

КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Наставно-научно веће Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду, на седници одржаној 20.06.2024. године именовало је Комисију за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата магистра фармације Драгице Божић (одлука 01. број 1432/2), пријављеној и одобреној за израду под насловом:

In silico, in vitro* и *in vivo* испитивање токсичности комбиноване примене имуномодулатора сулфорафана и инактивисане бактерије *Pseudomonas aeruginosa

Ментори:

Др сц. Данијела Ђукић-Ћосић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Александар Павић, научни саветник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду

Комисија у саставу:

1. Др сц. Биљана Антонијевић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
2. Др сц. Зорица Булат, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
3. Др сц. Маријана Ћурчић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
4. Др сц. Зорица Стојић-Вуканић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
5. Др сц. Татјана Срдић-Рајић, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије, Београд

прегледала је приложену дисертацију и пропратну документацију и подноси Наставно-научном већу Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата Драгице Божић под насловом „*In silico, in vitro* и *in vivo* испитивање токсичности комбиноване примене имуномодулатора сулфорафана и инактивисане бактерије *Pseudomonas aeruginosa*“, написана је јасним и прегледним стилем на 175 страна, формата А4, фонтом *Times New Roman*, величине 12 и једноструким проредом. У склопу дисертације приказано је укупно 72 табеле, 58 слика и 261 литературних навода. Дисертација садржи следећа поглавља: Увод, Хипотеза и циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература.

На почетку дисертације представљен је Сажетак рада на српском и енглеском језику, списак скраћеница и садржај, док се на крају налази кратка биографија кандидата и потписане изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације.

Уводно поглавље састоји се из 4 дела: (1) сулфорафан (*SFN*), (2) инактивисана бактерија *Pseudomonas aeruginosa* – инактивисана и генетски модификована бактерија која експримира фимбрије са хемаглутинином осетљивим на манозу (енгл. *Pseudomonas aeruginosa mannose-sensitive-hemagglutinin* (*PA-MSHA*)), (3) комбинована примена имуномодулатора и (4) испитивање токсичности. На почетку уводног дела дат је осврт на пораст инциденце малигних болести у свету и развој нових терапијских приступа, пре свега имуноterapiје која има за циљ стимулисање имунског одговора код оболелих пацијената. Такође, указано је на значај имуномодулатора као што су *SFN* и *PA-MSHA* који поред антитуморског дејства остварују и бројне друге здравствене бенефите делујући антиинфламаторно и антиоксидативно, што је приказано кроз анализу доступних литературних *in silico, in vitro* и *in vivo* података, као и резултата добијених у клиничким студијама. Представљени су доступни литературни подаци о токсичности појединачне примене испитиваних имуномодулатора, наглашавајући да до сада литературни подаци о комбинованој примени *SFN* и *PA-MSHA* нису доступни. У последњем одељку уводног дела укратко су описани начини испитивања токсичности, указујући на значај свеобухватног испитивања токсичности применом *in silico, in vitro* и *in vivo* метода.

Хипотеза и циљеви истраживања су јасно дефинисани – испитати токсичност сулфорафана и инактивисане бактерије *Pseudomonas aeruginosa*, као и њихове комбинације коришћењем *in silico* и два *in vivo* модела, ембрионе зебрица и пацове, док је *in vitro* анализом испитан цитотоксични потенцијал појединачне и комбиноване примене имуномодулатора у култури ћелија колоректалног карцинома. Додатно, циљ ове докторске дисертације био је да се разјасне механизми токсичности појединачних имуномодулатора и њихове комбиноване примене анализом токсикогеномичких података, истражујући повезаност имуномодулатора са генима, молекуларним процесима, биолошким путевима и развојем различитих болести, као и

анализом хематолошких, биохемијских параметара, нивоа хормона, продукције цитокина и других протеина и параметара оксидативног статуса код пацова. Такође, циљ је био да се утврде гранични нивои токсичности моделовањем односа концентрација/доза-одговор за ефекте праћене на ембрионима зебрица и код пацова.

У поглављу **Материјал и методе** описане су примењене *in silico*, *in vitro* и *in vivo* методе. Експерименталне животиње, као и експериментални протоколи испитивања на ембрионима зебрица и пацовима приказани су са детаљним описом примене одређених концентрација и доза испитиваних имуномодулатора, наведене су коришћене хемикалије и реагенси, коришћена инактивисана и генетски модификована бактерија, као и ћелијске линије, методолошки поступци обраде и припреме узорака, методе за анализу или праћење одабраних параметара и статистичка обрада резултата.

In silico анализа извршена је помоћу следећих јавно доступних база података, софтвера и алата: *Derek Nexus*, Компаративна токсикогеномичка база података (енгл. *Comparative Toxicogenomics Database, CTD*; <http://CTDbase.org>) и, у оквиру ње, алати *Batch Query*, *Set Analyzer* и *CTD Tetramers*, а затим *STITCH* (енгл. *Search Tool for Interacting Chemicals, STITCH*; <http://stitch.embl.de/>) база података и *Cytoscape* (<https://cytoscape.org>) софтверски пакет и додаци: *String* (<https://apps.cytoscape.org/apps/stringapp>), *CytoHubba* (<https://apps.cytoscape.org/apps/cytohubba>), *Bingo* (<https://apps.cytoscape.org/apps/bingo>), *ClueGO* + *CluePedia*. Такође, коришћен је и јавно доступан алат за анализу онтологије гена, *DAVID* (енгл. *Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, DAVID*; <https://david.ncifcrf.gov/>). Помоћу токсикогеномике предвиђена је и токсичност *SFN* на нивоу гена и то коришћењем *GEO* (енгл. *Gene Expression Omnibus, GEO*, ncbi.nlm.nih.gov/geo/) репозиторијума података и њеног алата *GEO2R*.

In vitro испитивање извршено је на две ћелијске линије карцинома колона, и то *HCT-116* и *HT-29* и здравим ћелијама фибробласта плућа *MRC-5* при чему је испитан цитотоксични потенцијал растућих концентрација имуномодулатора (*SFN* 1-50 $\mu\text{mol/l}$ и *PA-MSHA* 1-10% (0,018- 0,18 x 10⁹ ћелија/ml)) након 48 h и 72 h третмана, као и механизми којима *SFN* доводи до смрти ћелија тумора, односно утицај *SFN* на расподелу ћелија по фазама ћелијског циклуса, промену митохондријског мембранског потенцијала, утицај на протеинску експресију фосфорилисане, активне форме *c-Jun N*-терминалне киназе (енгл. *c-Jun N-terminal kinases, JNKs*), као и ефекат на ниво слободних радикала.

На моделу зебрица праћени су токсични ефекти *SFN* и *PA-MSHA*, као и њихове комбинације у опсегу растућих концентрација (0,5-20 $\mu\text{g/ml}$ *SFN*, односно 0,1-20% *PA-MSHA* (0,0018-0,36 x 10⁹ ћелија/ml)), након петодневне изложености ембриона зебрица који су анализирани на преживљавање, појаву малформација, кардиотоксичност, хепатотоксичност, као и ефекте на развој мехура (енгл. *swim bladder*).

In vivo испитивање на моделу пацова изведено је на мужјацима и женкама *Wistar* пацова подељеним у две контролне групе и 18 третираних група ($n=5$), које су субкутно (28 дана), биле изложене следећим третманима: (1) *SFN* (*SFN* 1; 0,5 mg/kg т.м/дан, *SFN* 2; 2 mg/kg т.м/дан,

SFN 3; 5 mg/kg т.м/дан), (2) *PA-MSHA* (*PA-MSHA* 1; 0,09 x 10⁹ ћелија/ml, *PA-MSHA* 2; 0,18 x 10⁹ ћелија/ml; *PA-MSHA* 3; 0,36 x 10⁹ ћелија/ml), (3) комбиновани третман *SFN* и *PA-MSHA* (*MIX* 1; 0,5 mg/kg т.м/дан + 0,09 x 10⁹ ћелија/ml; *MIX* 2; 2 mg/kg т.м/дан + 0,18 x 10⁹ ћелија/ml; *MIX* 3; 5 mg/kg т.м/дан + 0,36 x 10⁹ ћелија/ml). Сулфорафан је примењиван оралном гаважом свакодневно, а *PA-MSHA* субкутано једном недељно. Током трајања експеримента бележени су свакодневно унос воде и хране, као и телесна маса животиња. Након 28 дана третмана пацови су жртвовани. Испитивани су хематолошки параметри (крвна слика са леукоцитном формулом) и биохемијски параметри (триацилглицериди, холестерол, липопротеин високе густине (енгл. *high density lipoprotein*, *HDL*), липопротеин ниске густине (енгл. *low density lipoprotein*, *LDL*), креатинин, мокраћна киселина, укупни протеини у серуму, албумин, директни билирубин, укупни билирубин, гвожђе у серуму, калцијум (Ca^{2+}), неоргански фосфор (PO_4^{3+}), магнезијум (Mg^{2+}) и хлориди (*Cl*), активност ензима аспартат аминотрансферазе (*AST*), аланин аминотрансферазе (*ALT*) и алкалне фосфатазе (*ALP*)), нивои хормона у серуму (тестостерон, тироксин (*T3*) и тријодтиронин (*T4*)), продукција протеина (интерферон-гама (*IFN γ*), интерлеукин-2 (*IL-2*), интерлеукин-6 (*IL-6*), интерлеукин-10 (*IL-10*), фактор некрозе тумора-алфа (*TNF α*), трансформишући фактор раста-бета (*TG β*), хемокин лиганда 1 (*CXCL1*)), као и нуклеарни еритроидни фактор-2 (*Nrf2*) и хем оксигеназа 1 (*HO-1*)), параметри оксидативног стреса/антиоксидативне заштите (ниво глутатиона (*GSH*), исхемијом модификован албумин (*IMA*), малондиалдехид (*MDA*), активност ензима супероксид дизмутазе (*SOD*), и укупне сулфхидрилне групе (*SH*)) у крвној плазми и ткивима органа (бубрези, јетра, плућа, срце, тимус), а анализиран је и утицај *SFN* и *PA-MSHA* и њихове комбиноване примене на очуваност структуре ткива (јетра, слезина, и тимус). Све експерименталне процедуре биле су одобрене од стране Етичког комитета за рад са експерименталним животињама Фармацеутског факултета Универзитета у Београду и Министарстава пољопривреде, шумарства и водопривреде - Управа за ветерину (број етичке дозволе: 323-07-11822/2018-05), а са животињама се поступало у складу са Правилником за рад са експерименталним животињама Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду. У овом поглављу описане су процедуре анализирања хематолошких и биохемијских параметара, продукције цитокина и других протеина који су претходно наведени, као и параметара оксидативног стареса/антиоксидативне заштите спектрофотометријским и имунохемијским методама, као и поступци припреме узорака за патохистолошку анализу. За сваки од анализираних параметара на моделу ембриона зебрица и пацова спроведено је и моделовање односа концентрација/доза-одговор (енгл. *Benchmark concentration/dose analysis*, *BMC/BMD*) при чему су добијени интервали горње и доње границе поузданости, а као критеријум за поузданост резултата постављен је однос $BMDL/BMDU < 100$. У делу Статистичка обрада резултата наведене су статистичке методе које су коришћене за обраду података. У првом кораку тестирана је нормалност дистрибуције (*Shapiro–Wilk* тест). Једнофакторска анализа варијансе (*ANOVA*) примењена је у случају нормалне дистрибуције, праћена Фишовим тестом најмање значајне разлике (енгл. *Fisher's Least Significant Difference*, *LSD*). Непараметарски *Kruskal–Wallis* тест праћен *Dunn post-hoc* тестом рађен је у случају дистрибуције које није пратила нормалну расподелу. Значајност је прихваћена на $p < 0,05$. За статистичку обраду података и графички приказ резултата коришћен је *GraphPad Prism 6* софтвер (*GraphPad Software, Inc., San Diego*,

California, USA).

У поглављу **Резултати** приказани су табеларно или графички оригинални резултати добијени у истраживању. Дат је детаљан опис *in silico* истраживања о утицају имуномодулатора на развој различитих поремећаја и болести, а потом је и предвиђена токсичност *SFN* на основу интеракција са генима. Приказани *in vitro* резултати дају увид у могуће механизме цитотоксичности *SFN*, са освртом на процес апоптозе. Потом су приказани *in vivo* резултати на два модела, ембрионима зебрица и пацова, за све праћене параметре, као и резултати моделовања односа концентрација/доза-одговор.

У поглављу **Дискусија** приказана је детаљна анализа добијених резултата ове дисертације, у контексту доступних литературних података. Организована је у три целине. У првој целини дискутовани су добијени резултати *in silico*, *in vitro* и *in vivo* испитивања на два експериментална модела о утицају *SFN* на испољавање штетних ефеката, као и цитотоксичност овог имуномодулатора. Идентификовани молекуларни механизми токсичности дискутовани су по утврђеној значајности према *in silico* резултатима уз разматрање добијених, *in vitro* и *in vivo* резултата. У другој целини дискусије, резултати о потенцијално токсичном и цитотоксичном дејству *PA-MSHA* добијени у *in silico*, *in vitro* и *in vivo* испитивањима анализирани су у односу на доступне податке из литературе. У последњем делу дискусије, упоређени су резултати добијени при *in silico*, *in vitro* и *in vivo* испитивању комбиноване примене имуномодулатора *SFN* и *PA-MSHA* са резултатима добијеним при њиховој појединачној примени.

У поглављу **Закључци** изнети су релевантни закључци који проистичу из резултата спроведеног истраживања и њихове анализе, како у погледу испитивања токсичности сулфорафана и инактивисане бактерије *Pseudomonas aeruginosa* и утврђених граничних нивоа токсичности, тако и у погледу истраживања којим је процењено токсично дејство њихове комбиноване примене.

У поглављу **Литература** наведене су референце које су коришћене током израде ове докторске дисертације.

Б. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У поглављу **Резултати** прво су описани резултати *in silico* анализе предвиђања токсичног потенцијала и токсикогеномичке анализе података појединачних имуномодулатора (*SFN* и *PA-MSHA*) и њихове комбиноване примене, а потом резултати испитивања цитотоксичности добијени *in vitro* и на крају, *in vivo* резултати на моделу зебрице и пацова.

In silico резултати указали су на постојање две токсифоре у молекулу *SFN* и то, изоцијанатну и изотиоцијанатну хемијску групу које могу довести до оштећења хромозома код сисара *in vitro*, мутагености код бактерија или повећане сензибилизације коже сисара. Такође, идентификована је повезаност *SFN* и *PA-MSHA* са 1933, односно 64 гена, редом, и заједнички

утицај на 13 гена и то: *AKT1*, *BAD*, *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CCL2*, *CD14*, *CDH1*, *CDKN1A*, *IFNG*, *TLR4*, *TLR6* и *TNF*. Апоптоза, утицај на имунски одговор и оксидативни стрес издвојени су као најзначајнији механизми укључени у потенцијалну токсичност испитиваних имуномодулатора појединачно и у комбинацији. Додатно, *in silico* резултати испитивања токсичности *SFN* на нивоу гена показали су да примена *SFN* може имати и позитивне и негативне ефекте код особа оболелих од карцинома колоне дејством на *TIMP1*, *KLF4*, *COL1A1*, *MMP28*, *CXCL8*, *NOX4* и *CDK1* гене и последично утицајем на путеве диференцијације белих и браон адипоцита и адипогенезе. Код карцинома панкреаса, издвојена су два молекуларна пута чија активност може бити измењена под дејством *SFN* и то: *MET* активирани *PTK2* сигнални пут и Формирање екстрацелуларног матрикса посредством протеогликана, док су се за карцином простате издвојили молекуларни путеви: Циркардијална дисритмија, Контракција глатке мускулатуре и Ендотелином-регулисани путеви.

У другом делу приказани су *in vitro* резултати испитивања цитотоксичности *SFN* и *PA-MSHA*, појединачно и у комбинацији. Коришћене две ћелијске линије карцинома колоне (*HT-29* и *HCT-116*) третиране су растућим концентрацијама имуномодулатора при чему је израчуната *IC50* (μM) вредност указала на већу осетљивост *HCT-116* ћелија ($IC50=8,41 \pm 0,88 \mu\text{M}$) на *SFN*, у односу на *HT-29* ћелије ($IC50=24,83 \pm 0,10 \mu\text{M}$). Даље је показано да *SFN* доводи до застоја ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса код обе линије, индукује апоптозу *HT-29* ћелија, доводи до пада митохондријског мембранског потенцијала, снижења укупних и митохондријских ROS, значајно смањује протеинску експресију фосфо-*JNKs* у обе ћелијске линије, и не доводи до протеинске експресије исечене *PARP* (енгл. *cleaved PARP*), што може да укаже на одсуство активне каспазе 3. Испитивање цитотоксичног ефекта *PA-MSHA* није показао цитотоксични ефекат при тестираним концентрацијама овог имуномодулатора на испитиваним ћелијским линијама. При комбинованој примени имуномодулатора уочено је смањено цитотоксично дејство комбинације *SFN* и *PA-MSHA* будући да је појединачна примена *SFN* довела до смрти већег броја третираних ћелија карцинома колоне у односу на комбиновану примену *SFN* и *PA-MSHA*.

У *in vivo* резултатима најпре су приказани резултати добијени на ембрионима зебрица, а потом и резултати субакутне студије на *Wistar* пацовима – унос воде и хране, прираст телесне масе и релативне масе органа, хематолошки и биохемијски параметри, нивои хормона, продукција цитокина и других протеина, параметри оксидативног стреса/антиоксидативне заштите и резултати хистопатолошке анализе, након 28 дана изложености.

Резултати испитивања акутне токсичности *SFN* показали су да ефекат на преживљавање, раст и развој ембриона зебрице током петодневног третмана зависи од примењене концентрације имуномодулатора. Израчуната *LC50* вредност износи $80,1 \mu\text{M}$ ($14,2 \mu\text{g/ml}$). При концентрацији од $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ($22,56 \mu\text{M}$) примећен је утицај на развој мехура код 30% ембриона, док је при концентрацији од $10 \mu\text{g/ml}$ овај ефекат уочен код свих ембриона зебрица. Такође, примена $56,4 \mu\text{M}$ ($10 \mu\text{g/ml}$) *SFN* довела је до појаве некрозе јетре код 90% третираних ембриона. Даље је, спроведена *BMC* анализа, показала да *SFN* може изазвати малформације ембриона

зебрица и утицати на развој мехура у концентрацијама од 3,32 $\mu\text{g/ml}$ и 3,2 $\mu\text{g/ml}$, редом, док је за настанак некрозе јетре потребна концентрација од 6,85 $\mu\text{g/ml}$. Резултати испитивања акутне токсичности *PA-MSHA* показали су да примена инактивисане бактерије у концентрацији до 0,3% ($5,4 \times 10^6$ ћелија/ ml) не доводи до појаве праћених штетних ефеката. Летални исход забележен је код 70% ембриона при концентрацији од 3% ($5,4 \times 10^7$ ћелија/ ml), док је концентрација од 5% била летална за све ембрионе. Израчуната *LC50* вредност износила је 2,8% ($5,04 \times 10^7$ ћелија/ ml). Такође, забележена је кардиотоксичност и хепатотоксичност код свих ембриона. Утицај на развој мехура примећен је код 60% ембриона при концентрацији од 0,5%, а код свих ембриона при концентрацији $\geq 1\%$ ($1,8 \times 10^7$ ћелија/ ml). Малформације ембриона су уочене при концентрацијама већим од 0,3% ($5,4 \times 10^6$ ћелија/ ml). Сprovedена *BMC* анализа указује на позитивну корелацију између примењене концентрације *PA-MSHA* и појаве штетних ефеката. *PA-MSHA* при концентрацији од 0,342% ($6,15 \times 10^6$ ћелија/ ml) испољава токсичност на нивоу кардиоваскуларног система, изазива некрозу јетре и малформације ембриона зебрица. Такође, израчунато је да концентрација *PA-MSHA* од 0,432% ($7,78 \times 10^6$ ћелија/ ml) утиче на развој мехура. Коначно, испитивање токсичности комбиноване примене *SFN* и *PA-MSHA* показало је да када се имуномодулатори користе у концентрацијама мањим од 5 $\mu\text{g/ml}$ *SFN*, односно 0,2% *PA-MSHA* не долази до појаве хепато- и кардиотоксичних ефеката. Међутим, малформације ембриона су забележене при примени 3 $\mu\text{g/ml}$ *SFN* и 0,25% *PA-MSHA*, а преживљавање ембриона било је изнад 50% у свим испитиваним комбинацијама.

Резултати испитивања добијени на пацовима након субакутне изложености испитиваним имуномодулаторима показали су да *SFN* и *PA-MSHA*, као и њихова комбинована примена доводе до значајних промена у уносу воде и хране, прирасту телесне масе, хематолошким параметрима и биохемијским параметрима повезаним са функцијом јетре и бубрега. Код хематолошких параметара, промене у највећем броју параметара у односу на контролну групу забележене су у групи женки пацова које су третиране *PA-MSHA* (повишен број леукоцита, лимфоцита, неутрофила, еозинофила, тромбоцита, затим повишен проценат еозинофила и неутрофила, а смањен проценат моноцита, број еритроцита, концентрација хемоглобина, хематокрит и повишен ниво *MCV* и *MCHC*). Од биохемијских параметара повезаних са функцијом бубрега, у *PA-MSHA* и *MIX* групи женки пацова забележено је значајно смањење креатинина, мокраћне киселине и калцијума у поређењу са контролом, док је код мужјака пацова уочено смањење креатинина и мокраћне киселине након *PA-MSHA* третмана, али не и у *MIX* групама. Од параметара липидног профила значајан пораст нивоа холестерола забележен је само у *PA-MSHA* групама, при чему је ефекат уочен и код мужјака и код женки пацова. Поред тога, примена *PA-MSHA* довела је до пораста нивоа *LDL*, а смањења триглицерида у поређењу са контролом и код мужјака и женки пацова. Исти ефекат уочен је у *MIX* групи третираних женки, али не и мужјака пацова. Даље, док је ниво Т3 и Т4 хормона био повишен код мужјака, али не и женки пацова третираних *SFN*, *PA-MSHA* доводи до статистички значајне промене концентрације Т3 код женки пацова. У *MIX* групи уочена је само промена Т4 хормона и то код мужјака, али не и женки пацова. Оба испитивана имуномодулатора појединачно и у комбинацији доводе до промена у продукцији праћених про- и антиинфламаторних протеина код третираних пацова оба пола. У *SFN* третираним групама издваја се пораст нивоа *HO-1*, *Nrf2*

код пацова оба пола, пораст *IL-10* и смањење *IL-6* код мужјака, а пораст *TNF α* код женки. С друге стране *PA-MSHA* третман показао је најизраженији ефекат на нивое *IFN γ* , *IL-10*, *IL-2* и *TGF β* који су били значајно повишени у односу на контролу код третираних мужјака. Исти ефекат забележен је и код женки пацова третираних *PA-MSHA* код којих је и ниво *Nrf2* био значајно виши у односу на контролу. Коначно, комбинована примена *SFN* и *PA-MSHA* доводи до пораста *CXCL1*, *IFN γ* , *IL-2*, *IL-6*, *IL-10* и *TGF β* код мужјака, односно *IFN γ* , *IL-10* и *TGF β* , као и смањења *TNF α* код женки третираних пацова. Резултати патохистолошке анализе јетре указују на промене у праћеним параметрима при примени појединачних, али не и комбинованих имуномодулатора у односу на контролу, док у ткивима слезине и тимуса нису уочене патохистолошке промене. Анимална студија потврдила је утицај појединачне и комбиноване примене имуномодулатора на параметре оксидативног статуса у различитим ткивима пацова. Такође, показано је да су промене у већем броју праћених параметрима оксидативног стреса/антиоксидативне заштите у *PA-MSHA* и *MIX* групама различите у односу на групе третиране *SFN* код пацова оба пола. Резултати показују да *PA-MSHA* и *MIX* третман могу изазвати оксидативно оштећење бубрега женки пацова, али не и мужјака, смањујући активност *SOD* ензима. Такође је код женки пацова уочено да *SFN* смањује ниво *SOD* у јетри и плућима пацова, док је у *MIX* групама овај ефекат изостао.

В. УПОРЕДНА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

У оквиру поглавља **Дискусија**, добијени резултати истраживања детаљно су анализирани и разматрани у контексту доступних литературних података. Дискусија је подељена у три целине – (1) испитивање токсичности *SFN*, (2) испитивање токсичности *PA-MSHA* и (3) испитивање токсичности комбиноване примене *SFN* и *PA-MSHA*. У оквиру дискусије прво су разматрани резултати добијени *in silico* анализама, а потом у *in vitro* и *in vivo* испитивањима на моделима зебрице и пацова.

В.1. Токсичност сулфорафана

У првој фази истраживања анализирана је структура *SFN* у циљу предвиђања потенцијалних токсичних ефеката коришћењем *Derek Nexus* софтвера. Идентификоване су две хемијске групе, изоцијанат и изотиоцијанат, које могу изазвати преосетљивост коже и оштећење хромозома (1, 2). Ови налази подржани су подацима који показују иритативно дејство изотиоцијаната и њихов потенцијал да покрену реакције преосетљивости коже (3, 4), док фенилетил и етил изотиоцијанат могу изазвати алергијске реакције (5). Ради бољег разумевања механизма токсичности, извршени су додатни *in silico* тестови који су идентификовали преко 1900 *SFN*-интереагујућих гена, укључених у оксидативну заштиту и инфламацију (6, 7). *SFN* показује способност да повећа експресију протеина кључних за одржавање оксидативног баланса и смањење инфламације, пре свега *Nrf2*, *NQO1* и *HO-1* (8, 9) што је у складу са добијеним *in silico* резултатима. Међутим, његов утицај на цитокине као што је *TNF α* остаје неразјашњен, будући да доступни подаци указују његово двојно дејство на експресију *TNF* гена,

што може зависити од услова експеримента као што су примењена доза *SFN* или дужина трајања експозиције (10, 11). *SFN* такође показује имуномодулаторно дејство које утиче на миграцију ћелија имунског система и производњу антитела, што је потврђено и анализом и интеграцијом података доступних у *CTD* бази (12). Досадашња истраживања су показала да на ћелијском нивоу *SFN* стимулише *Nrf2* што доприноси инхибицији *NFκβ* и антиоксидативном одговору (13) што је у складу са *in silico* резултатима спроведене докторске дисертације. Даља истраживања фокусирају се на предвиђање потенцијалних токсичних/негативних ефеката *SFN* на нивоу гена код пацијената са колоректалним карциномом, као и малигним тумором панкреаса и простате, у сврху разјашњења антитуморског потенцијала *SFN*. Идентификовани су гени чија је експресија измењена у овим малигним туморима, а на које може утицати *SFN* што помаже у разумевању потенцијалних позитивних и негативних ефеката примене *SFN* у терапијским стратегијама лечења малигних тумора.

Резултати испитивања цитотоксичног потенцијала *SFN* на ћелијама колоректалног карцинома у овој докторској дисертацији су показали већу осетљивост *HCT-116* ћелија на *SFN* у односу на *HT-29*. Ово може указивати на могућу улогу *p53* гена у регулацији антитуморског одговора *SFN*. Међутим, даљом анализом утврђено је да *SFN* индукује апоптозу код *HT-29* акумулирањем ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса и то, временски зависно. Добијени резултати у складу су са претходно публикованим истраживањем Каземи и сар. (2021) (14). С друге стране, доступни литературни подаци указују и на то да *SFN* инхибира раст и развој ћелија тумора желуца, активирајући *p53/p21* сигнални пут и индукујући апоптозу преко *p53*-зависног активирања каспазе 3 (15). У овој докторској дисертацији у обе ћелијске линије *SFN* значајно смањује протеинску експресију фосфо-*JNK*, која је укључена у различите ћелијске процесе, као што су ћелијски раст, апоптоза и инфламација. Сулфорафаном индуковано смањење фосфорилације *JNK* последично би могло да инхибира *NF-κB* и *AP-1* сигналне путеве што доводи до снижења експресије инфламаторних медијатора (*iNOS*, *COX-2*, *NO*, и *PGE2*) и проинфламаторних цитокина (*TNFα*, *IL-6* и *IL-1β*) што је у сагласности са досадашњим истраживањима Субеди и сарадника (16). Са друге стране, постоје литературни подаци који показују да *SFN* активира *JNK* и лизозомску пермеабилizацију, што резултира катепсин-стимулисаним ослобађањем *Bid* и последичном активацијом апоптозе (17). Такође, претходна испитивања указују на снижење мембранског потенцијала митохондрија и транслокацију цитохрома *c* као кључних догађаја у митохондријском (унутрашњем) путу апоптозе под утицајем *SFN* (18). У овој докторској дисертацији показано је да *SFN* доводи до снижења митохондријског мембранског потенцијала поготово код *HT-29* ћелија, ефикасно снижава укупне *ROS* у обе испитиване ћелијске линије, са значајнијим ефектом на *HT-29*. Испитивањем на *MRC-5* ћелијама уочена је селективност *SFN* према *HCT-116*, али не и *HT-29* ћелијама карцинома колоне. И у доступним литературним подацима, упркос цитотоксичном потенцијалу *SFN* према ћелијама тумора, здраве ћелије показују мању осетљивост на дејство испитиваног имуномодулатора у *in vitro* условима (15).

Акутна токсичност имуномодулатора испитана на моделу ембриона зебрица ради одређивања токсичних ефеката у раној фази развоја ембриона и праћења утицаја на развој

унутрашњих органа (19, 20), показала је да уочени штетни ефекти *SFN* зависе од примењене концентрације *SFN* (0,5 до 20 $\mu\text{g/ml}$). Израчуната концентрација *SFN* која је довела до леталног исхода 50% третираних ембриона зебрица износила је 14,2 $\mu\text{g/ml}$ (*LC50*), што је у сагласности са *LC50* вредношћу добијеном *Benchmark* анализом 14,8 $\mu\text{g/ml}$. Примена *SFN* у концентрацији од 4 $\mu\text{g/ml}$ спречава формирање мехура код око 30% ембриона, док је при концентрацији од 10 $\mu\text{g/ml}$ овај ефекат уочен код свих ембриона. Некроза јетре је уочена само при концентрацији *SFN* од 10 $\mu\text{g/ml}$. *Benchmark* анализом израчунате су концентрације *SFN* које доводе до појаве тератогености, штетног ефекта на развој мехура и хепатотоксичности и износе 3,22 $\mu\text{g/ml}$, 3,2 $\mu\text{g/ml}$ и 6,85 $\mu\text{g/ml}$, редом. Литературни подаци показују да су позитивни ефекти *SFN* уочени при концентрацијама које су више или ниже у односу на концентрације које изазивају штетне ефекте на ембрионима зебрица добијене у овој докторској дисертацији (21-23). Еом и сар. (21) су утврдили концентрацију *SFN* од 30 μM (одговара 5,3 $\mu\text{g/ml}$) која је показала антитуморски потенцијал, што је ниже од концентрације која изазива хепатотоксичност, а више од концентрације за друге праћене штетне ефекте, малформације ембриона и утицај на развој мехура, у овој докторској дисертацији. Неуропротективни ефекат *SFN* показан је у концентрацији од 25 μM (одговара 4,43 $\mu\text{g/ml}$) у испитивању на зебрицама (22). Такође, испитивања на ксенографт моделима зебрица са туморским ћелијским линијама мозга (*U87*), грлића материце (*HeLa*) и дојке (*MDA-MB-231*) показала су да фосфонатни аналог сулфорафана поседује антитуморска својства у концентрацији од 3 μM (одговара 0,53 $\mu\text{g/ml}$), што је знатно нижа концентрација од претходно наведених концентрација за *SFN* (23). Добијени *in vitro* резултати ове докторске дисертације су показали цитотоксични ефекат *SFN* у концентрацијама од 1,41 $\mu\text{g/ml}$ (НСТ-116) и 4,39 $\mu\text{g/ml}$ (НТ-29).

Проучавање утицаја *SFN* на пацовима показало је да *SFN* има значајан утицај на унос воде и хране, телесну масу и метаболичке параметре, посебно код мужјака пацова. Мужјаци третирани *SFN* показали су повећан унос хране и воде, али смањење телесне масе након 14 и 28 дана третмана, што није било праћено значајним променама у релативној маси органа. Код женки, варијације у уносу хране и воде биле су мање изражене, али је забележен пораст уноса хране након 28 дана третмана у *SFN* 2 и *SFN* 3 групи. Од хематолошких параметара, статистички значајан пораст броја леукоцита уочен је код мужјака, али не и женки пацова. Супротно томе, претходно је показано да примена високе дозе *SFN*, 200 mg/kg , може допринети развоју леукопеније код мишева 48 сати након третмана (24). Међутим, и даље не постоје довољно доказа који би потврдили потенцијал *SFN* да изазове леукопенију након акутне или субакутне примене. Иако је у клиничким студијама примећено да *SFN* снижава повишене вредности лимфоцита проузроковане применом хемиотерапије (25), у спроведеној докторској дисертацији уочен је пораст процента лимфоцита код мужјака пацова, и смањење код третираних женки пацова. Поред тога, полно-специфичан ефекат *SFN* забележен је код следећих хематолошких параметара: проценат и апсолутни број моноцита и неутрофила, проценат базофила и укупан број тромбоцита. На пример, проценат базофила, као и апсолутни број базофила код мушких пацова био је значајно нижи у третираним групама у односу на контролу, док је код женки био виши, али без статистичке значајности. Даље, промена у броју апсолутних неутрофила код женки паца била је значајно виша у *SFN* групи у односу на контролу, док код

мушких није забележен овај ефекат. Испитан је и утицај *SFN* на хематолошке параметре анемије, при чему примена растућих доза *SFN* није довела до статистички значајне промене броја еритроцита, концентрације хемоглобина и хематокрита, што је у складу са претходним истраживањем на мишевима у вези са третманом српасте анемије (26). Једина статистички значајна промена хематолошких параметара анемије била је за МНС код женки пацова, где је вредност у *SFN* групи била значајно нижа. Ове промене су повезане са хипохромном анемијом, праћеном ниским нивоом гвожђа и нормалним вредностима осталих параметара (27). Концентрације гвожђа у серуму женки пацова третираних *SFN* нису показале статистички значајну разлику у поређењу са контролом. Даље, *UIBC* вредности код мужјака пацова су показале статистички значајан пораст у *SFN* групи, што сугерише да *SFN* може модулисати ниво гвожђа и других параметара у вези са гвожђем, што је подржано и ранијим *in vivo* студијама на мишевима (28, 29). Од биохемијских параметара, испитан је утицај *SFN* на параметре повезане са функцијом јетре код мужјака и женки пацова након акутне пероралне примене *SFN* у три растуће дозе. Код женки пацова није уочена статистички значајна разлика у укупним протеинима, албумину, *AST*, *ALT* и *ALP* у поређењу са контролним групама што је у складу са претходно публикованим студијама које су показале да *SFN* снижава повишене нивое *ALT* и *AST*, који су резултат оштећења јетре (30-32). Насупрот томе, код мужјака пацова уоћен је статистички значајан пораст у нивоима укупних протеина у *SFN 3* групи у поређењу са *SFN 1*, као и увећање албумина у *SFN 2* и *SFN 3* групи у односу на *SFN 1* и контролу. Ово се може објаснити чињеницом да *SFN* има висок афинитет за везивање за албумин у серуму, што га чини серумским протеином носачем одговорним за транспорт *SFN* у циљно ткиво (33). У *In silico* делу истраживања доказан је и потенцијал *SFN* да активира имунски одговор кроз стимулацију гена одговорних за синтезу имунорегулаторних цитокина као што су *IL-6*, *IL-10*, *IFN γ* , *TNF α* , *TGF β* , али и гена који учествују у антиоксидативној заштити, пре свега *HMOX1* и *NFE2L2*, што је у складу са доступним литературним подацима (34), а што је додатно потврђено и у *in vivo* делу истраживања, коришћењем *ELISA* теста. Примена *SFN* статистички значајно повећава нивое *Nrf2* код пацова оба пола, посебно у *SFN* групама, где је примењена највиша доза *SFN*. *BMD* анализа је показала да примена 0,197 mg/kg т.м./дан *SFN* код женки пацова доводи до 5% повећања нивоа *Nrf2* док је код за исти ефекат код мужјака потребно применити 0,377 mg/kg т.м./дан *SFN*. *SFN* реагује са тиолним групама *Nrf2* протеина, формирајући тиоацил продукте који спречавају његову инактивацију, чиме се активира *Nrf2-Keap1-ARE* сигнални пут. Овај пут игра централну улогу у регулацији адаптивног одговора ћелија на оксидативни стрес, што потврђују бројна истраживања (35, 36). У *in vitro* и *in vivo* студијама показано је да *SFN* остварује значајан антиоксидативни потенцијал кроз активацију *Nrf2/HO-1* сигналног пута (37). Међутим, у спроведеном истраживању на мужјацима и женкама пацова, уочено је да *SFN* доводи до значајног смањења активности *SOD* и концентрације укупних *SH* група у ткиву јетре који претстављају параметре оксидативне заштите, док значајне промене у нивоу *IMA* и *MDA* нису забележене. Добијени резултати указују на смањени потенцијал антиоксидативне заштите у јетри третираних животиња што је даље потврђено патохистолошким анализом која је показала статистички значајно повећање оцене укупног микроскопског оштећења јетре у групи мужјака пацова третираних највишом испитиваном дозом *SFN* у односу на контролу. Супротно

томе, доступни литературни подаци и спроведена токсикогеномска анализа у оквиру ове докторске дисертације указују на потенцијал *SFN* да стимулише експресију и синтезу *SOD1* гена и протеина (38).

В.2. Токсичност инактивисане бактерије *Pseudomonas aeruginosa*

In silico анализа је показала да *PA-MSHA* реагује са генима укљученим у апоптозу и регулацију имунског одговора, укључујући *IFNG*, *IL-2*, *IL-6*, *IL-10*, *TNF* и *TLR4*, као и *AKT1*, *BCL2*, *KASP3*, *JUN* и *TP53*. Дејством на поменуте гене и њихове производе - цитокине, *PA-MSHA* регулише сигналне путеве као што су путеви тироидних хормона, интерлеукина и инфламацијом-индукована апоптозе. Ови резултати су подржани студијом Лиу и Дуан (2017), која је показала да *PA-MSHA* стимулише апоптозу у туморским ћелијама бешике и инхибира њихову пролиферацију и миграцију како *in vitro*, тако и *in vivo*. Механизам деловања укључује стимулацију М1 поларизације макрофага и повећану секрецију *IL-12*, *TNF α* и *IFN γ* , што даље повећава фагоцитну активност макрофага и супримира раст тумора (39). Такође, *PA-MSHA* регулише процес ћелијске апоптозе путем *AKT1*, *BCL2*, и *KASP3* гена, што утиче на баланс анти-апоптотских и про-апоптотских сигнала (40-42).

Чанг и сар. (2014) истражили су цитотоксични потенцијал *PA-MSHA in vitro* на три линије карцинома бешике (*T24*, *5637* и *HT-1376*). Они су утврдили да *PA-MSHA* у концентрацији од $0,9 \times 10^9$ ћелија/ml доводи до смрти 22,3% ћелија карцинома након 48 сати. Механизам деловања укључује активацију каспаза 3, 8 и 9 (43). Сличан ефекат уочен је у раду Цао и сар. (2016) на ћелијама карцинома плућа: *PC-9*, *A549* и *HCI-X1975*. Примена *PA-MSHA* у концентрацији од $1,25 \times 10^9$ ћелија/ml изазвала је смрт 25,78%, 26,08% и 21,11% третираних ћелија, редом, путем активације каспаза (44). Међутим, индукција каспаза није једини механизам антитуморских ефеката *PA-MSHA* према Ченг и сар. (2016) који су истражили утицај инактивисане бактерије на ћелије карцинома панкреаса, *PANC-1* и *SW1990* (45). У спроведеној докторској дисертацији уочен је сличан цитотоксични потенцијал при примени најниже и највише концентрације *PA-MSHA* на одабраним ћелијским линијама због чега се не може извести закључак да у *in vitro* показује цитотоксичност. Будући да *PA-MSHA* спада у групу имуномодулатора, за испољавање цитотоксичног ефекта потребан је другачији експериментални систем који укључује и ћелије имунског система.

Резултати испитивања акутне токсичности на ембрионима зебрица показали су да *PA-MSHA* у концентрацији већој од 0,3% ($5,4 \times 10^6$ ћелија/ml) индукције појаву кардиотоксичности, укључујући перикардијални едем и успоравање рада срца, као и појаву хепатотоксичности, односно некрозу јетре и одсуство ресорпције жуманцета код свих третираних ембриона. Моделовањем односа концентрација-одговор, израчуната је доња граница поузданости која може изазвати токсичност на нивоу кардиоваскуларног система, некрозу јетре и тератогене малформације ембриона зебрица, и она износи 0,342%, односно $6,15 \times 10^6$ ћелија/ml. Утицај на развој мехура примећен је код свих третиранх ембриона зебрица када је концентрација *PA-MSHA* била већа или једнака од 1% ($1,8 \times 10^7$ ћелија/ml). Додатно, моделовањем односа концентрација-одговор израчунато је да примена *PA-MSHA* у концентрацији већој од $7,78 \times 10^6$

ћелија/*ml* може утицати на развој мехура, органа који је хомолог плућима човека. Малформације код третиранх ембриона примећене су при концентрацијама већим од 0,3% ($5,4 \times 10^6$ ћелија/*ml*), док је израчуната *LC50* вредност износила $5,04 \times 10^7$ ћелија/*ml*, што је потврђено и моделовањем односа концентрација-одговор (*BMC* анализом) у којој је добијен интервал од $4,7 \times 10^7$ ћелија/*ml* до $5,66 \times 10^7$ ћелија/*ml*.

У испитивању на пацовима, у групама третираним *PA-MSHA* уочене су значајне промене у хематолошким параметрима у односу на контролу, у *PA-MSHA 1* групи забележен је пораст броја леукоцита, док је у *PA-MSHA 2* и *PA-MSHA 3* групама дошло до њиховог смањена. Процент моноцита, број еритроцита и ниво хематокрита били су значајно нижи у третираним групама у поређењу са контролом. Ефекат *PA-MSHA* на еритроците и хематокрит зависио је од дозе, што је потврђено *BMD* анализом, при чему је хематокрит осетљивији на дејство *PA-MSHA* у односу на број еритроцита. Промене у биохемијским параметрима анемије, нивоу гвожђа и концентрацији *TIBC* такође су уочене. *MCHC* је био значајно виши у третираним групама у односу на контролу, при чему је моделовањем односа доза-одговор потврђено да промене зависе од дозе. Висок ниво *MCHC* може бити последица оштећења јетре и појачане активности тироидне жлезде. Доргалалех и сар. (2013) су показали да особе са хипертироидизмом имају нижи ниво еритроцита, хемоглобина и *MCV* уз пораст *MCHC* (46). Слично томе, Ахмед и Мухамед (2020) су објаснили да се код жена чешће јављају поремећаји хематолошких параметара који су последица хиперактивности тироидне жлезде (47). Ово је у складу са резултатима добијеним у овој дисертацији, јер су женке пацова показале већу осетљивост на *PA-MSHA* када су у питању хематолошки и биохемијски параметри. Примена *PA-MSHA* сваког другог дана у клиничким студијама довела је до неутропеније и леукопеније (48, 49) што је у супротности са резултатима овог истраживања. Једно од објашњења је то што је у клиничким студијама испитиван ефекат *PA-MSHA* на пацијентима са карциномом код којих је имунски систем већ компромитован. Иако ниво гвожђа није промењен након третмана код женки пацова, *TIBC* је био нижи у *PA-MSHA* групама у односу на контролу, док је концентрација *UIBC* параметра била нижа у *PA-MSHA 2* у односу на *PA-MSHA 1*. Међутим, није пронађена веза између дозе *PA-MSHA* и *TIBC* или *UIBC* параметра. Код третираних мужјака пацова најосетљивији су били еозинофили. При примени $1e^{-6} \times 10^9$ ћелија/*ml* *PA-MSHA* (*BMDL*) уочен је пораст процента еозинофила код мужјака пацова, што указује на активацију *Th2* помоћних ћелија и могућу алергијску реакцију на *PA-MSHA*. Даље, третман *PA-MSHA* довео је до промена у концентрацији *LDL* и триглицерида у серуму мужјака и женки пацова. *BMD* анализом утврђено је да примењена доза *PA-MSHA* утиче на ниво *LDL* холестерола код женки пацова и концентрацију триглицерида код оба пола. *BMDL* вредности за триглицериде износиле су $0,0192 \times 10^9$ ћелија/*ml* и $1e^{-6} \times 10^9$ ћелија/*ml* за мужјаке и женке пацова, редом. У досадашњим литературним подацима није пронађена веза између примене *PA-MSHA* и параметара липидног статуса. Концентрација креатинина и мокраћне киселине, као и ниво калцијума, смањени су у третираним групама. Код женки пацова, смањење је зависило од дозе *PA-MSHA*. Пораст нивоа хлорида био је значајан само код мужјака пацова. Ови резултати указују да *PA-MSHA* ремети функције бубрега. Ниво албумина и концентрација алкалне фосфатазе били су нижи у третираним групама. Ниво алкалне фосфатазе зависио је од примењене дозе *PA-MSHA* код оба

пола, док је албумин показивао дозну зависност само код мужјака пацова. У будућим истраживањима неопходно је даље испитати утицај *PA-MSHA* на бубреге и јетру пацова ради разјашњавања механизма потенцијалних штетних ефеката. Након 28 дана експеримента, нивои *T3*, *T4*, *fT3* и *fT4* су квантификовани, а затим је израчунат однос *T3/T4*. Резултати су указали на полно специфичне хормонске одговоре на различите дозе *PA-MSHA*, али је однос *T3/T4* остао константан код оба пола, што сугерише да укупна хормонска равнотежа штитасте жлезде није нарушена. Даље, имајући у виду да примена *PA-MSHA* има за циљ активирање урођеног и стеченог имунског одговора, појачавајући одбрану организма (50), испитан је и њен утицај на продукцију протеина, укључујући про- и антиинфламаторне цитокине. Досадашње студије показале су да доза од $1,8 \times 10^9$ ћелија/*ml* *PA-MSHA* повећава нивое лимфоцита (51), док $0,9 \times 10^9$ ћелија/*ml* стимулише симултано ослобађање про- и антиинфламаторних цитокина, попут *TNF α* , *IL-1b*, *IL-6*, *IL-4* и *IL-10*, спречавајући прекомерну активност имунског система (52, 53). Секреција *IL-4* и *IL-10* инхибира *TLR-4/NF- κ B* сигнални пут, смањујући инфламацију, што је објашњено у студији Џанг и сар. (2019) (54). Слично томе, резултати ове докторске дисертације указују на способност *PA-MSHA* да стимулише секрецију проинфламаторних цитокина, *IL-2* и *IFN γ* , праћену појачаним ослобађањем антиинфламаторних цитокина, *IL-10* и *TGF β* , код мужјака и женки пацова. Концентрације *IFN γ* , *IL-10* и *TGF β* зависиле су од примењене дозе *PA-MSHA*, што је потврђено *BMD* анализом. Код женки пацова, најосетљивији параметар био је *TGF β* са *BMDL* вредношћу од $3,37e^{-5} \times 10^9$ ћелија/*ml*, док је код мужјака пацова то био *IFN γ* . Пораст нивоа *IFN γ* уочен је при примени $1e^{-6} \times 10^9$ ћелија/*ml* *PA-MSHA*. Додатно, код третираних женки пацова уочено је повећање активности *Nrf2* зависно од примењене дозе, са уским *BMDL/BMDU* интервалом, указујући на високу поузданост резултата. Супротно томе, Веи и сар. (2016) су показали да *PA-MSHA* третман у концентрацији од $0,848 \times 10^9$ ћелија/*ml* зауставља раст и изазива смрт ћелија тумора инхибицијом *Nrf2/p62* сигналног пута, што је потврђено на ксенографт моделу мишева (55). Пошто је највиша примењена доза *PA-MSHA* у овој дисертацији нижа од оне коришћене у студији Веи и сар. (2016), претпоставља се да третман изазива хорметички одговор *Nrf2*. Имајући у виду да прекомерна активација или инхибиција имунског одговора може довести до штетних ефеката, важно је поменути да добијени резултати указују на способност *PA-MSHA* за одржањем баланса у функционисању имунског система. Употреба *PA-MSHA* током 28 дана изазвала је повећање параметара оксидативног стреса, као што су *MDA* у плазми мужјака и женки пасова, и пад *IMA* и укупних *SH* група. У ткиву бубрега нису уочене значајне промене у оксидативним параметрима, али је у јетри мужјака и женки пасова забележено значајно повећање параметра *MDA*, што је зависило од примењене дозе. Моделовање односа доза-одговор показало је да су мужјаци осетљивији на *PA-MSHA*, с обзиром да нижа концентрација може довести до повећања нивоа *MDA* у ткиву јетре. Хистопатолошка анализа јетре пацова је указала на значајно смањење депозиције гликогена у *PA-MSHA* третираним групама у поређењу с контролом код мужјака и женки пасова, али је примењени третман повећао укупно микроскопско оштећење само у *PA-MSHA* 3 групи женки пасова. Односно, поменути резултати указују на потенцијал *PA-MSHA* да изазове оксидативно оштећење јетре код експерименталних животиња оба пола, што може бити последица повећане продукције проинфламаторних цитокина и стимулације имунских ћелија као што су

неутрофили. Међутим, новија истраживања показују да неутрофили играју важну улогу у репарацији јетре стимулацијом диференцијације макрофага из проинфламаторних M1 у антиинфламаторне M2 макрофаге, који доприносе репарацији ткива (56). У плућима мужјака пацова, *PA-MSHA* изазива повећање *IMA* параметра оксидације као и смањење *GSH*, односно смањује њихову антиоксидативну заштиту, што је у складу са резултатима забележеним на зебрицама. Ипак, паралелно се уочава и повећање активности *SOD* која штити плућа од оксидативног стреса. Слично томе, у срцу и тимусу тражених мушких пацова, уочен је раст свих мерених параметара оксидативног стреса/антиоксидативне заштите. Иако су нивои *IMA* и *MDA* повећани у поређењу с контролом, одбрамбени механизми као што су активност *SOD* и *GSH* такође су били виши у поређењу с контролом, па је структура тимусног ткива остала непромењена, што је потврђено патохистолошком анализом. Плућа, срце и тимус женки пацова показали су мању осетљивост на *PA-MSHA*. У тимусу третираних женки пацова, уочен је раст свих мерених параметара, али само су нивои *GSH* и *MDA* зависили од примењене дозе *PA-MSHA*, што је показано *BMD* анализом. Патохистолошка анализа код женки и мужјака пацова показала је да инактивисана бактерија не доводи до промена у ткиву тимуса и слезине женки пацова.

В.3. Токсичност комбиноване примене сулфорафана и инактивисане бактерије *Pseudomonas aeruginosa*

Спроведено истраживање је показало да *SFN* и *PA-MSHA*, два имуномодулатора, интерактују са генима који регулишу функционисање имунског система и процес апоптозе. *In silico* анализа показала је да *SFN* различито делује на нивоу *TNF* и *INFG*, што може зависити од дозе и дужине експозиције. Оба имуномодулатора повећавају експресију *CD14* протеина на M1 макрофагама, што указује на њихов утицај на фагоцитозу. Додатно, *SFN* и *PA-MSHA* стимулишу експресију *CASP3*, *CASP8* и *BAX*, утичући тако директно на процес апоптозе и што може бити у основи њиховог антитуморског ефекта.

Истивање цитотоксичног ефекта комбиноване примене *SFN* и *PA-MSHA* на две ћелијске линије хуманог карцинома колона, *HCT-116* и *HT-29* показало је да *SFN* диктира цитотоксичност при чему су *HCT-116* ћелије показале већу осетљивост на комбиновану примену имуномодулатора у поређењу са *HT-29* ћелијама. При комбинованој примени имуномодулатора уочено је смањено цитотоксично дејство комбинације *SFN* и *PA-MSHA* будући да је појединачна примена *SFN* довела до смрти већег броја третираних ћелија карцинома колона у односу на комбиновану примену *SFN* и *PA-MSHA*. Додатно, претретман малигних ћелија *SFN* довео је до смрти већег броја ћелија у односу на истовремену примену *SFN* и *PA-MSHA*.

При испитивању токсичности комбиноване примене *SFN* и *PA-MSHA* на ембрионима зебрица старости од 6 до 120 *hpf* користиле су се концентрације имуномодулатора које појединачно нису имале утицај на преживљавање ембриона, нити су индуковале знаке кардиотоксичности (перикардијални едем) или хепатотоксичности (редукована ресорпција жуманцета и некроза јетре). Летални ефекат је констатован при концентрацијама *SFN* $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ и *PA-MSHA* $\geq 0,25\%$, али је преживљавање у свим испитиваним комбинацијама било веће од

50%. Док су највеће концентрације без штетног ефекта појединачно примењених *SFN* и *PA-MSHA*, износиле $3 \mu\text{g/ml}$ и 0,3%, у комбинованом третману је највећа концентрација без штетног ефекта *SFN* била $1 \mu\text{g/ml}$, односно 0,1% *PA-MSHA* ($1,8 \times 10^6$ ћелија/*ml*). Према испитивањима на ембрионима зебрица *SFN* и *PA-MSHA* се могу безбедно комбиновати у концентрацији од $5 \mu\text{g/ml}$ *SFN* и до 0,1% *PA-MSHA*, односно 0,3% *PA-MSHA* ($5,4 \times 10^6$ ћелија/*ml*) и до $1 \mu\text{g/mL}$ *SFN*. При комбинацији већих концентрација имуномодулатора је најпре уочен утицај на развој мехура, а потом и утицај на ресорпцију жуманцета и појава некрозе јетре, као индикатора хепатотоксичности. Са друге стране, ни у једној примењеној комбинацији испитиваних имуномодулатора није уочена појава перикардијалног едема, односно знакова кардиотоксичности. Док појединачна примена *SFN* не доводи до појаве перикардијалног едема, *PA-MSHA* у концентрацији од $6,15 \times 10^6$ ћелија/*ml* изазива кардиотоксичност. Међутим, при комбинованој примени, изостанак кардиотоксичности, би се могао приписати кардиопротективном дејству изотиоцијаната. Истраживање Бонето и сар. (2022) показало је да интраперитонеална примена *SFN* побољшава кардијачну функцију након инфаркта миокарда код мишева (56). Концентрационо-зависни ефекат уочен је при испитивању тератогености, при чему су малформације ембриона забележене при примени $3 \mu\text{g/ml}$ *SFN* и 0,25% *PA-MSHA* ($4,5 \times 10^6$ ћелија/*ml*), док су моделовањем односа концентрација-одговор, израчунате минималне концентрације *SFN* ($4,69 \mu\text{g/ml}$) и *PA-MSHA* ($5,92 \times 10^6$ ћелија/*ml*) које могу довести до појаве тератогених ефеката при комбинованом третману.

Мужјаци пацова који су третирани највишим дозама *SFN* и *PA-MSHA* (*MIX 3*) показали су статистички значајан пораст телесне масе од 14% након 7 дана и 27% након 21 дана. Супротно томе, женке пацова у *MIX* групама, показале су смањење телесне масе у свим периодима третмана. Унос воде и хране варирао је током експеримента, при чему су третирани мужјаци уносили више воде и хране у односу на контролну групу, док је разлика код женки била мање изражена. Није уочена разлика између појединачне и комбиноване примене имуномодулатора на смањење телесне масе женки пацова. Што се тиче релативне масе органа, код мужјака је забележено повећање масе плућа у све три третиране групе, док је код женки примењено благо повећање слезине. Код женки пацова уочене су значајније промене хематолошких параметара у односу на мужјаке након комбиноване примене које би се могле преписати утицају инактивисане бактерије *Pseudomonas aeruginosa* будући да је и при појединачној примени изазвала сличне ефекте. Код мужјака пацова забележен је тренд пораста броја и процента лимфоцита у крви, са статистички значајним повећањем у *MIX 1* групи. У истој групи забележено је и смањење процента неутрофила и еозинофила у односу на контролу. Параметри анемије (број еритроцита, хемоглобин, хематокрит, *MCHC*, концентрација гвожђа и *TIBC*) били су нижи у *MIX 2* и *MIX 3* групи у односу на *MIX 1*, али не и у односу на контролу. Стога, комбинована примена *SFN* и *PA-MSHA* не доводи до анемије као појединачна примена инактивисане бактерије, већ може изазвати повећање наведених параметара при примени најнижих испитиваних доза ($0,5 \text{ mg/kg}$ т.м./дан и 9×10^7 ћелија/*ml*). Код женки пацова забележено је смањење броја еритроцита у свим третираним групама, са смањењем концентрације хемоглобина и хематокрита, као и повећањем *MCH* и *MCHC*. Нивои гвожђа и *TIBC* били су повећани само у *MIX* групи у односу на контролу, што указује на мегалобластичну

анемију (57). Код мужјака пацова, једина забележена промена након третмана комбинацијом испитиваних имуномодулатора била је у нивоу *T4* хормона. У свим третираним групама уочен је статистички значајан пораст у односу на контролну групу, али без промена односа *T3/T4* хормона у серуму. У погледу производње цитокина и осталих протеина анализираних у овој докторској дисертацији, *SFN* је стимулисао производњу *Nrf2* и *HO-1*, док је *PA-MSHA* утицао на про- и антиинфламаторне цитокине. Ефекат комбиноване примене имуномодулатора на праћене протеине код мужјака и женки пацова није био статистички значајан услед великих стандардних девијација у оквиру група. Забележен је пораст нивоа *IFN γ* код пацова оба пола у третираним групама, без значајних промена у нивоу *TNF α* . Ово делом одговара резултатима добијеним у *in silico* истраживању, где *PA-MSHA* стимулише експресију оба цитокина, док *SFN* инхибира *IFN γ* , а делује двојачко на *TNF α* . Стога, може се претпоставити да дозе *SFN* и *PA-MSHA* примењене у комбинацији нису биле довољно високе да спрече ефекат инактивисане бактерије на *IFN γ* , нити да изазову промене у нивоу *TNF α* . Додатно, уочено је смањење *IL-10* у третираним групама женки пацова, што може указати на израженији ефекат *SFN* на *IL-10* у односу на *PA-MSHA*. Стога, неопходно је даље истражити утицај комбиноване примене имуномодулатора на већи број протеина и антиинфламаторних цитокина, како би се боље разумео утицај *SFN* и *PA-MSHA* на имунски одговор. При примени комбинованог третмана имуномодулаторима код женки пацова, уочен је пораст параметара оксидативног стреса и антиоксидативне заштите у ткиву бубрега, што може бити узрок претходно описаних биохемијских промена функције бубрега. У ткиву тимуса забележен је пораст параметара *IMA*, *MDA* и *SOD*, слично резултатима код женки третираних само *PA-MSHA*. При патохистолошкој анализи није уочено оштећење ткива тимуса након комбинованог третмана. Комбинована примена имуномодулатора код пацова оба пола довела је до смањења одбрамбене способности плућа од слободних радикала, смањењем нивоа *GSH* у свим третираним групама, независно од примењене дозе. Насупрот томе, у ткиву срца је забележен статистички значајан пораст параметара антиоксидативне заштите, *GSH* и *SOD*, што се може објаснити кардиопротективним деловањем *SFN*. На крају, патохистолошка анализа ткива јетре и слезине је показала да комбинована примена имуномодулатора не изазива значајна оштећења.

На крају дискусије описани су и критични токсични ефекти појединачних имуномодулатора на основу израчунатих *BMDL* вредности при чему су се праћени цитокини и остали протеини, као и параметри оксидативног стреса/антиоксидативне заштите издвојили као најосетљивији на дејство *SFN* и *PA-MSHA*. Критични токсични ефекат *SFN* на основу израчунате вредности *BMDL* је смањење процента неутрофила код мужјака пацова (*BMDL*: 0,0105 mg/kg т.м./дан), односно повећање концентрације *SH* група у бубрезима женки пацова (*BMDL*: 0,00054 mg/kg т.м./дан). С друге стране, примена $0,00162 \times 10^9$ ћелија/ml *PA-MSHA* доводи до 5% повећања концентрације *TGF β* код мужјака пацова, док код женке пацова примена $0,00287 \times 10^9$ ћелија/ml *PA-MSHA* доводи до истог ефекта на нивоу концентрације *IFN γ* . *Benchmark* дозе за ефекте комбиноване примене имуномодулатора *SFN* и *PA-MSHA* праћене током испитивања субакутне токсичности код пацова нису утврђене.

Литература:

1. Maruyama T, Iizuka H, Tobisawa Y, Shiba T, Matsuda T, Kurohane K, et al. Influence of Local Treatments with Capsaicin or Allyl Isothiocyanate in the Sensitization Phase of a Fluorescein-Isothiocyanate-Induced Contact Sensitivity Model. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2007;143(2):144–54.
2. Matsuoka T, Endo Y, Kurohane K, Imai Y. Skin Sensitization to Fluorescein Isothiocyanate Is Enhanced by Butyl Paraben in a Mouse Model. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2018 Dec 1;41(12):1853–8.
3. Matsuda T, Maruyama T, Iizuka H, Kondo A, Tamai T, Kurohane K, et al. Phthalate esters reveal skin-sensitizing activity of phenethyl isothiocyanate in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2010 Jun;48(6):1704–8.
4. Ramzy AG, Hagvall L, Pei MN, Samuelsson K, Nilsson U. Investigation of diethylthiourea and ethyl isothiocyanate as potent skin allergens in chloroprene rubber. *Contact Dermatitis*. 2014 Dec 23;72(3):139–46.
5. Panwar H, Raghuram GV, Jain D, Ahirwar AK, Khan S, Jain SK, et al. Cell cycle deregulation by methyl isocyanate: Implications in liver carcinogenesis. *Environmental Toxicology*. 2012 Jan 5;29(3):284–97.
6. Zhang Q, Liu J, Duan H, Li R, Peng W, Wu C. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. *Journal of Advanced Research*. 2021 Dec;34(1):43–63.
7. Li Y, Yang M, Xie L, Zhang G, Xu J, Xu S. Sulforaphane alleviates postresuscitation lung pyroptosis possibly via activating the nrf2/ho-1 pathway. *Shock*. 2023 Jul 12;60(3):427–33.
8. Li D, Shao R, Wang N, Zhou N, Du K, Shi J, et al. Sulforaphane Activates a lysosome-dependent transcriptional program to mitigate oxidative stress. *Autophagy*. 2020 Mar 15;17(4):872–87.
9. Ibrahim Fouad G. Sulforaphane, an Nrf-2 Agonist, Modulates Oxidative Stress and Inflammation in a Rat Model of Cuprizone-Induced Cardiotoxicity and Hepatotoxicity. *Cardiovascular Toxicology*. 2023 Jan;23(1):46–60.
10. Shang H, Shih Y, Lee C, Hsueh S, Liu J, Liao N, et al. Sulforaphane-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells through extrinsic and intrinsic signal pathways and altering associated genes expression assayed by cDNA microarray. *Environmental Toxicology*. 2016 Feb 2;32(1):311–28.
11. Moon SJ, Jhun J, Ryu J, Kwon J ye, Kim SY, Jung K, et al. The anti-arthritis effect of sulforaphane, an activator of Nrf2, is associated with inhibition of both B cell differentiation and the production of inflammatory cytokines. *PLOS ONE*. 2021 Feb 16;16(2):e0245986.
12. Davis AP, Wieggers TC, Wieggers J, Wyatt B, Johnson RJ, Sciaky D, et al. CTD tetramers: a new online tool that computationally links curated chemicals, genes, phenotypes, and diseases to inform molecular mechanisms for environmental health. *Toxicological Sciences*. 2023 Jul 24;195(2):155–68.
13. Mahn A, Castillo A. Potential of Sulforaphane as a Natural Immune System Enhancer: A Review. *Molecules*. 2021 Feb 1;26(3):752.
14. Kazemi M, Kouhpeikar H, Delbari Z, Khodadadi F, Gerayli S, Iranshahi M, et al. Combination of auraptene and arsenic trioxide induces apoptosis and cellular accumulation in the subG1 phase in adult T-cell leukemia cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2021 Jan 12;24(12):1643–9.
15. Wang Y, Wu H, Dong N, Su X, Duan M, Wei Y, et al. Sulforaphane induces S-phase arrest and apoptosis via p53-dependent manner in gastric cancer cells. *Scientific Reports*. 2021 Jan 28;11(1).
16. Subedi L, Lee JH, Yumnam S, Ji E, Kim SY. Anti-Inflammatory Effect of Sulforaphane on LPS-Activated Microglia Potentially through JNK/AP-1/NF- κ B Inhibition and Nrf2/HO-1 Activation. *Cells*. 2019 Feb 22;8(2):194.
17. Rudolf E, Červinka M. Sulforaphane induces cytotoxicity and lysosome- and mitochondria-dependent cell death in colon cancer cells with deleted p53. *Toxicology in Vitro*. 2011 Oct;25(7):1302–9.
18. Coppola S, Ghibelli L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochemical Society Transactions*. 2000 Feb 1;28(2):56–61.

19. Fakhlaei R, Selamat J, Abdull Razis AF, Sukor R, Ahmad S, Khatib A, et al. Development of a zebrafish model for toxicity evaluation of adulterated Apis mellifera honey. *Chemosphere*. 2024 May;356(1):141736.
20. Scholz S, Fischer S, Gündel U, Küster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*. 2008 Jun 25;15(5):394–404.
21. Eom YS, Shah FH, Kim SJ. Sulforaphane induces cell differentiation, melanogenesis and also inhibit the proliferation of melanoma cells. *European Journal of Pharmacology*. 2022 Apr;921(1):174894.
22. Rajesh V, Ilanthilir S. Cognition Enhancing Activity of Sulforaphane Against Scopolamine Induced Cognitive Impairment in Zebra Fish (*Danio rerio*). *Neurochemical Research*. 2016 Jun 2;41(10):2538–48.
23. Rudzinska-Radecka M, Janczewski Ł, Gajda A, Godlewska M, Chmielewska-Krzesinska M, Wasowicz K, et al. The Anti-Tumoral Potential of Phosphonate Analog of Sulforaphane in Zebrafish Xenograft Model. *Cells*. 2021 Nov 18;10(11):3219.
24. Socała K, Nieoczym D, Kowalczyk-Vasilev E, Wyska E, Wlaź P. Increased seizure susceptibility and other toxicity symptoms following acute sulforaphane treatment in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2017 Jul;326(1):43–53.
25. Katoch O, Kumar A, Adhikari JS, Dwarakanath BS, Agrawala PK. Sulforaphane mitigates genotoxicity induced by radiation and anticancer drugs in human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013 Dec;758(1–2):29–34.
26. Iahtisham-Ul-Haq, Khan S, Awan KA, Iqbal MJ. Sulforaphane as a potential remedy against cancer: Comprehensive mechanistic review. *Journal of Food Biochemistry*. 2021 Aug 5;46(3).
27. Leung AKC, Lam JM, Wong AHC, Hon KL, Li X. Iron Deficiency Anemia: An Updated Review. *Current Pediatric Reviews*. 2024 Aug;20(3):339–56.
28. Panda H, Keleku-Lukwete N, Kuga A, Fuke N, Sukanuma H, Suzuki M, et al. Dietary supplementation with sulforaphane attenuates liver damage and heme overload in a sickle cell disease murine model. *Experimental Hematology*. 2019 Sep;77(1):51–60.e1.
29. Tian H, Xiong Y, Zhang Y, Leng Y, Tao J, Li L, et al. Activation of NRF2/FPN1 pathway attenuates myocardial ischemia–reperfusion injury in diabetic rats by regulating iron homeostasis and ferroptosis. *Cell Stress and Chaperones*. 2022 Mar;27(2):149–64.
30. Zhao HD. Sulforaphane protects liver injury induced by intestinal ischemia reperfusion through Nrf2-ARE pathway. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(24):3002.
31. Yang J, Guo X, Li T, Xie Y, Wang D, Yi L, et al. Sulforaphane Inhibits Exhaustive Exercise-Induced Liver Injury and Transcriptome-Based Mechanism Analysis. *Nutrients*. 2023 Jul 20;15(14):3220.
32. Rasha M, Huda A, May A, Maimoonah S, Khulud B, Noor A. Sulforaphane protects against LPS-induced liver injury in mice by antagonizing oxidative stress and apoptosis through AMPK activation. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2024 May 18;18(3):39–47.
33. Abassi P, Abassi F, Yari F, Hashemi M, Nafisi S. Study on the interaction of sulforaphane with human and bovine serum albumins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013 May;122(1):61–7.
34. Bai Y, Wang X, Zhao S, Ma C, Cui J, Zheng Y. Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015;2015(1):1–13.
35. Russo M, Spagnuolo C, Russo GL, Skalicka-Woźniak K, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, et al. Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017 Jul 21;58(8):1391–405.
36. Liu S, Pi J, Zhang Q. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway. *Redox Biology*. 2022 Aug;54(1):102389.
37. Zhang Q, Liu J, Duan H, Li R, Peng W, Wu C. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. *Journal of Advanced Research*. 2021 Dec;34(1):43–63.

38. Noh JR, Kim YH, Hwang JH, Choi DH, Kim KS, Oh WK, et al. Sulforaphane protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 2015 Jun;80(1):193–200.
39. Liu J, Duan X. PA-MSHA induces apoptosis and suppresses metastasis by tumor associated macrophages in bladder cancer cells. *Cancer Cell International*. 2017 Aug 17;17(1).
40. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013 Dec 20;15(1):49–63.
41. Zhang Y, Kong R, Yang W, Hu K, Zhao Z, Li L, et al. DUSP2 recruits CSNK2A1 to suppress AKT1-mediated apoptosis resistance under hypoxic microenvironment in pancreatic cancer. *Cancer Letters*. 2023 Aug;568(1):216288.
42. Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *Journal of Cell Biology*. 2022 May 12;221(6).
43. Chang L, Xiao W, Yang Y, Li H, Xia D, Yu G, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mannose-sensitive hemagglutinin inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway activation and induces apoptosis in bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2014 Jan;32(1):36.e11-36.e18.
44. Zhao X, Wu X, Yu W, Cai X, Liu Q, Fu X, et al. PA-MSHA inhibits proliferation and induces apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines with different genotypes. *Molecular Medicine Reports*. 2016 Oct 20;14(6):5369–76.
45. Cheng X, Wang B, Jin Z, Ma D, Yang W, Zhao R, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mannose-sensitive hemagglutinin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and induces apoptosis via the EGFR pathway and caspase signaling. *Oncotarget*. 2016 Oct 24;7(47):77916–25.
46. Dorgalaleh A, Mahmoodi M, Varmaghani B, Kiani Node F, Saeedi Kia O, Alizadeh S, et al. Effect of thyroid dysfunctions on blood cell count and red blood cell indice. *Iranian Journal of Pediatric Hematology & Oncology*. 2013 Apr 22;3(2):73–7.
47. Ahmed SS, Mohammed AA. Effects of thyroid dysfunction on hematological parameters: Case controlled study. *Annals of Medicine and Surgery*. 2020 Sep;57(1):52–5.
48. Gong Y, Zuo H, Zhou Y, Yu KD, Liu GY, Di GH, et al. Neoadjuvant *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin (PA-MSHA) and chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in patients with HER2-negative breast cancer: a randomized, controlled, double-blind trial. *Annals of Translational Medicine*. 2023 Mar;11(6):243–243.
49. Lv F, Cao J, Liu Z, Wang Z, Zhang J, Zhang S, et al. Phase II Study of *Pseudomonas aeruginosa*-Mannose-Sensitive Hemagglutinin in Combination with Capecitabine for Her-2–Negative Metastatic Breast Cancer Pretreated with Anthracycline and Taxane. *PLOS ONE*. 2015 Mar 13;10(3):e0118607.
50. Zheng X, Fang Y, Zou X, Wang X, Li Z. Therapeutic potential of *Pseudomonas aeruginosa*-mannose sensitive hemagglutinin (PA-MSHA) in cancer treatment. *Microbial Pathogenesis*. 2023 Dec;185(106422).
51. Zhao Y, Zhang Y, Liu J. Regulatory effect of *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin on inflammation and immune function in percutaneous nephrolithotomy patients with upper urinary tract calculi complicated with infection. *Frontiers in Immunology*. 2023 Jun 12;14(1).
52. Zhu H, Wang S, Shen L, Wang W, Zhao F, Cao T. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin (PA-MSHA) pretreatment on septic rats. *International Immunopharmacology*. 2013 Nov;17(3):836–42.
53. Zhou W, Duan Z, Yang B, Xiao C. The effective regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines induced by combination of PA-MSHA and BPIFB1 in initiation of innate immune responses. *Open Medicine*. 2017 Jan 1;12(1):299–307.
54. Zhang W, Sun J, Shen X, Xue Y, Yuan S, Wang X. Effect of PA-MSAH preprocessing on the expression of TLR-4-NF-κB pathway and inflammatory factors in the intestinal tract of rats with septic shock. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019 Feb 6;4(1):2567–74.

55. Wei Y, Liu D, Jin X, Gao P, Wang Q, Zhang J, et al. PA-MSHA inhibits the growth of doxorubicin-resistant MCF-7/ADR human breast cancer cells by downregulating Nrf2/p62. *Cancer Medicine*. 2016 Oct 18;5(12):3520–31.
56. Poletto Bonetto JH, Luz de Castro A, Fernandes RO, Corssac GB, Cordero EA, Schenkel PC, et al. Sulforaphane Effects on Cardiac Function and Calcium-Handling-Related Proteins in 2 Experimental Models of Heart Disease: Ischemia-Reperfusion and Infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2022 Mar;79(3):325–34.
57. Green R, Datta Mitra A. Megaloblastic Anemias. *Medical Clinics of North America*. 2017 Mar;101(2):297–317.

Г. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ САСТАВНИ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Радови објављени у научним часописима међународног значаја

Радови објављени у међународним часописима изузетних вредности (M21a)

1. **Božić D**, Baralić K, Živančević K, Antonijević Miljaković E, Ćurčić M, Antonijević B, Buha Djordjević A, Bulat Z, Zhang Y, Yang L, Đukić-Ćosić D. Predicting sulforaphane-induced adverse effects in colon cancer patients via in silico investigation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Feb 1;146:112598.
Назив часописа: *Biomedicine & Pharmacotherapy*
Импакт фактор (2022): 7.5
Категорија: M21a
Ранг часописа у области *Pharmacology & Pharmacy*: 22/278
2. **Božić D**, Živančević K, Baralić K, Antonijević Miljaković E, Buha Djordjević A, Ćurčić M, Bulat Z, Đukić-Ćosić D. Conducting bioinformatics analysis to predict sulforaphane-triggered adverse outcome pathways in healthy human cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;160:114316.
Назив часописа: *Biomedicine & Pharmacotherapy*
Импакт фактор (2023): 6.9
Категорија: M21a
Ранг часописа у области *Pharmacology & Pharmacy*: 22/278
3. Baralić K, Živanović J, Marić Đ, **Božić D**, Grahovac L, Antonijević Miljaković E, Ćurčić M, Buha Djordjević A, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Sulforaphane – a compound with potential health benefits in disease prevention and treatment: insights from pharmacological and toxicological experimental studies. *Antioxidants*. 2023;13:147.
Назив часописа: *Antioxidants*
Импакт фактор (2023): 6.0
Категорија: M21a
Ранг часописа у области *Chemistry, Medicinal*: 6/60

Радови објављени у врхунским међународним часописима (M21)

1. **Božić D**, Živanović J, Živančević K, Baralić K, Đukić-Ćosić D. Current trends in anti-tumor

effects of *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive-hemagglutinin (PA-MSHA): an overview of positive and negative effects. *Cancers*. 2024;16:524.

Назив часописа: *Cancers*

Импакт фактор (2024): 5.2

Категорија: M21

Ранг часописа у области *Oncology*: 72/242

Предавање по позиву са међународног скупа штампана у изводу (M32)

1. **Božić D**, Baralić K, Živančević K, Buha Đorđević A, Antonijević Miljaković E, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Zhang Y, Yang L, Đukić-Ćosić D. Predicting toxic effects of an immunomodulator, sulforaphane: Bioinformatic analysis. 13th International Congress of the Serbian Society of toxicology; 2023 May 10-12; Serbian Society of toxicology, Belgrade, Serbia: Book of Abstracts; 61-62p.

Саопштења са међународног скупа штампано у целини (M33)

1. **Božić D**, Živančević K, Baralić K, Javorac D, Buha Đorđević A, Antonijević Miljaković E, Marić Đ, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Applying „in silico“ toxicogenomic data mining to predict molecular mechanisms and pathways against carcinoma: immunomodulator sulforaphane as a case study. 1st International Conference on Chemo and BioInformatics, ICCBIKG 2021, (470-473). DOI: 10.46793/ICCBI21.470B

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

1. Đukić-Ćosić D, Baralić K, Živančević K, Buha Đorđević A, Antonijević Miljaković E, Ćurčić M, Javorac D, Marić Đ, Bulat Z, Antonijević B, **Jorgovanović D**. Investigating the sulforaphane safety: in silico toxicogenomic data mining approach. Abstracts of the 6th Croatian Congress of Toxicology with International Participation, CROTOX 2021, Rabac, Croatia, 3-6 October 2021.
2. **Božić D**, Živančević K, Baralić K, Tavrić J, Plankoš A, Ćurčić M, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Mechanistic studies of sulforaphane induced toxicity: in silico approach. Toxicology Letters Official Journal of EUROTOX, Abstracts of the Toxicology Letters Official Journal of EUROTOX, Abstracts of the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) Maastricht, the Netherlands, September 18–21, 2022. *Toxicol Lett*, 368S1 (2022), p87.
3. Živanović J, Šljivić J, **Božić D**, Baralić K, Živančević K, Marić Đ, Antonijević Miljaković E, Buha Đorđević A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Predicting sulforaphane-induced adverse effects in prostatic cancer patients via in silico investigation. Abstracts of the 57th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX); 2023 September 10-13; Ljubljana, Slovenia: Elsevier; 2023. 114p. (*Toxicology Letter*; vol. 384S1).
4. **Božić D**, Baralić K, Živanović J, Živančević K, Đukić-Ćosić D. Comparative study of positive and negative sulforaphane activity against different tumor types via bioinformatic analysis. Abstracts of the 57th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX); 2023 September 10-13; Ljubljana, Slovenia: Elsevier; 2023. 115p.

- (Toxicology Letter; vol. 384S1).
5. **Božić D**, Baralić K, Živanović J, Živančević K, Marić Đ, Vukelić D, Manić L, Grahovac L, Ćurčić M, Antonijević Miljković E, Buha Djordjević A, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Sulforaphane and sulforaphane - glucosinolate toxicity prediction using the in silico US-EPA comptox chemicals dashboard method. 13th International Congress of the Serbian Society of toxicology; 2023 May 10-12; Serbian Society of toxicology, Belgrade, Serbia: Book of Abstracts; 155-156p.
 6. Đurić A, Srdić-Rajić T, **Božić D**, Baralić K, Pavić A, Đukić-Ćosić D. Sulforaphane affects morphological changes and cell viability of colon cancer cells: p53 mutation-dependent effect. 13th International Congress of the Serbian Society of toxicology; 2023 May 10-12; Serbian Society of toxicology, Belgrade, Serbia: Book of Abstracts; 179-180p.
 7. Pavić A, Radaković N, Srdić-Rajić T, **Božić D**, Baralić K, Đukić-Ćosić D. Toxicity testing of D,L-sulforaphane in a zebrafish model. 13th International Congress of the Serbian Society of toxicology; 2023 May 10-12; Serbian Society of toxicology, Belgrade, Serbia: Book of Abstracts; 253-254p.
 8. **Božić D**, Baralić K, Živančević K, Marić Đ, Vukelić D, Živanović J, Manić L, Grahovac L, Pavić A, Radaković N, Antonijević Miljković E, Buha Djordjević A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Improving anti-cancer immunotherapy efficacy by combining immune modulators. 13th International Congress of the Serbian Society of toxicology; 2023 May 10-12; Serbian Society of toxicology, Belgrade, Serbia: Book of Abstracts; 290-291p.
 9. Živanović J, Baralić K, **Božić D**, Živančević K, Marić Đ, Antonijević Miljković E, Buha Djordjević A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Sulforaphane's link with obesity: insights from in silico analysis on key genes, pathways and gene ontology. XII Congress of Toxicology in Developing Countries, 2024 April 15-18; Sanitijago, Čile.
 10. Živanović J, Baralić K, **Božić D**, Pavić A, Živančević K, Marić Đ, Antonijević Miljković E, Buha Djordjević A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Applying a dual-method approach to test sulforaphane's hepatotoxicity: zebrafish embryo and in silico investigation. XII Congress of Toxicology in Developing Countries, 2024 April 15-18; Sanitijago, Čile.
 11. **Božić D**, Pavić A, Baralić K, Živanović J, Živančević K, Đukić-Ćosić D. Applying benchmark approach to assess the safety of D,L-sulforaphane in zebrafish embryos. XII Congress of Toxicology in Developing Countries, 2024 April 15-18; Sanitijago, Čile.
 12. Baralić K, Marić Đ, **Božić D**, Živanović J, Antonijević Miljković E, Buha Djordjević A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Gender-specific effects of 7-day orally administered D,L-sulforaphane on bodyweight and food consumption in rats. XII Congress of Toxicology in Developing Countries, 2024 April 15-18; Sanitijago, Čile.
 13. Baralić K, **Božić D**, Marić Đ, Živanović J, Živančević K, Antonijević Miljković E, Buha Djordjević A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Exploring thyroid effects and gender - specific responses to *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin (PA-MSHA): a rat model study. ECE 2024, 26th European Congress of Endocrinology, 11-14 May 2024, Stockholm, Švedska.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у целини (M63)

1. **Božić D**, Živančević K, Baralić K, Javorac D, Marić Đ, Buha Đorđević A, Bulat Z, Đukić-Ćosić D. Toxic potential of *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin: in

Silico investigation of adverse outcomes in cancer patients. Macedonian Pharmaceutical Bulletin, 68 (Suppl 1): 371 – 372 p.

2. Živančević K, **Božić D**, Baralić K, Ćurčić M, Antonijević Miljković E, Antonijević B, Đukić- Ćosić D. In silico prediction of physicochemical, pharmacokinetic and toxicological properties of sulforaphane. Macedonian Pharmaceutical Bulletin, 68 (Suppl 1): 331 – 332 p.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

1. Živančević K, Baralić K, **Božić D**, Javorac D, Marić Đ, Antonijević Miljković E, Buha Đorđević A, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Predviđanje štetnih efekata sulforafana in silico ispitivanjem njegovog ciljanog dejstva na gene, protein-protein interakcije i klase molekula. VIII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 12-15 oktobar 2022. Arhiv za farmaciju, 4S: p592
2. **Božić D**, Baralić K, Živančević K, Đukić-Ćosić D. Toksični potencijal kombinovane primene sulforafana i pseudomonas aeruginosa - hemaglutinin osetljiv na manozu kod pacijenata obolelih od raka. VIII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 12-15 oktobar 2022. Arhiv za farmaciju, 4S: p60

Д. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата магистра фармације Драгице Божић састоји се из *in silico* испитивања токсичности и токсикогеномичке анализе података имуномодулатора *SFN* и *PA-MSHA*, затим *in vitro* испитивања њиховог цитотоксичног потенцијала, као и из *in vivo* испитивања појединачне и комбиноване примене *SFN* и *PA-MSHA* на два експериментална модела, ембрионима зебрица и пацовима. Упоређени су токсични ефекти и разјашњени механизми токсичности појединачне у односу на комбиновану примену *SFN* и *PA-MSHA* и утврђени гранични нивои токсичности који представљају основу за даљи одабир доза при њиховој комбинованој примени.

Извршена је провера оригиналности докторске дисертације, а добијена вредност за *Similarity index* износи 17%. Овај степен подударности последица је мањих подударности у деловима реченица које су делови раније објављених радова, библиографских података о коришћеној литератури, објашњења начина спровођења експеримената, као и коришћења сличних израза код материјал и метода. Сходно томе, може се извести закључак да је приложена докторска дисертација кандидата магистра фармације Драгице Божић оригинално научно дело.

Резултати ове докторске дисертације показали су да појединачна, као и комбинована примена испитиваних имуномодулатора, *SFN* и *PA-MSHA* изазива различите токсичне ефекте. Показано је да испитивани имуномодулатори појединачно и при комбинованој примени утичу на имунски одговор дејством на *IFN γ* *in silico* и *in vivo*, као и на апоптозу *in vitro*, што може бити у основи њихових позитивних, али и негативних ефеката. Утицај на развој мехура представља критичан токсични ефекат на ембрионима зебрице за *SFN*, док је за *PA-MSHA* то ефекат на раст и развој, хепатотоксичност и кардиотоксичност. Комбинована примена *SFN* и *PA-MSHA*

индукује штетне ефекте на ембрионима зебрице у концентрацијама у којима појединачне супстанце нису испољиле штетан ефекат. Праћени ефекти (хематолошки, биохемијски параметри, нивои хормона, продукција цитокина и других протеина и параметри оксидативног статуса) у *in vivo* испитивању на пацовима показују дозну-зависност. Критичан токсични ефекат *SFN* је смањење процента неутрофила, а за *PA-MSHA* повећање концентрације трансформишућег фактора бета код мужјака пацова. Додатно, резултати испитивања на експерименталним животињама показују да су ефекти комбиноване примене *SFN* и *PA-MSHA* слични ефектима појединачне примене *PA-MSHA*. *SFN* је умањио штетне ефекте *PA-MSHA* на нивоу јетре, као што је смањење депоновања гликогена, али не и штетне ефекте на параметре анемије и бубрега при комбинованој примени. Добијени резултати разјашњавају механизме токсичности појединачне и комбиноване примене испитиваних имуномодулатора, а утврђени гранични нивои токсичности за појединачне имуномодулаторе представљају основу за даљи одабир доза при њиховој комбинованој примени.

Подаци представљени у овој докторској дисертацији дају оригинални допринос бољем сагледавању и разумевању токсиколошких профила имуномодулатора *SFN* и *PA-MSHA*, као и њихове комбиноване примене. Досадашња истраживања показују да испитивани имуномодулатори поседују антитуморски потенцијал, али и бројна позитивна дејства на нивоу имунског и кардиоваскуларног система. Међутим, њихов токсиколошки профил није био потпуно разјашњен због чега је циљ ове докторске дисертације био да се утврди потенцијална токсичност, механизми настанка токсичних ефеката као и гранични нивои токсичности појединачне и комбиноване примене *SFN* и *PA-MSHA*. Самим тим, добијени резултати представљају значајан научни допринос на пољу праћења токсичних ефеката, механизма токсичности и критичних токсичних ефеката испитиваних имуномодулатора што пружа полазну основу за даља разматрања њихове комбиноване примене у терапији малигних обољења.

Ћ. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Детаљном анализом приложене докторске дисертације Комисија је констатовала да је дисертација приказана на јасан и прегледан начин и да су постављени циљеви реализовани. Свему наведеном иде у прилог и чињеница да су из ове докторске дисертације до сада публиковани резултати у оквиру два рада у међународним часописима, категорије M21a. Такође, публикована су и два прегледна рада, један категорије M21a и један категорије M21 који су у области предмета истраживања ове докторске дисертације. На основу свега изложеног, Комисија сматра да је кандидат испунио постављене захтеве у докторској дисертацији под називом „*In silico, in vitro* и *in vivo* испитивање токсичности комбиноване примене имуномодулатора сулфорафана и инактивисане бактерије *Pseudomonas aeruginosa*“, те предлажемо Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати извештај и упути га Већу научних области медицинских наука, ради добијања сагласности за јавну одбрану.

У Београду, 8. јула 2024. године

Чланови комисије

др сц. Биљана Антонијевић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

др сц. Зорица Булат, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

др сц. Маријана Ђурчић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

др сц. Зорица Стојић-Вуканић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

др сц. Татјана Срдих-Рајић, научни саветник,
Институт за онкологију и радиологију Србије,
Београд

