011. Acrylamide. Report on Carcinogens. National Toxicology Program. 12th edition.

US EPA. 2010. Toxicological review of acrylamide. <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0286tr.pdf>.

Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, van Seuning I, Renes IB, Einerhand AWC. 2006. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology.* 131(1):117–29.

Van Ginneken C, Weyns A. 2004. A stereological evaluation of secretin and gastric inhibitory peptide-containing mucosal cells of the perinatal small intestine of the pig. *J Anat.* 205:267–275.

Van Nassauw L, Adriaensen D, Timmermans JP. 2007. The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci.* 133(1):91-103.

Varadaradjalou S, Féger F, Thieblemont N, Hamouda NB, Pleau JM, Dy M, Arock M. 2003. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur J Immunol.* 33(4):899-906.

Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L. 2002. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science*. 295(5560):1726–9.

Walker MM, Talley NJ, Prabhakar M, Pennaneac'h CJ, Aro P, Ronkainen J, Storskrubb T, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Agreus L. 2009. Duodenal mastocytosis, eosinophilia and intraepithelial lymphocytosis as possible disease markers in the irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther*. 29(7):765-773.

Wang H, Huang P, Lie T, Li J, Hutz RJ, Li K, Shi F. 2010. Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reprod Toxicol*. 29:225-230.

Weibel ER. 1979. *Stereological methods: vol. 1, Practical methods for biological morphometry*. Academic Press. New York.

Wikipedia. <http://en.wikipedia.org>

Wood JD. 2004. Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology*. 127(2):635-657.

Wouters MM, Vicario M, Santos J. 2016. The role of mast cells in functional GI disorders. *Gut*. 65(1):155-168.

Xichun Z, Min'ai Z. 2009. Protective role of dark soy sauce against acrylamide-induced neurotoxicity in rats by antioxidative activity. *Toxicol Mech Methods*. 19(5):369-374.

Xichun Z. 2009. Long-term exposure to various types of dietary fat modulates acrylamide-induced preneoplastic lesions of colon mucosa through Wnt/beta-catenin signaling in rats. *Toxicol Mech Methods*. 19:285-291.

Yang H, Lee S, Jin Y, Choi J, Han D, Chae C, Lee M, Han C. 2005. Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reprod Toxicol*. 19:527-534.

Yener Y, Dikmenli M. 2009. Increased micronucleus frequency in rat bone marrow after acrylamide treatment. *Food Chem Toxicol*. 47:2120-2123.

Yener Y, Sur E, Telatar T, Oznurlu Y. 2013. The effect of acrylamide on alpha-naphthyl acetate esterase enzyme in blood circulating lymphocytes and gut associated lymphoid tissues in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 65(1-2):143-146.

Yousef MI, El-Demerdash FM. 2006. Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology*. 219:133–141.

Yu S, Zhao X, Zhang T, Yu L, Li S, Cui N, Han X, Zhu Z, Xie K. 2005. Acrylamide-induced changes in the neurofilament protein of rat cerebrum fractions. *Neurochem Res*. 30(9):1079-1085.

Yusuf S, Nok AJ, Ameh DA, Adelaiye AB, Balogun EO. 2005. Correlation of gastric mucosal damage with sialic acid profile in rats: effects of hydrochloric acid, pepsin and hypertonic saline. *Cell Biochem Funct.* 23(5):339-45.

Zaidi SI, Raisuddin S, Singh KP, Jafri A, Husain R, Husain MM, Mall SA, Seth PK, Ray PK. 1994. Acrylamide induced immunosuppression in rats and its modulation by 6-MFA, an interferon inducer. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 16(2):247-260.

Zeiger E, Recio L, Fennell TR, Haseman JK, Snyder RW, Friedman M. 2009. Investigation of the low-dose response in the in vivo induction of micronuclei and adducts by acrylamide. *Toxicol Sci.* 107(1):247-257.

Zhang L, Wang E, Chen F, Yan H, Yuan Y. 2013. Potential protective effects of oral administration of allicin on acrylamide-induced toxicity in male mice. *Food Funct.* 4(8):1229-1236.

Zhang L, Zhang H, Miao Y, Wu S, Ye H, Yuan Y. 2012. Protective effect of allicin against acrylamide-induced hepatocyte damage in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol.* 50(9):3306-3312.

Zhang X. 2009. Simultaneous exposure to dietary acrylamide and corn oil developed carcinogenesis through cell proliferation and inhibition of apoptosis by regulating p53-mediated mitochondria-dependent signaling pathway. *Toxicol Ind Health.* 25:101-109.

Zhao M, Liu X, Luo Y, Guo H, Hu X, Chen F. 2015. Evaluation of protective effect of freeze-dried strawberry, grape, and blueberry powder on acrylamide toxicity in mice. *J Food Sci.* 80(4):H869-874.

Zhu YJ, Zeng T, Zhu YB, Yu S, Wang Q, Zhang L, Guo X, Xie K. 2008. Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat. *Neurochem Res.* 33:2310-2317.

Zödl B, Schmid D, Wassler G, Gundacker C, Leibetseder V, Thalhammer T, Ekmekcioglu C. 2007. Intestinal transport and metabolism of acrylamide. *Toxicology.* 232:99-108.

BIOGRAFIJA



Na Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, grupa Biologija, upisala se 2000. godine i diplomirala na predmetu Uporedna histologija sa embriologijom 30.11.2005. god. Na istom fakultetu 2006. god. upisuje diplomske akademske - master studije modul Funkcionalna biologija. Master rad pod nazivom je odbranila 28.09.2007. god.

Od 2007. do 2011. god. bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj.

Od 2011. god. zasniva radni odnos na radnom mestu Istraživača-pripravnika za užu naučnu oblast Histologija sa embriologijom na Departmanu za biologiju i ekologiju na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu.

Kao saradnik učestvovala je na četiri Republička projekta. Bavi se naučno-istraživačkim radom iz oblasti toksikologije, do sada ima publikovana 44 rada i saopštenja, tri iz M20 kategorije.

Počevši od školske 2006/07 učestvuje kao saradnik u izvođenju nastave iz predmeta Histologija sa embriologijom, Histologija sa citologijom, Zoološki praktikum, Preparacija ćelije i tkiva životinja. Školske 2013/2014 učestvovala je u kreiranju i realizaciji praktičnog dela kursa Biologija ćelije i tkiva za smer biohemija.

Ivana Koledin

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Ivana Koledin
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Milica Matavulj, redovni profesor
Naslov rada: NR	Strukturne promene sluzokože debelog creva pacova pod uticajem akrilamida
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	R. Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno- matematički fakultet, Trg Dositeja Obradovića
Fizički opis rada: FO	Poglavlja (7), stranica (139), slika (24), tabela (30), grafikona (51), referenci (302), priloga (/)
Naučna oblast: NO	Biologija
Naučna disciplina: ND	Histologija

Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Akrilamid, debelo crevo, peharaste ćelije, limfociti, eozinofili, mastociti
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, PMF, Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	Akrilamid je supstanca koja se prirodno stvara pečenjem i prženjem hrane bogate skrobom. Cilj rada je bio da se ispita subhronični i akutni uticaj akrilamida na debelo crevo prepubertalnih pacova. Dobijeni rezultati su pokazali da akrilamid ne narušava morfologiju zida creva, ali dovodi do promena u volumenskoj gustini njegovih tunika i lamina. Najizraženije promene su bile na vezivnom tkivu debelog creva. Analizom peharastih ćelija i sadržaja mucina pokazano je da akrilamid utiče i na ugljenohidratnu i na proteinsku komponentu mucina. Subhronični tretman je doveo do smanjenja broja limfocita i eozinofila, a kod akutnog tretmana je primećeno nakupljanje limfocita i eozinofila u kolonu akrilamidom tretiranih jedinki. Broj mastocita je u sva tri eksperimenta bio smanjen kod tretiranih životinja. Duže izlaganje akrilamidu ima imunosupresivno dejstvo kod pacova.
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	29.10.2014.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>Predsednik: Dr Matilda Đolai, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu</p> <p>Član: Dr Milica Matavulj, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novm Sadu</p> <p>Član: Dr Gordana Ušćebrka, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE**

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	Ivana Koledin
Mentor: MN	Dr Milica Matavulj, full professor
Title: TI	Structural changes of rat colon mucose after acrylamide treatment
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English/Serbian
Country of publication: CP	R. Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovica 2
Physical description: PD	Chapters (7), pages (139), figures (24), tables (30), graphs (51), references (302), additional lists (/)
Scientific field SF	Biology
Scientific discipline SD	Histology

Subject, Key words SKW	Acrylamide, colon, goblet cell, lymphocytes, eosinophils, mast cell
UC	
Holding data: HD	The Library of Dept. of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovica 2, 21000 Novi Sad, R. Serbia
Note: N	None
Abstract: AB	Acrylamide is natural product of cooking (baking, roasting) starchy food. Aim of the study was to evaluate the risk of subchronic and acute acrylamide treatment on juvenile rat colon. Changes in colon wall morphology was detected by stereological methods since histological evaluation reveal normal colon architecture after acrylamide intoxication. The changes was most prominent on connective tissue of rat colon. Acrylamide affected both protein component of mucins and glycans linked to peptide backbone. In subchronic treatment acrylamide caused reduction of lymphocytes and eosinophils number, while acute experiment lead to lymphocytes and eosinophils accumulation in colon tissue. Acrylamide intoxication decreased mast cell number in all experiments. Longer acrylamide exposure had immunosuppressive effect in rats.
Accepted on Scientific Board on: AS	29.10.2014.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>President: Dr Matilda Djolai, Associate professor, Faculty of Medicine, Novi Sad</p> <p>Member: Dr Milica Matavulj, Full professor, Faculty of Sciences, Novi Sad</p> <p>Member: Dr Gordana Ušćebrka, Full professor faculty of Agriculture, Novi Sad</p>