

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА**

КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Наставно-научно веће Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду, на седници одржаној 23.06.2022. године именовало је Комисију за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата магистра фармације-медицинског биохемичара Катарине Баралић (одлука 01. број 1451/1), пријављеној и одобреној за израду под насловом:

Токсичност смеше фталата и бисфенола А и процена протективног дејства пробиотика на моделима пацова и зебрице

Ментор: Др сц. Данијела Ђукић-Ћосић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Комисија у саставу:

1. Др сц. Биљана Антонијевић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
2. Др сц. Александра Буха Ђорђевић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
3. Др сц. Маријана Ђурчић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
4. Др сц. Александар Павић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

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 Катарине Баралић под насловом „***Токсичност смеше фталата и бисфенола А и процена протективног дејства пробиотика на моделима пацова и зебрице***“, написана је јасним и прегледним стилем на 140 стране, формата А4, фонтом *Times New Roman*, величине 12 и једноструким проредом. У склопу дисертације приказано је укупно 38 табела, 33 слике и 372 литературна навода. Дисертација садржи следећа поглавља: Увод, Хипотезе и циљеве истраживања, Материјал и методе, Резултате, Дискусију, Закључци и

Литературу. На почетку дисертације представљен је Сажетак рада на српском и енглеском језику, садржај, списак слика и списак табела, 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 5 делова: (1) Ендокрини ометачи, (2) Фталати, (3) Бисфенол А, (4) Смеша фталата и бисфенола А и (5) Протективно дејство пробиотика. На почетку уводног дела дат је осврт на свеprisутност хемикалија у животној средини и изложеност људи, указујући на значај испитивања токсичности смеша на традиционалан начин на експерименталним животињама, али и све више коришћеним алтернативним методама испитивања токсичности. Указано је на значај испитивања штетног дејства супстанци на ендокрини систем и да се међу тзв. ендокриним ометачима издвајају фталати и бисфенол А (*BPA*), за које је у уводном делу описана структура и примена, изложеност људи, токсикокинетика, токсичност, као и регулатива. Наведен је значај бис(2-етилхексил) фталата (*DEHP*) и дибутил фталата (*DBP*), који су међу фталатима најчешће истраживани и сматрају се најзаступљенијима у животној средини, а испољавају токсичност сличним механизмима и имају највећи утицај на развој различитих поремећаја. У последња два одељка Уводног поглавља приказан је значај испитивања смеше фталата и бисфенола А (*BPA*) и описан је потенцијал протективног дејства пробиотика у умањењу штетних ефеката хемикалија.

Хипотезе и циљеви истраживања су јасно дефинисани – испитати токсичност смеше *DEHP*, *DBP* и *BPA* у односу на токсичност појединачних супстанци на два експериментална модела, пацовима и зебрицама, као и додатно разјаснити механизам токсичности смеше применом *in silico* истраживања анализом токсикогеномичких података, истражујући повезаност изложености смеси ових токсичних супстанци са развојем различитих болести. Такође, докторска дисертација имала је за циљ утврдити потенцијалну ефикасност пробиотика у умањењу штетних ефеката испитиване смеше токсичних супстанци код пацова и зебрица.

У поглављу **Материјал и методе** описане су експерименталне животиње, као и експериментални протоколи испитивања на пацовима и зебрицама са детаљним описом примене одређених доза и концентрација испитиваних фталата и *BPA*, наведене су коришћене хемикалије и реагенси, методолошки поступци обраде и припреме узорака, методе за анализу или праћење одабраних параметара и статистичка обрада резултата добијених у *in vivo* испитивању, као и методе коришћене за *in silico* токсикогеномичку анализу података. Додатно, описано је извођење *in vitro* испитивања ради процене утицаја пробиотика на смањење концентрације *DEHP*, *DBP* и *BPA*.

In vivo испитивање на моделу пацова изведено је на мужјацима *Wistar* пацова подељеним у контролну групу, која је примала кукурузно уље, и 6 третираних група ($n=6$), које су субакутно (28 дана), оралном гаважом биле изложене следећим третманима: (1) *DEHP* (50 mg/kg т.м/дан), (2) *DBP* (50 mg/kg т.м/дан), (3) *BPA* (25 mg/kg т.м/дан), (4) смеша испитиваних супстанци (*MIX*; 50 mg/kg т.м/дан *DEHP* + 50 mg/kg т.м/дан *DBP* + 25 mg/kg т.м/дан *BPA*), (5) смеша испитиваних супстанци у комбинацији са пробиотиком (*MIX* + *P*; 50 mg/kg т.м/дан *DEHP* + 50 mg/kg т.м/дан

DBP + 25 mg/kg т.м/дан BPA + $8.78 * 10^8$ CFU/kg/дан пробиотика чији састав чине: *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* LP 6595 и *Lactobacillus plantarum* HEAL9) и (6) само пробиотик (P). Током трајања експеримента бележени су свакодневно унос хране и воде, 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)), параметри оксидативног стреса/антиоксидативне заштите (тотални антиоксидативни статус (TAS), тотални оксидативни статус (TOS), супероксидни анјон радикал (O_2^-), активност ензима супероксид димутаза (SOD), узнапредовали продукти оксидације протеина (енгл. *Advanced oxidation protein products*, AOPP), малондиалдехид (MDA) и укупне сулфхидрилне групе (SH)) у крвној плазми и ткивима органа (јетра, бубрези, тестиси, панкреас, слезина, мозак, срце, плућа, тимус), концентрације биоелемената (гвожђе (Fe), бакар (Cu) и цинк (Zn)) у ткивима органа (јетра, бубрези, тимус, плућа, срце), а анализиран је и утицај фталата и BPA на очуваност структуре ткива (јетра, тестиси, слезина, бубрези и мозак). 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, параметара оксидативног стареса/антиоксидативне заштите спектрофотометријским и имунохемијским методама, као и поступци припреме узорка у микроталасној пећници, као и одређивања концентрације Fe, Cu и Zn у ткивима пламеном атомском апсорпционом спектрофотометријом. 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 праћен је у случају дистрибуције која није била нормална. 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*).

In silico токсикогеномичка анализа података извршена је помоћу следећих јавно доступних база података, софтвера и алата: Компаративна токсикогеномичка база података (енгл. *Comparative Toxicogenomics Database*, CTD; <http://CTDbase.org>) и, у оквиру ње, алати *Batch Query*, *Set Analyzer*, *MyGeneVenn*, *MyVenn* и *VennViewer*. *Cytoscape* (<https://cyTOScape.org>) софтверски пакет и следећи *Cytoscape* додаци: *GeneMania* (<https://apps.cyTOScape.org/apps/genemania>),

CytoHubba (<https://apps.cyTOScape.org/apps/cytohubba>), *ClueGO* + *CluePedia*. Такође, коришћен је *ToppGene Suite* портал (<https://toppgene.cchmc.org>), *DisGeNet* база података (<https://www.disgenet.org>) и *ShinyGO* портал (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>). Помоћу дијаграма тока дат је приказ корака спроведене *in silico* анализе утицаја смеше *DEHP/DBP/BPA* на развој различитих болести, попут оштећења јетре, најзначајнијег органа за испитивање токсичности, затим поремећаја мушког репродуктивног система и оштећења тестиса, који је циљни орган токсичности за испитивану смешу, а потом и других болести, попут дијабетес мелитуса типа 2, астме и гојазности.

Токсични ефекти *DEHP*, *DBP* и *BPA* и њихове смеше, као и потенцијални протективни ефекат пробиотика, праћени су и након петодневне изложености ембриона зебрица различитим концентрацијама ових супстанци. Ембриони зебрица анализирани су на преживљавање, токсичност на раст и развој, ототоксичност, кардиотоксичност и хепатотоксичност (некроза, хепатомегалија, поремећај активности ензима). Такође, испитана је дозна зависност хепатотоксичних ефеката смеше *DEHP/DBP/BPA*, као и потенцијално протективно дејство пробиотика на преживљавање, токсичност на раст и развој, ототоксичност, кардиотоксичност, и хепатотоксичност код ембриона зебрица третираних смешом *DEHP/DBP/BPA*.

У поглављу **Резултати** приказани су табеларно или графички оригинални резултати добијени у истраживању. Дат је детаљан опис *in vivo* резултата на два модела, пацовима и зебрицама, као и резултата *in silico* истраживања о утицају испитиване смеше токсичних супстанци на развој различитих поремећаја и болести. Резултати испитивања протективног дејства пробиотика приказани су засебно, уз навођење добијених *in vitro* резултата и потенцијала пробиотика да смањи концентрације испитиваних фталата и *BPA*, као и *in vivo* добијених резултата о протективном дејству пробиотика на пацовима и зебрицама.

У поглављу **Дискусија** приказана је детаљна анализа добијених резултата ове дисертације, у контексту доступних литературних података. Организована је у два целине. У првој целини дискутовани су добијени резултати *in vivo* испитивања на два експериментална модела као и *in silico* резултати о утицају испитиване смеше фталата и бисфенола А на развој различитих поремећаја, тј. болести. Другим речима, примењен је интегративан приступ у анализи добијених резултата и литературних података. Идентификовани молекурани механизми токсичности дискутовани су по утврђеној значајности према *in silico* резултатима уз разматрање добијених резултата код пацова и зебрица. У другој целини дискусије, резултати о протективном дејству пробиотика добијени у *in vitro* испитивању и *in vivo* испитивању на пацовима и зебрицама анализирани су у односу на доступне податке из литературе.

У поглављу **Закључци** изнети су релевантни закључци који проистичу из резултата спроведеног истраживања и њихове анализе, како у погледу испитивања токсичности смеше *DEHP/DBP/BPA*, тако и у погледу дела истраживања којим је процењено протективно дејство пробиотика у умањењу штетних ефеката испитиване смеше токсичних супстанци на моделима пацова и зебрице.

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 испитивања токсичности појединачних супстанци (*DEHP*, *DBP* и *BPA*) и поређења са токсичношћу њихове смеше, на моделу пацова и зебрице, као и резултати *in silico* токсикогеномичке анализе података.

Најпре су приказани резултати субакутне студије на *Wistar* пацовима – прираст масе, унос хране и воде, хематолошки и биохемијски параметри, нивои хормона, резултати патохистолошке анализе, параметри оксидативног статуса/антиоксидативне заштите и нивои биоелемената (*Fe*, *Cu* и *Zn*) након 28 дана пероралне изложености.

Резултати су показали да је смеша изазвала значајне промене у прирасту телесне масе, уносу хране и воде, липидном профилу, биохемијским параметрима повезаним са функцијом јетре и нивоу глукозе. Када је о хематолошким параметрима реч, промене у највећем броју параметара у односу на контролну групу забележене су у групи животиња које су примале смешу токсичних супстанци (повишен број леукоцита, лимфоцита, неутрофила, моноцита, еритроцита, концентрација хемоглобина, хематокрит и *MCHC*). Од биохемијских параметара повезаних са функцијом јетре, у *MIX* групи забележено је значајно повишење *ALT*, *AST* и укупног билирубина у поређењу са контролом, док је активност *ALT* била значајно нижа у групама које су примале појединачне супстанце у односу на групу која је примала смешу. У *MIX* групи дошло је до значајног повишења нивоа урее у поређењу са контролом. Пораст нивоа глукозе у поређењу са контролном групом забележен је не само у *MIX*, већ и у *DEHP* и *DBP* групи. Од параметара липидног профила значајно смањење нивоа холестерола забележено је у *DEHP*, *DBP* и *MIX* групама, док су *LDL* и триглицериди били значајно повишени у *DBP* и *BPA* групама у поређењу са контролом. У поређењу са *MIX* групом, холестерол је био значајно виши у *BPA* групи, док су триглицериди били значајно повишени не само у *BPA*, већ и у *DBP* групи. Даље, у поређењу са смешом показали су се супротни ефекти појединачних супстанци на ниво *T4*, као и израженији ефекат смеше на ниво тестостерона. Резултати патохистолошке анализе указали су на израженију токсичност *MIX* групе на ткиво тестиса (десквамоване ћелије герминалног епитела, увећане ћелије са хиперхроматским језгрима, вишенуклеарне ћелијске форме и интрацитоплазматске вакуоле) у поређењу са појединачним супстанцама. Све три испитиване супстанце и њихова смеша изазвале су патохистолошке промене у ткиву јетре, које су укључивале умерену синусоидну дилатацију у лобулусима претежно око централне вене. У групи која је примала смешу јавила се и блага експанзија портних простора, повећан број инфламаторних ћелија (лимфоцити, у мањем броју еозинофили), што је указивало на портни хепатитис. Промене у ткиву слезине јавиле су се у свим третираним групама осим *DBP*, док су код групе која је примала смешу токсичних супстанци биле најизраженије. Код ткива бубрега, примећен је фокални губитак руба тубулоцита четкастог покрива у бубрежним тубулима у *DEHP* и *MIX* групи, приликом чега су

појединачни тубули били лако проширени. У ткиву мозга нису примећене промене у односу на контролу ни код група које су примале појединачне супстанце, нити код група које су примале смешу. Анимална студија потврдила је повезаност смеше са настанком оксидативног стреса у различитим ткивима пацова. Такође, показано је да су промене у параметрима оксидативног стреса/антиоксидативне заштите присутне само у *MIX* групи (*TOS* и *SOD* у плазми, O_2^- , *MDA* и *SH* групе у тестису, *TOS* у јетри, *TOS*, *SOD*, *SH* групе у панкреасу, *MDA* и *SH* групе у слезини и *TOS* и O_2^- у тимусу) или израженије у односу на друге третиране групе (*MDA* у плазми, јетри, бубрезима и панкреасу, *TAS*, *TOS* и *SOD* у тестисима, *SOD* и *AOPP* у плућима и *TAS* у тимусу). Што се нивоа мерених биоелемената тиче, промене у односу на контролну групу су се такође јавиле само у *MIX* групи (*Fe* у јетри и тимусу и *Zn* у плућима) или су биле израженије у односу на друге третиране групе (*Zn* у јетри и тимусу).

У експерименту на ембрионима зебрица, све испитиване супстанце изазвале су малформације у виду деформитета главе, очију и отолита, кардиотоксичност и хепатотоксичност. На основу добијеног *EC50*, *DBP* је имао најизраженији токсични ефекат, затим *BPA* и *DEHP*. За разлику од појединачне изложености, смеша је била знатно токсичнија. Сви ембриони су угинули након тродневне изложености смеси *DEHP*, *DBP* и *BPA* у дозама од 20 + 20 + 10 $\mu\text{g/mL}$, редом. Дејство *BPA* на смањење индекса површине јетре (енгл. *Liver area index*, *LA*) било је дозно-зависно. *DEHP* (< 2 $\mu\text{g/mL}$) и *DBP* (\leq 5 $\mu\text{g/mL}$) су смањили вредности *LA* индекса, док су њихове више концентрације довеле до повећања овог параметра. Хепатотоксични ефекат смеше био је усмерен на *BPA*. Према утврђеним вредностима *BMDL*, концентрације више од 0,55 $\mu\text{g/mL}$ (за *DEHP* и *DBP*) и 0,275 $\mu\text{g/mL}$ *BPA* могу довести до 5% смањења *LA* индекса када су ове три супстанце присутне у смеси.

In silico резултати указали су на повезаност *DEHP*, *DBP* и *BPA* са 75, 20, 44, 24 и 31 заједничким геном укљученим у развој оштећења јетре, поремећаја мушког репродуктивног система, дијабетес мелитуса типа 2 (*T2DM*), астме и гојазности, редом. Утицаји на метаболизам, арил угљоводонични рецептор пут, апоптоза и оксидативни стрес издвојени су као најзначајнији механизми укључени у субакутну токсичност смеше *DEHP*, *DBP* и *BPA* на мушки репродуктивни систем. Апоптоза и оксидативни стрес издвојени су као главни механизми и *T2DM* и астме, док је инфламација додатно била укључена у развој астме. Гени *CCL2*, *IL6*, *LPL*, *PPARG*, *SERPINE1*, *TNF* издвојени су као потенцијални биомаркери за испитивање утицаја *MIX* на развој гојазности.

Други сегмент испитивања у склопу ове докторске дисертације био је усмерен на тестирање потенцијалног протективног дејства пробиотика против токсичности смеше *DEHP*, *DBP* и *BPA*. *In vitro* испитивање смањења концентрације ових супстанци под утицајем пробиотика потврдило је способност вишекомпонентног пробиотика да умањи концентрацију 29,25, 29,04 и 41,75% *DEHP*, *DBP* и *BPA*, редом, показавши се бољим од појединачног соја (*Saccharomyces boulardii*), који је умањio концентрације испитиваних супстанци свега 16,79, 15,66 и 15,63% *DEHP*, *DBP* и *BPA*, редом. Даље, у анималној студији на пацовима, вишекомпонентни пробиотик је смањio системско запаљење и деловао протективно на јетру, бубреге, слезину, тестисе, липидни статус и ниво глукозе у серуму. Готово је у потпуности анулирао промене у биохемијским, хематолошким и хормоналним параметрима и ублажио промене у релативној маси јетре, потрошњи хране и патохистологији органа. Вишекомпонентни пробиотик умањio је промене параметара оксидативног стреса проузроковане субакутном изложеношћу пацова смеси

DEHP/DBP/BPA (*TAS* и *SOD* у тестисима, *MDA* у слезини, *SOD* у плућима), или их чак у потпуности отклонио (*SOD* и *SH* у плазми, *TOS*, *SOD* и *MDA* у тестисима, *TOS* и *MDA* у јетри, *MDA* у бубрезима, *TOS*, *SOD* и *MDA* у панкреасу, *SH* групе у слезини, *AOPP* у плућима, *TOS*, *TAS* и *SH* групе у тимусу). Такође, вишекомпонентни пробиотик ублажио је промене у нивоу биоелемената настале након субакутне изложености пацова смеси *DEHP*, *DBP* и *BPA* (*Zn* и *Fe* у тимусу), или их у потпуности отклонио (*Zn* и *Fe* у јетри и *Zn* у плућима). У експерименту на ембрионима зебрица спроведеном у склопу ове докторске дисертације такође је забележено протективно дејство пробиотика. *Saccharomyces boulardii* није испољио видљиво протективно дејство против ефеката смеше *DEHP/DBP/BPA* на раст и развој, док је вишекомпонентни пробиотик испољио врло јасно протективно дејство, приликом чега су сви ембриони зебрица изложени највишим концентрацијама ове три супстанце у смеси преживели. Међутим, није успео у потпуности да отклони кардио- и хепатотоксичне ефекте. Такође, при највишој дози испитиваних супстанци присутних у смеси, једино су ембриони зебрица третирани највишом концентрацијом и вишекомпонентним пробиотиком преживели, иако са видљивим токсичним ефектима: развојем перикарднијалног едема и нересорбованог жуманцета и готово неприметном флуоресценцијом јетре.

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. Као и резултати, дискусија је подељена у две главне целине – (1) испитивање токсичности *DEHP*, *DBP*, *BPA* и њихове смеше, и (2) испитивање протективног дејства пробиотика. Први део дискусије је, осим анализе добијених резултата који се односе на прираст масе, унос хране и воде, инфламације проузроковане испитиваним супстанцама и њихвом смешом, липидног профила, функције јетре, бубрега и тиреоидних хормона, био усмерен на испитивање молекуларних механизма развоја оштећења јетре, поремећаја мушког репродуктивног система, дијабетеса, астме и гојазности. У оквиру дискусије повезаност ових болести са испитиваним смешом ендокриних ометача примењен је интегративни приступ, при чему су резултати добијени у *in vivo* испитивањима на моделима пацова и зебрице дискутовани и разматрани заједно са резултатима *in silico* анализе.

В.1. Токсичност фталата, бисфенола А и њихове смеше

На основу резултата добијених у оквиру ове докторске дисертације, прираст масе пацова био је значајно нижи у свим представљеним временским периодима у свим третираним групама у поређењу са контролом, са изузетком *DEHP* групе. У овој групи је прираст телесне масе био знатно нижи тек након прве недеље третмана. Забележено је смањење телесне масе пацова из *BPA* групе у готово свим представљеним временским периодима, као и у случају укупног прираста телесне масе. Унос хране у *MIX* групи био је значајно нижи у поређењу са контролом у сва четири представљена испитивана периода, док је у *DEHP* групи био нижи тек након прве недеље третмана. Статистички значајна разлика у укупном уносу хране била је уочена у свим третираним групама у поређењу са контролом, нижа у *DEHP* и *MIX* групи и виша у *DBP* и *BPA* групи. Смањен

унос воде и хране примећен је у *MIX* групи, праћен знатно нижим прирастом телесне масе у поређењу са контролом. Међутим, није било значајне разлике у прирасту телесне масе између *MIX* и *DEHP*, *DBP* и *BPA* група. Резултати су упоређени са студијом у којој су пацови примали вишу дозу, 1000 mg/kg т.м/дан *DEHP* током 10 дана, где је такође показано снижење телесне масе након 10 дана изложености *DEHP* [1]. Такође, у студији од 90 дана, забележено је снижење телесне масе након 30 дана примене смеше фталата (*DEHP*, *DBP*, диметил фталат (DMP), диетил фталат (DEP), бутил бензил фталат (BBP) и ди-*n*-октил фталат (DNOP)). Свака од компоненти смеше била је примењена у једнакој количини, при чему је доза за сваку од ових супстанци износила 26,7 mg/kg т.м/дан током 90 дана [2]. Иста група аутора забележила је смањење телесне масе пацова након примене три различите дозе исте смеше фталата (1,6, 16 и 160 mg/kg т.м/дан) током 15 недеља [3].

На основу измерених хематолошких параметара у оквиру ове докторске дисертације, примећено је да су *DEHP*, *DBP* и *MIX* групе проузроковале значајан пораст нивоа лимфоцита, док није било значајне разлике у *BPA* групи у поређењу са контролом. Ово, заједно са нивоом *CRP*, значајно повишеним у овим групама, могло би се повезати са системском инфламацијом ниског степена изазваном испитиваним супстанцама, што је у складу са резултатима добијеним у студији у којој је *DEHP* примећен у дози 0, 5, 50 и 500 mg/kg т.м/дан током 8 недеља довео до повећања маркера инфламације (*IL-1 β* и *TNF-a*) [4]. Штавише, аутори још једне студије на пацовима известили су о високој корелацији између концентрације антитела против тироидне пероксидазе и степена лимфоцитне инфилтрације штитасте жлезде након пет недеља изложености *DBP* у дозама од 5 и 50 mg/kg т.м/дан [5,6].

У студији на пацовима у оквиру ове докторске дисертације примећен је пад нивоа холестерола у *DEHP*, *DBP* и *MIX* групи у поређењу са контролом, док је ниво холестерола у *BPA* био значајно виши у поређењу са *MIX* групом. Концентрација триглицерида била је значајно повишена у *DBP* и *BPA* групама у поређењу са контролом. Ови налази могу се упоредити са резултатима 13-недељне студије на пацовима, у којој су *Majeed* и сар. (2017) показали снижење нивоа холестерола у серуму након примене исте дозе *DBP* (50 mg/kg т.м/дан) [7]. У *BPA* групи примећено је благо, али не и значајно повишење холестерола, док су нивои *LDL* и триглицерида били значајно повишени. *Abdel-Wahab* и сар. (2014) такође су известили о порасту *LDL* и триглицерида након оралне примене ниже дозе *BPA* (10 mg/kg т.м/дан) у току истог временог периода. У студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације примећен је значајан пораст укупног холестерола. Нису примећене значајне промене у нивоу триглицерида, *LDL* и *HDL* у поређењу са контролом након примене *DEHP* током 28 дана. Ови резултати су у складу са резултатима студије у којој су мужјаци пацова били изложени 7,5 и 75 mg/kg т.м/дан током 30 дана, у којој такође није забележена значајна промена у истим параметрима липидног профила [9].

У студији на моделу пацова у оквиру ове докторске дисертације забележена је статистички значајна повишена вредност укупног билирубина, *AST* и *ALT* у *MIX* групи, као и благо, али не и статистички значајно смањење *De Rihterovog* односа. У *DEHP* групи забележен је значајан пораст само активности *ALP*, заједно са порастом релативне масе јетре. Резултати патохистолошког истраживања установили су да све три испитиване супстанце, као и њихова меша, могу изазвати дегенеративне промене у ткиву јетре, као што је благо проширење синусоида у лобулусима,

углавном око централне вене. Поред тога, *DEHP* и *MIX* довели су до благог увећања и повећања броја инфламаторних ћелија. Истраживање у коме је пацовима апликовано 0,05, 5 и 500 *mg/kg DEHP* дневно током 8 недеља показало је да дозе *DEHP* које изазивају оштећење јетре доводе првенствено до повећања инфламације и едема [10]. Након излагања мишева истој дози *DBP* у истом временском периоду као у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације (50 *mg/kg* т.м/дан током 28 узастопних дана), примећен је едем ћелија јетре, синусоидна вена била је сужена, а централна проширена, што је такође праћено повећањем *ROS* и *MDA* у ткиву јетре [11]. Слично, *Zhang* и сар. (2021) су показали да *DBP* (апликован пацовима у току 6 недеља у дози од 5 *mg/kg* т.м/дан) доводи до повећања *MDA* и смањења активности *SOD*, док су уочене хистолошке промене као што су агрегација инфламаторног фактора, делимична фузија хепатоцита и фокална некроза [12]. *Elswefy* и сар. (2016) установили су да доза *BPA* двоструко виша од оне која је коришћена у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације (50 *mg/kg* т.м/дан), давана одраслим пацовима током 8 недеља, изазива фиброзу јетре, доводи до повећања активности *ALT* и *AST* у серуму, као и концентрације хидроксипролина у јетри [13]. Многе од поменутих студија трагале су за везом између уочених хистолошких промена и оксидативног стреса као једног од главних узрока оштећења јетре под дејством хемикалија. *In silico* истраживање спроведено у оквиру ове докторске дисертације показало је повезаност између испитиване смеше и поремећаја оксидативног статуса, што се могло приметити у издвојеним заједничким генима, биолошким процесима, као и молекуларним функцијама. У *in vivo* експерименту спроведеном у оквиру ове докторске дисертације, од измерених параметара оксидативног стреса/антиоксидативне заштите и биоелемената, могло се приметити да су одређене промене биле или најизраженије, или присутне само у *MIX* групи, што указује на могуће адитивне ефекте. *TOS* и *Fe* били су повишени само у *MIX* групи, док су промене *MDA* и *Zn* биле најизраженије у групи која је примала смешу токсичних супстанци. Иако нису биле статистички значајне, добијене су благе промене у *TAS*, који је био нешто нижи у *DBP* и *MIX* групама у поређењу са другим групама. Слично, нивои *SOD* и *SH* група били су најнижи у *MIX* групи. *Zhao* и сар. (2021) установили су да *DEHP*, у дозама вишим него у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације (500 или 1000 *mg/kg*), изазива хепатомегалију, повећава активност *OH[•]* и нивое *MDA* и *H₂O₂*, заједно са поремећајем хомеостазе ензимског система цитохрома P450 (*CYP450*). Ови аутори су закључили да *DEHP*-индуковане *ROS* активирају нуклеарне ксенобиотичке рецепторе (*NKSRs*), који укључују арил угљоводонични рецептор (*AHR*), прегнан X рецептор (*PXR*), као и конститутивни андростан рецептор (*CAR*) [14]. Ово је у складу са резултатима *in silico* студије у овој докторској дисертацији, чији резултати су истакли *AHR* као један од најзначајнијих гена, при чему је *DEHP* био способан да повећа експресију *AHR iRNK*, као и експресију протеина. *Ha* и сар. (2016) додатно су показали да *DEHP* доводи до оксидативног стреса у јетри, који би могао посредовати у апоптози код хепатотоксичности изазване дејством *DEHP* код пацова којима је свакодневно орално апликована ова супстанца (250, 500 и 750 *mg/kg* т.м/дан) током 30 дана [15]. Према *Hasanu* и сар. (2012), *BPA* може побољшати производњу *ROS* и смањити нивое експресије антиоксидативних гена у ткиву јетре, доводећи до хепатотоксичности која је испитивана након оралне примене *BPA* (0,1, 1, 10, 50 *mg/kg* т.м/дан) пацовима у току четири недеље. У њиховој студији, група од 50 *mg/kg* т.м/дан *BPA* (што је двоструко виша доза од оне примењене у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације) имала је значајно ниже нивое сукцинат

дехидрогеназе (*SDH*), *SOD*, глутатион пероксидазе (*GPx*), глутатион *S*-трансферазе (*GST*), глутатион редуктазе (*GSR*) и активности каталазе (*CAT*) [16]. Када је у питању ремећење нивоа биоелемената, *Aydemir* и сар. (2018) сугеришу да се оно може сврстати у важне механизме оштећења јетре изазвана *DEHP*. У њиховој студији, пацовима је даван *DEHP* у знатно вишим дозама него у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације (0, 100, 200 и 400 *mg/kg* т.м/дан). Откривено је да је излагање *DEHP* довело до смањења садржаја натријума и других биоелемената, као и повећања садржаја *Fe* у серуму. Међутим, у њиховом експерименту нису примећене значајне промене у ткиву јетре [17]. Ово није у складу са резултатима представљеним у овој докторској дисертацији, имајући у виду да су испитиване супстанце довеле до промена и у нивоу *Zn* и *Fe*. *Erkekoglu* и сар. (2015) су такође проучавали утицаје више дозе *DEHP* (1000 *mg/kg*) примењене на пацовима *per os* током 10 дана на концентрације биоелемената у плазми, јетри и бубрезима. Нивои селена (*Se*) и *Zn* у крви били су знатно нижи у поређењу са контролом, као и *Se*, *Cu* и мангана (*Mn*) у бубрезима и *Fe* у јетри [18]. С друге стране, *Nair* (2015) је открио повећање нивоа *Cu* и *Zn* у ткиву тестиса након третмана *DBP* у дозама од 500, 1000 и 1500 *mg/kg* т.м/дан [19].

У студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације, од испитиваних појединачних супстанци *DEHP* је једини изазвао фокални губитак четкастог покрива тубулоцита, док је у групи која је примала смешу токсичних супстанци додатно примећена и лакостепена дилатација тубула. Поред тога, примећено је значајно повећање релативне тежине бубрега и нивоа уреје само у *MIX* групи у поређењу са контролном. Благо, али не значајно повећање нивоа мокраћне киселине примећено је у *DEHP*, *DBP* и *MIX* групи. Неке од студија из литературе показале су да фталати и *BPA* могу узроковати оштећење бубрежног ткива [17,20–22]. *Aydemir* и сар. (2018) сугерисали су интеракцију *DEHP* са нивоом биоелемената, поготово *Se*, као један од механизма оштећења бубрега изазваног овим једињењем. Ови аутори су уочили повишену концентрацију *Se* у ткиву бубрега у односу на контролу у групи која је примала 200 *mg/kg DEHP* [17]. *Erkekoglu* и сар. (2015) истраживали су утицај 1000 *mg/kg* т.м/дан *DEHP* на пацовима, приликом чега су у ткиву бубрега нивои *Se*, *Cu* и *Mn* били значајно снижени [18]. Ово је у складу са резултатима приказаним у овој докторској дисертацији, где је након примене ниже дозе фталата (50 *mg/kg* т.м/дан *DEHP*) током 28 узастопних дана, иако не значајно, концентрација *Cu* била нижа у *MIX* групи у поређењу са свим осталим третираним групама и контролом. Међутим, није примећена значајна промена у ткиву бубрега ни за један од других испитиваних биоелемената. Такође, у оквиру ове докторске дисертације испитивани су и параметри оксидативног статуса/антиоксидативне заштите у ткиву бубрега. Поред повишења *MDA*, у бубрежном ткиву неких од третираних група забележено је и благо, иако не значајно смањење активности *SOD* и повећање $O_2^{\cdot-}$ у односу на контролу. С друге стране, *Gu* и сар. (2021) забележили су повећане нивое *ROS* и *MDA*, смањене нивое *GSH* у бубрезима миша након излагања нижој дози *DEHP* него у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације (0,05 *mg/kg* т.м/дан) у трајању пет недеља, као и повишен ниво инфламаторних цитокина (*TNF- α* и *IL-6*) [21]. *Erkekoglu* и сар. (2012) известили су да је *DEHP* (1000 *mg/kg* т.м/дан) након 10 дана изложености изазвао оксидативни стрес у бубрезима пацова и приметили смањење активности *GPX* и *SOD*, као и нивоа *GSH*, заједно са значајним смањењем садржаја тиола [20].

У студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације, функција штитасте жлезде испитивана је мерењем садржаја *T3* и *T4* у серуму. У *DBP* и *BPA* групама забележен је значајан пад *T4* хормона у поређењу са контролом. У студији на пацовима од стране *Wu* и сар. (2017), смањење нивоа *T3* и *T4* демонстрирано је након пет недеља пероралне изложености истој дози *DBP* (50 mg/kg т.м/дан) као у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације. Супротно резултатима приказаним овом докторском дисертацијом, пораст нивоа *T4* забележен је у студији у којој су пацови орално третирани нешто вишом дозом *BPA* од оне примењене у нашем експерименту (40 mg/kg т.м/дан) током 15 дана [23]. У истој студији, ниво *T3* је остао непромењен, док је однос *T3/T4* био снижен у третираној групи у односу на контролну [23]. *Sun* и сар. (2018) нису приметили разлику у нивоу *T4* и *T3* при истој дози као у експерименту у склопу ове докторске дисертације (50 mg/kg т.м/дан), али су забележили смањене нивое *T3* и *T4* у серуму након изложености много вишој дози *DEHP* (500 mg /kg т.м/дан) током 28 дана [24]. С друге стране, резултати приказане докторске дисертације показали су значајно више нивое *T4* у *MIX* групи у поређењу са контролом, приликом чега се код изложености смеши јавио супротан ефекту у поређењу са појединачним супстанцама. Слични резултати су примећени у студији у којој су пацови третирани истом дозом *DBP* у комбинацији са имунизацијом тиреоглобулином [5], при чему су показани нижи нивои *T3* и *T4* у групама које су примале само *DBP*, док је смеша *DBP* и тиреоглобулина изазвала супротан ефекат, значајно повисивши нивое ових хормона [5]. У истраживању у склопу ове докторске дисертације, сличан образац јавио се и у *MIX* групи, у којој је ниво *T4* био повишен, заједно са смањењем односа *T3/T4*.

У студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације, ниво тестостерона у серуму мерен је као један од маркера андрогене активности. Резултати су указали су на значајан пад овог параметра у поређењу са контролом само у *MIX* групи, док није било значајне разлике у групама које су примале појединачне супстанце (*DEHP*, *DBP* и *BPA*) у поређењу са контролом, иако се благи тренд снижења овог хормона могао забележити и код њих, иако не статистички значајан. Ефекти појединачних фталата на производњу тестостерона испитани су у различитим студијама, али углавном након пренаталне изложености. *Furr* и сар. (2014) истраживали су утицај различитих фталата, укључујући *DEHP* и *DBP*, на постнаталну феталну производњу тестостерона, демонстрирајући смањење нивоа тестостерона након примене и *DEHP* и *DBP* у дози од 100 mg/kg т.м/дан гравидним женкама у периоду између 14. и 18. дана гестације [25]. Утицај *BPA* на ниво тестостерона испитан је на препубертетским пацовима након субкутане изложености *BPA* (0, 20, 100 и 200 mg/kg т.м/дан) током 6 недеља. Овом студијом показано је да до снижења нивоа тестостерона у серуму долази тек након примене виших доза (100 и 200 mg/kg т.м/дан), што је у складу са резултатима студије спроведене у оквиру ове докторске дисертације [26]. Дозно адитивни ефекти приказани су за смешу фталата на основу њиховог утицаја на синтезу феталног тестостерона. У својој експерименталној студији на пацовима, *Howdeshell* и сар. (2015) указали су на адитивне токсичне ефекте на раст и развој након изложености пацова смеши 5 фталата, укључујући и *DEHP* и *DBP* [27]. *Zhang* и сар. (2013) показали су да смеша *DBP* и *BPA* доводи до повећања нивоа експресије гена полних хормона у поређењу са контролном групом, што указује на адитивни или синергистични ефекат [28]. Адитивни ефекат такође је потврђен у експериментима са смешом која је садржала три фталата, *BBP*, *DBP* и *DEHP*, у комбинацији са другим антиандрогенима [29]. Адитивност смеше фталата и *BPA* истражена је и у студији у којој

је испитивана антиандрогена активност бинарних смеша фталата и/или *BPA* (*BBP* + *DBP*, *DBP* + диетил фталат (*DEP*) и *DEP* + *BPA*) на ћелијама карцинома дојке човека (*MDA-kb2*) [30]. У студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације, патохистолошка анализа показала је да су се, у све три групе које су примале појединачне супстанце, у узорцима тестиса могли приметити лако атрофични семиниферни тубули и смањена дебљина герминативног епитела, као и нарушени континуитет сперматогенезе. Међутим, у *MIX* групи, ове промене биле су присутне у свим узорцима. *Abdel-Maksouds* и сар. (2019) показали су да *BPA* и *DEHP*, појединачно, имају способност да поремете развој герминативних ћелија и производњу сперме код мушког потомства када се примењују на gravidним женкама од 12 до 21 дана гестације у дозама од 2,5 или 25 mg/kg т.м/дан и 5, односно 50 mg/kg т.м/дан, редом [31], при чему је *BPA* довео је до атрофије семиниферних тубула, смањења броја герминативних ћелија и уливања ћелија у цевasti лумен у семиниферним тубулима, док је третман *DEHP* прузроковао жаришна подручја губитка полних ћелија и интерстицијску ћелијску хиперплазију између семиниферних тубула [31]. Поред тога, *Oudir* и сар. (2018) показали су одсуство зрелих сперматозоида у тестисима пацова након свакодневне изложености *DEHP* (0,5 и 5000 mg/kg т.м/дан) од 21. до 120. постнаталног дана. Додатно, закључили су да постнатална изложеност малим дозама *DEHP* утиче не само на број сперматозоида, већ и на број Сертолијевих и Лејдигових ћелија и ниво тестостерона [32]. Међутим, промене у броју Сертолијевих и Лејдигових ћелија нису примећене у истраживању у склопу приказане докторске дисертације, вероватно услед краћег времена изложености, као и због тога што се експозиција није десила током значајних развојних фаза, што је случај у студијама више генерације и давање фталата и *BPA* gravidним женкама. У студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације мерени су различити параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите у хомогенатима различитих ткива, па и тестисима пацова. Резултати су потврдили способност испитиване смеше да изазове различите токсичне ефекте у већој мери у поређењу са појединачним супстанцама. Док је у неким случајевима (нпр. *TOS*, *TAS*, *SOD*) ефекат примећен у *MIX* групи био израженији од ефекта појединачних супстанци, у другим случајевима ефекат је био присутан само у *MIX* групи (пораст O_2^- и ниво *MDH* и смањење укупних *-SH* група). Даље, иако су се значајне промене могле забележити у *TAS* и *TOS* параметрима у неким групама појединачних супстанци (*DEHP* и *BPA* у случају *TOS* и *DEHP* у случају *TAS*), пораст *OSI* јавио се само у *MIX* групи, што указује на највећи степен оксидативног оштећења међу третираним групама. У експерименталној студији на моделу пацова, перорална примена *DEHP* у концентрацијама вишим од оних у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације (1 или 2 g/kg т.м/дан током 7 дана) довела је до повећања генерације *ROS*, смањења *GSH* у ткиву тестиса, као и концентрације аскорбинске киселине, што је било праћено селективном индукцијом апоптозе сперматоцита и атрофијом тестиса [33]. Слично резултатима ове докторске дисертације, *Kasahara* и сар. (2002) закључили су да је апоптоза у тестисима индукована дејством *DEHP* примећена првенствено код сперматоцита, али не и код Сертолијевих ћелија [33]. Код пацова перорално изложених *DEHP* (1 mg/kg т.м/дан) током 4 недеље примећено је значајно повећање активности *GSH-Px*, као и повећање нивоа *ROS*. Налик на резултате редокс анализе спроведене у склопу ове докторске дисертације, забележен је пораст O_2^- [34]. Способност *DBP* да индукује оксидативни стрес у ткиву тестиса доказана је експериментом у којем су пацови третирани са *DBP* у дозама од 200, 400 или 600 mg/kg т.м/дан током 15 узастопних дана. Третман *DBP* смањив

је укупни антиоксидативни капацитет у серуму и изазвао дегенерацију ткива тестиса, одсуство сперматогенезе и сперматозоида, као и некрозу у неким од семиниферних тубула [35]. Међутим, у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације, услед много ниже дозе *DBP*, није било промена у редокс параметрима уочених након 28 дана третмана овом супстанцом. Такође, *Kasahara* и сар. (2002) показали су да орална примена *DEHP* (1 или 2 g/kg т.м/дан током 7 дана) повећава стварање *ROS*, смањује нивоа *GSH* у ткиву тестиса, као и аскорбинске киселине, док селективно индукује апоптозу сперматоцита и води до атрофије овог органа [33]. У студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације, иако је био примењен у нижој дози, *DEHP* је довео до неколико промена параметара редокс статуса, као што су повећање *TOS* и смањење *TAS* и *SOD*.

In silico истраживање спроведено у склопу ове докторске дисертације показало је да би се све три хемикалије могле везати за естрогени рецептор и довести до повећане активности *ESR1* протеина. Ово је у складу са литературним подацима, који наводе да ова једињења могу имитирати естрадиол и *in vitro* и *in vivo* [36,37]. Даље, подаци из *CTD* базе показали су да *DEHP* и *BPA* могу и да повећају и да смање активност *ESR1*, док је *DBP* само довео до повећања активност овог гена. За *BPA*, ово је добро илустровано у експерименту у коме је гравидним женама пацова орално апликован *BPA* од 6. дана гестације до окота. Аутори су закључили да *BPA* може изазвати промене у уrogenиталном синусу фетуса и развоју уrogenиталног тракта глодара мушког пола путем естрогених механизма само када је присутан у ниским дозама [38]. Штавише, утврђено је да све три супстанце утичу на *AR*, што је такође могло да се потврди подацима из литературе. *Takeuchi* и сар. (2005) показали су да фталати са алкилним ланцима у дужини од *C3* до *C6* интерагују са *AR* [39], док су *Lee* и сар. (2003) показали да *BPA* делује као антагониста *AR* инхибирајући транскрипциону активност андрогеног рецептора индуковану андрогенима [40].

Резултати *in silico* истраживања спроведеног у склопу ове докторске дисертације сугерисали су да би се апоптоза могла сматрати једним од главних механизма токсичности на које утиче смеша *DEHP*, *DBP* и *BPA*. Резултати експеримента *Sun* и сар. (2018) у којем је мужјацима мишева интрагастрично апликован *DEHP* (0, 100, 200 или 400 mg/kg т.м/дан) током 21 дана, показали су да је оксидативни стрес укључен у апоптозу индуковану путем *DEHP* и аутофагију Лејдигових *TM3* ћелија миша чак и након краћег времена изложености него у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације, при чему је закључено да је механизам којим *DEHP* може индуковати апоптозу у тестисима повећање нивоа активираних каспазе-3, каспазе-8 и *Bax* и смањењем нивоа *Bcl-2* [41].

Биоинформатичка анализа спроведена у оквиру ове докторске дисертације открила је да су све три испитиване супстанце биле у интеракцији са генима који кодирају и про-апоптотске (*BAX*) и анти-апоптотске чланове протеинске породице *Bcl2* (*BCL2*), укључене у интринзични или апоптотски пут зависан од митохондрија [42]. Такође, утврђено је да све три супстанце делују на *CASP3* и *CASP8*. *Sun* и сар. (2015) показали су да *DEHP* испољава токсичне ефекте на ћелије инсулинома тако што изазива апоптозу, док дозно-зависно смањује секрецију инсулина [43]. Штавише, истраживањем ефеката *DEHP*, *DBP* и њихове смеше на ћелије инсулинома пацова, *Li* и сар. (2021) показали су да комбиновани ефекат *DEHP* и *DBP* промовише настанак *ROS* и апоптозу β -ћелија панкреаса посредовану *PI3K/Akt/Bcl-2* молекуларним путем [44]. *Lin* и сар.

(2013) установили су измењену експресију чланова породице *Bcl-2* и каспаза у ћелијама инсулинома након изложености *BPA*, док је апоптоза изазвана дејством *BPA* била повезана са митохондријалним дефектима у β -ћелијама, што је доказано смањењем *ATP*, ослобађањем цитохрома *C*, губитком митохондријалне масе и мембранског потенцијала, и променама у експресији гена укључених у функцију и метаболизам митохондрија [45]. У складу са резултатима *Li* и сар. (2021), који је предложио међусобну везу између апоптозе и оксидативног стреса изазваног смешом фталата, наша анализа молекуларних путева такође је показала да је један од механизма помоћу којих смеша *DEHP*, *DBP* и *BPA* може изазвати апоптозу настанак реактивних оксидативних врста. Гени за које је утврђено да су укључени у апоптозу изазвану слободним радикалима укључују *RELA*, *TNF*, *NFKB1*, *SOD1* и *GPKS1*.

In silico резултати у оквиру ове докторске дисертације указују на присуство 24 гена укључена у развој астме заједничка за све три испитиване супстанце. Издвојена су три главна механизма укључена у развој астме повезана са смешом *DEHP/DBP/BPA* (апоптоза, инфламација и оксидативни стрес). *Trautmann* и сар. (2005) сугеришу да Т лимфоцити и еозинофили доприносе индукцији апоптозе епителних ћелија бронхија секрецијом *IFN- γ* и *TNF- α* и активирањем рецептора смрти, тиме доводећи до одвајања епителних ћелија код астме [46]. У представљеним резултатима биоинформатичке анализе у оквиру ове докторске дисертације, откривене су различите везе са оксидативним стресом како у најзначајнијим издвојеним биолошким процесима, тако и у молекуларним функцијама. У спроведеном *in vivo* истраживању претпоставка да смеша фталата и *BPA* може изазвати промене редокс статус параметара у ткиву плућа и тимуса након субакутне изложености показала се тачном. Код неких параметара (*SOD* и *AOPP* у ткиву плућа, *TAS* и *OSI* у ткиву тимуса, као и *MDA* у ткиву бубрега) промена је била најизраженија у *MIX* групи, док су у другим случајевима (*TOS*, O_2^- и *SH* групе у ткиву тимуса) промене уочене само у *MIX* групи. Даље, иако није било значајне промене у *SOD* активности, овај параметар је био најнижи у *MIX* групи. Тако је смеша испитиваних супстанци смањила активност *SOD* и у тимусу и у плућном ткиву. Ово се поклапа са *in silico* резултатима, који сугеришу да су све три супстанце способне да смање експресију *iRNK* гена *SOD*, док *DEHP* и *DBP* такође могу смањити активност протеина *SOD1*. У литератури су студије спроведене на животињама показале да од ових супстанци, посебно фталати могу имати додатни утицај на развој алергијске астме, док је оксидативни стрес предложен као главни механизам који стоји иза овог феномена [47–49]. У овим студијама, овалбумин (*OVA*) се најчешће користио за изазивање алергијске астме. *Vi* и сар. (2014) истраживали су ефекат *DEHP* адјуванса у моделу мишје астме након примене дозе ниже него у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације (30 mg/kg т.м/дан) у краћем временском периоду (18 дана). У хомогенатима ткива плућа, ови аутори су приметили значајно смањење нивоа глутатиона у групи која је примала *DEHP* након *OVA* сензибилизације, али не и када је *DEHP* примењен сам. Сходно томе, сличан образац примењен је у случају *MDA*, који је био значајно повећан у *DEHP* + *OVA* групи, а не и у *DEHP* групи [47]. Иако промена концентрације *MDA* није била значајна у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације, у *MIX* групи је примењен благи пораст у поређењу са свим осталим групама. *Acaroz* и сар. (2019) су известили да је иста доза *BPA* као она коришћена у истраживању у склопу приказане докторске дисертације (25 mg/kg т.м/дан перорално током 30 дана) изазвала значајне хистолошке промене у плућима, укључујући задебљање интералвеоларног септума и развој алвеоларног едема. Ови аутори су

установили смањену *SOD* и *CAT* активност у *BPA* групи у плућном ткиву у поређењу са контролом, смањену концентрацију *GSH* и повећану *MDA* [50].

Након поређења скупова података за *DEHP*, *DBP* и *BPA* издвојених *in silico* истраживањем спроведеним у склопу ове докторске дисертације, закључено је да се интеракције за 31 ген повезан са гојазношћу подударају за све испитиване супстанце. Више од половине ових 31 гена (56,49%) било је у коекспресији, што указује на сличност у њиховим нивоима експресије. Било који од поменутих гена потенцијално би могао бити укључен у механизам развоја гојазности повезан са испитиваном смешом и стога би се могао користити у даљим *in vitro* и *in vivo* студијама као геномски биомаркер. У својим биоинформатичким истраживањима, *Singh* и сар. (2012) су показали да фталати и *BPA* испољавају сличну токсикогеномику, епигенетске и штетне ефекте на људско здравље, укључујући и развој гојазности. Закључили су да је пет од десет механизма токсичности фталата и *BPA* укључено у инфламацију, док су четири прва молекуларна пута фталата укључена у регулацију метаболизма липида и *PPAR* пут [51–53]. Такође су означили 89 заједничких гена за *DEHP*, *DBP* и *BPA* [51]. Међутим, имајући у виду да су ови подаци прикупљени 2012. године, у међувремену се број гена у интеракцији за ове три супстанце значајно повећао. Слично запажање може се дати за резултате *Dong* и сар. (2018), који су извршили *CTD* анализе *BPA* и *DBP* као додатно истраживање *in vivo* експерименту на моделу зебрице. У свом *CTD* истраживању, установили су 4826 и 14737 интеракција са различитим генима/протеинима за *DBP* и *BPA*, редом [54], што је, у поређењу са бројем интеракција забележеним у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације (7076 за *DBP* и 54074 за *BPA*), знатно мање.

У студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације, према утврђеном *EC50*, *DBP* је био најтоксичнија супстанца, затим *BPA*, док се *DEHP* показао најмање токсичним. Све испитиване супстанце изазвале су тератогене малформације (деформисана глава, очи и отолити) и појаву знакова кардиотоксичности и хепатотоксичности. Смеша *DEHP*, *DBP* и *BPA* је била токсичнија у поређењу са појединачним супстанцама. Штавише, након три дана излагања комбинацији концентрација *BPA*, *DEHP* и *DBP* од 10, 20 и 20 $\mu\text{g/mL}$, редом, сви ембриони су угинули, док су ембриони третирани појединачним хемикалијама при одређеним нивоима преживели чак и након пет дана третмана. Токсичност на ембрионе зебрице и/или зебрице испитивана је у различитим студијама појединачне и/или комбиноване токсичност након изложености фталатима/*BPA*, при чему су токсичност по раст и развој, кардиотоксичност и хепатотоксичност биле главни испитивани токсични ефекти. Међутим, студије које истражују комбиноване ефекте *DEHP*, *DBP* и *BPA* на ембрионима зебрице су ограничене, или чак и не постоје. У неколико студија показано је да ембриони зебрице изложени *DEHP* имају повећан ризик од малформација. Код ембриона зебрице изложених 10 mg/L *DEHP*, на пример, однос деформитета се повећао за 20% у односу на контролу, при чему је деформитет бешике најчешћи деформитет [55]. У свом експерименту, *Hamid* и сар. (2020) сугерисали су да, од 6 истраживана фталата (укључујући *DEHP* и *DBP*), *DEHP*, *DMP* и *DEP* производе највише стопе морталитета и деформитета, укључујући кривину репа и перикардни едем [56]. Код ембриона зебрице, 250 mg/L *DBP* или *DEHP* снизио је број откуцаја срца, са 8,6 до 10,7% и 5,6 до 7,2% инхибиције откуцаја срца, редом, док је *DBP* такође узроковао абнормалности као што је перикардијални едем [57]. Слично као у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације, након тестирања шест различитих фталата, *Pu* и сар. (2020) су објавили да су, међу њима, *DBP* и бензил бутил фталат

(BBP) довели до смртоносних ефеката чак и при ниским дозама у ембрионима зебрице, што указује на већи ниво токсичности [58].

В.2. Протективно дејство пробиотика

In vitro испитивањем у склопу ове докторске дисертације утврђено је да пробиотик који садржи више сојева (*Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum LP 6595* и *Lactobacillus plantarum HEAL9*) може да умањи концентрацију 29,25, 29,04 и 41,75% DEHP, DBP и BPA присутних у смеши, редом, док је *Saccharomyces boulardii* смањило концентрацију испитиваних супстанци у мањем проценату (16,79, 15,66 и 15,63% за DEHP, DBP и BPA присутне у смеши, редом). Zhao и сар. (2020) установили су да *Leuconostoc mesenteroides* DM12 показује највећи проценат везивања DBP (87%) [59]. Према Zhu и сар. (2018), неколико различитих сојева *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus Fermentum* елиминисало је више од 25% монобутил фталата (MBP) главног метаболита DBP, док је комплекс који садржи MBP и *Lactobacillus plantarum DL7Ks* или R66 био најстабилнији међу 30 одабраних LAB сојева [60]. На основу резултата Zhu и сар. (2019), способност везивања MBP такође је откривена код пробиотичког квасца (*Saccharomyces cerevisiae*), са стопом везивања од 60 процената при 50 mg/L MBP [61]. Такође је утврђено да различити пробиотички сојеви не само да адсорбују BPA, већ га могу и разградити. Zhu и сар. (2017) су доказали да се значајна количина BPA (24,48 – 50,80%) може елиминисати из воденог раствора. *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus plantarum* су везали до 48,11 и 53,24 % BPA, редом [62]. Штавише, Endo и сар. (2007) уочили су да је *Lactococcus lactis subsp. lactis 712* имао највећи однос елиминације BPA од десет проучаваних пробиотских сојева. Ипак, у наведеном истраживању, показало се да испитиване бактерије само апсорбују BPA, а не и разграђују [63]. Ju и сар. (2019), с друге стране, установили су способност *Lactobacillus reuteri* да разгради BPA, са стопом разградње до 69,83% [64], а Taghizadeh Moghaddam и сар. (2020) показали способност *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus acidophilus* да смање нивое BPA за 82,8 и 43,44 %, редом [65]. Умањење концентрације добијено у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације било је ниже у поређењу са већином других студија, вероватно због различитих експерименталних услова и чињенице да су све три супстанце биле присутне у смеши. Такође, треба имати у виду да *in vitro* студије не могу у потпуности да прикажу околности и сложене процесе који се дешавају *in vivo*. Утицај пробиотских култура *in vivo* када су дате уз BPA до сада је испитан у само једној студији. У њој, додавање 5% *Bifidobacterium breve* или 5% *Lactobacillus casei* исхрани пацова пет дана пре оралне примене BPA (10 mg/kg) резултирало је временски зависним смањењем концентрације некоњугованог BPA у крви и повећањем фекалне екскреције BPA. Ови налази су показали да коришћени пробиотички сојеви имају потенцијал да апсорбују BPA и олакшају његово излучивање [66].

У студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације, уочено је да повишење TOS и концентрације MDA у хомогенатима ткива јетре присутно у групи животиња које су примале смешу токсичних супстанци није било присутно у групи која је осим смеше примала и пробиотик. Такође, у случају параметара код којих није примећена значајна промена у односу на контролну групу, могло се уочити да су вредности O_2^- благо повишене, а вредности SH благо снижене у MIX групи у односу на MIX + P. Такође, додатак пробиотика у студији спроведеној у оквиру ове

докторске дисертације отклонио је промене у ниву биоелемената у ткиву јетре (пад нивоа *Zn* и пораст *Fe* у *MIX* групи). *Oumeddour* и сар. (2019) показали су да је антиоксидативна активност пробиотских бактерија соја *Lactobacillus acidophilus* одговорна за потпуну превенцију липидне пероксидације ћелијске мембране изазване угљен тетрахлоридом [67].

Резултати студије спроведене у склопу ове докторске дисертације указали су на хепатотоксичне ефекте испитиване смеше, као и способност пробиотика да смањи наведене ефекте. Такође, указано је на значајан пораст нивоа глукозе и *LDL* холестерола у *MIX* групи, као и на смањење *HDL* холестерола у поређењу са контролом. Супротно овоме, у *MIX + P* групи није било значајне разлике између свих ових параметара и контролне групе, што потврђује заштитни ефекат пробиотика против штетних ефеката испитиване смеше токсичних супстанци. *Yadav* и сар. (2007) потврдили су да је суплементација пробиотским бактеријама (*Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus casei*) значајно одложила појаву интолеранције на глукозу, хипергликемије, хиперинсулинемије, дислипидемије и оксидативног стреса код пацова са индукованим дијабетесом, што указује на мањи ризик од дијабетеса и његових компликација приликом примене пробиотика [68,69]. Такође је показано да *Lactobacillus rhamnosus GG* снижава ниво хемоглобина *A1C* у крви и побољшава толеранцију глукозе код пацова са дијабетесом индукованим неонатално примењеним стрептозотоцином [70]. Поред тога, у експерименту у којем је мишевима орално апликована пробиотска бактерија *Lactobacillus rhamnosus GG* током 13 недеља, имплицирао је да овај сој пробиотика може заштитити животиње од резистенције на инсулин, као и умањити адипозитет у јетри и мезентеричном масном ткиву [71]. Ефекти *Saccharomices boulardi* на смањење укупног садржаја липида у јетри и смањење релативне масе јетре такође су демонстрирани у студији на мишевима у којој је овај пробиотски квасац даван свакодневно у току 4 недеље оралном гаважом мишевима отпорним на лептин код којих је индукован *T2DM* [72].

Примена смеше токсичних супстанци у *MIX* групи довела је до значајног повећања нивоа *WBC*, *LYM*, *MON*, *NEU* и *CRP* у односу на контролу, што указује на системску инфламацију ниског степена. Насупрот томе, ниједан од ових параметара није се значајно разликовао у *MIX + P* групи у поређењу са контролном. Резултати студије у којој је *Saccharomices boulardii* свакодневно апликован оралном гаважом гојазним мишевима отпорним на лептин и мишевима са индукованим *T2DM* током 4 недеље нагостили су да су чак и други системски биомаркери упале били снижени након третмана пробиотицима [72]. Концентрације цитокина *IL-6* и *IL-4* у плазми биле су скоро двоструко снижене код мишева који су примали пробиотик, док је *TNF-α* био приближно снижен за 20% [72]. Експеримент у којем је мишевима са индукованим колитисом даван *Lactobacillus plantarum CBT* током 7 дана, доказао је антиинфламаторне ефекте овог *LAB* соја, са повећаном индукцијом регулаторних Т ћелија и помоћних Т ћелија типа 2 у спленоцитима и рестаурацијом пехарастих ћелија праћеном супресијом експресије проинфламаторних цитокина [73].

У студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације забележено је значајно повећање релативне масе бубрега и нивоа уреје у *MIX* групи у поређењу са контролном. Поред тога, благо, али не значајно повећање нивоа мокраћне киселине забележено је у *MIX* групи. Ниједна од ових промена није примећена у *MIX + P* групи. Микроскопским испитивањем бубрежног ткива уочен је фокални губитак четкастог покрива тубулоцита у кортексу, са благом

дилатацијом тубула у групи *MIX*, док су ове промене биле блаже у групи *MIX + P*. Такође, у хомогенату ткива бубрега, додаток пробиотика ублажио је повишење концентрације *MDA*, иако је овај параметар био благо, иако не статистички значајно повишен у *MIX + P* групи у односу на контролну. Заштитни ефекат пробиотика против оштећења бубрега изазваних токсичним супстанцама истражен је у студији која је имала за циљ да процени ефикасност *Lactobacillus plantarum* и *Bacillus coagulans* против токсичности изазване живом на моделу пацова. Показано је да је примена пробиотика ублажила токсичност живе смањењем нивоа билирубина, урее и креатинина, углавном везивањем и уклањањем живе из дигестивног тракта [74], што је вероватно механизам којим је пробиотик у студији спроведеној у оквиру ове докторске дисертације ослабио токсичне ефекте повезане са бубрезима.

У експерименту на ембрионима зебрица спроведеном у склопу ове докторске дисертације такође је забележено протективно дејство пробиотика. *Saccharomyces boulardii* није испољио видљиво протективно дејство против тератогених ефеката смеше *DEHP/DBP/BPA*, док је вишекомпонентни пробиотик испољио врло јасно протективно дејство, приликом чега су сви ембриони зебрица изложени највишим концентрацијама ове три супстанце у смеши преживели. Међутим, вишекомпонентни пробиотик није успео у потпуности да отклони кардио- и нефротоксичне ефекте. Такође, при највишој дози испитиваних супстанци присутних у смеши једино су ембриони зебрица третирани највишом концентрацијом и вишекомпонентним пробиотиком преживели, иако са видљивим токсичним ефектима: развојем перикарднијалног едема и нересорбованог жуманцета и готово неприметном флуоресценцијом јетре. На основу до сада публиковане литературе, протективни ефекат пробиотика при изложеношћу смеши фталата и *BPA* на ембрионима зебрице до сада није испитан. Већина студија овог типа фокусира се на изложеност одраслих јединки, при чему су најчешће тестиране супстанце биле перфлуоробутансулфоната (*PFBS*) [75–77], док је једна студија испитала протективни ефекат против *BPA* [78], а једна против трикласана [79]. Студија *Giommi* и сар. (2021) пружа информације о улози вишекомпонентног пробиотика у сузбијању штетних ефеката *BPA* присутног у истој концентрацији као у експерименту спроведеном у склопу ове докторске дисертације (10 $\mu\text{g/L}$) на репродуктивну функцију зебрица након изложености у трајању од 28 дана. Студија је спроведена на изолованим фоликулима женки класе III (вителогени) и IV (у сазревању), са нагласком на модулацији различитих изоформи вителогенина. Код мужјака зебрица су испитивани кључни молекуларни процеси укључени у регулацију сперматогенезе. Резултати ове студије су показали да је код зебрица изложених комбинацији *BPA* и пробиотика већина транскрипта била у нивоу контролне групе, подржавајући претпоставку да пробиотик ублажује токсичност *BPA* [78]. *Chen* и сар. (2020) испитивали су способност *Lactobacillus rhamnosus* да ублажи токсичне ефекте *PFBS*, приликом чега је, код женки, примена пробиотика повећала синтезу масних киселина и β -оксидацију, али је ублажила акумулацију холестерола у крви изазвану *PFBS*, а код мужјака антагонизирала индуковане поремећаје метаболизма жучних киселина настале под дејством *PFBS* [75]. *Zhang* и сар. (2019) испитивали су протективно дејство *Lactobacillus plantarum* ST-III против токсичних ефеката трикласана након изложености овој супстанци. Регулацијом цревне флоре, пробиотик је ублажио упалу цревне слузокоже и поремећаје метаболизма масти који су настали при изложености трикласану. Такође, умањио је настанак понашања налик анксиозности услед изложености овој супстанци, побољшао активност кретања и способност учења зебрица [79].

Генерално, може се констатовати да је примена вишекомпонентног пробиотика значајно умањила штетне ефекте испитиване смеше ендокриних ометача и у експерименту код пацова и испитивањима на ембрионима зебрице спроведеним у оквиру ове докторске дисертације, при чему је показан заштитни ефекат пробиотика у случају повећања телесне масе, уноса хране, биохемијских и хематолошких параметара, нивоа хормона, параметара редокс статуса и биоелемената у плазми, ткиву панкреаса, плућа, тимуса, бубрега и тестиса пацова субакутно изложених смеси фталата и бисфенола А, као и против леталних, тератогених и хепатотоксичних ефеката испитиване смеше код ембриона зебрица.

Литература

- [1] P. Erkekoglu, B.K. Giray, M. Kizilgün, I. Hinger-Favier, W. Rachidi, A.M. Roussel, A. Favier, F. Hincal, Thyroidal effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats of different selenium status, *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 31 (2012) 143–153. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v31.i2.60>.
- [2] G. Hai-Tao, D. Qian-Nan, Q. Liang-Liang, L. Lu, L. Rui-Xian, C. Wei-Xin, Q. Xu, Zinc supplement ameliorates phthalates-induced reproductive toxicity in male rats, *Chemosphere.* (2020) 125828. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125828>.
- [3] H.-T. Gao, R. Xu, W.-X. Cao, L.-L. Qian, M. Wang, L. Lu, Q. Xu, S.-Q. Yu, Effects of six priority controlled phthalate esters with long-term low-dose integrated exposure on male reproductive toxicity in rats, *Food Chem Toxicol.* 101 (2017) 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.011>.
- [4] L. Zhou, H. Chen, Q. Xu, X. Han, Y. Zhao, X. Song, T. Zhao, L. Ye, The effect of di-2-ethylhexyl phthalate on inflammation and lipid metabolic disorder in rats, *Ecotoxicol Environ Saf.* 170 (2019) 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.009>.
- [5] Y. Wu, J. Li, B. Yan, Y. Zhu, X. Liu, M. Chen, D. Li, C.C. Lee, X. Yang, P. Ma, Oral exposure to dibutyl phthalate exacerbates chronic lymphocytic thyroiditis through oxidative stress in female Wistar rats, *Sci Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15533-z>.
- [6] G. Cogni, L. Chiovato, An overview of the pathogenesis of thyroid autoimmunity, *Hormones.* 12 (2013) 19–29. <https://doi.org/10.1007/bf03401283>.
- [7] K.A. Majeed, H. ur Rehman, M.S. Yousaf, H. Zaneb, I. Rabbani, S.K. Tahir, M.A. Rashid, Sub-chronic exposure to low concentration of dibutyl phthalate affects anthropometric parameters and markers of obesity in rats, *Environ Sci Pollut Res.* 24 (2017) 25462–25467. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9952-y>.
- [8] W.M. Abdel-Wahab, W.M. Abdel-Wahab, Thymoquinone attenuates toxicity and oxidative stress induced by bisphenol a in liver of male rats, *Pakistan J Biol Sci.* 17 (2014) 1152–1160. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.1152.1160>.
- [9] A.C. Venturelli, S.V. Fischer, R. Nogueira de Morais, S. Grassioli, A.J. Martino Andrade, Effects of exposure to Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) during lactation and puberty on sexual maturation and glycemic homeostasis in male rats, *Clin Nutr ESPEN.* 10 (2015) e5–e12. <https://doi.org/10.1016/j.clnme.2014.10.002>.
- [10] H. Chen, W. Zhang, B. bei Rui, S. min Yang, W. ping Xu, W. Wei, Di(2-ethylhexyl) phthalate exacerbates non-alcoholic fatty liver in rats and its potential mechanisms, *Environ Toxicol Pharmacol.* 42 (2016) 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.12.016>.
- [11] L. Cheng, J. Li, J. Cheng, Z. Wu, Dibutyl phthalate-induced activation of ROS and ERK1/2 causes hepatic and renal damage in Kunming mice, *Hum Exp Toxicol.* 38 (2019) 938–950. <https://doi.org/10.1177/0960327119843583>.
- [12] W. Zhang, J. ya Li, X. chen Wei, Q. Wang, J. yang Yang, H. Hou, Z. wei Du, X. an Wu, Effects of dibutyl phthalate on lipid metabolism in liver and hepatocytes based on PPAR α /SREBP-1c/FAS/GPAT/AMPK signal pathway, *Food Chem Toxicol.* 149 (2021) 112029. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112029>.
- [13] S.E. Elswefy, F.R. Abdallah, H.H. Atteia, A.S. Wahba, Inflammation, oxidative stress and apoptosis cascade implications in bisphenol A-induced liver fibrosis in male rats, (2016) 369–379. <https://doi.org/10.1111/iep.12207>.
- [14] Y. Zhao, R.K. Bao, S.Y. Zhu, M. Talukder, J.G. Cui, H. Zhang, X.N. Li, J.L. Li, Lycopene prevents DEHP-induced hepatic oxidative stress damage by crosstalk between AHR–Nrf2 pathway, *Environ Pollut.* 285 (2021) 117080. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117080>.
- [15] M. Ha, L. Wei, X. Guan, L. Li, C. Liu, P53-dependent apoptosis contributes to di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced hepatotoxicity, *Environ Pollut.* 208 (2016) 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.009>.
- [16] Z.K. Hassan, M.A. Eloheid, P. Virk, S.A. Omer, M. Elamin, M.H. Daghestani, E.M. Alolayan, Bisphenol a induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model, *Oxid Med Cell Longev.* 2012 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/194829>.

- [17] D. Aydemir, G. Karabulut, Ş. Gülsu, M. Gok, N. Barlas, N.N. Ulusu, Impact of the Di (2-Ethylhexyl) Phthalate Administration on Trace Element and Mineral Levels in Relation of Kidney and Liver Damage in Rats, *Biol Trace Elem Res.* 186 (2018) 474–488. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1331-0>.
- [18] P. Erkekoglu, J. Arnaud, W. Rachidi, B. Kocer-Gumusel, A. Favier, F. Hincal, The effects of di(2-ethylhexyl) phthalate and/or selenium on trace element levels in different organs of rats, *J Trace Elem Med Biol.* 29 (2015) 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.08.002>.
- [19] N. Nair, Dose-dependent short-term study of di-n-butyl phthalate on the testicular antioxidant system of Wistar rats, *Environ Sci Pollut Res.* 22 (2015) 2196–2204. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3457-8>.
- [20] P. Erkekoglu, B.K. Giray, M. Kizilgiin, W. Rachidi, I. Hininger-Favier, A.M. Roussel, A. Favier, F. Hincal, Di(2-ethylhexyl)phthalate-induced renal oxidative stress in rats and protective effect of selenium, *Toxicol Mech Methods.* 22 (2012) 415–423. <https://doi.org/10.3109/15376516.2012.666652>.
- [21] Y. Gu, M. Gao, W. Zhang, L. Yan, F. Shao, J. Zhou, Exposure to phthalates DEHP and DINP May lead to oxidative damage and lipidomic disruptions in mouse kidney, *Chemosphere.* 271 (2021) 129740. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129740>.
- [22] I.M. Mourad, Y.A. Khadrawy, The sensitivity of liver, kidney and testis of rats to oxidative stress induced by different doses of bisphenol A, *Int J Life Sci Pharma Res.* 2 (2012) 19.
- [23] M.M. Da Silva, C.F.L. Gonçalves, L. Miranda-Alves, R.S. Fortunato, D.P. Carvalho, A.C.F. Ferreira, Inhibition of Type 1 Iodothyronine Deiodinase by Bisphenol A, *Horm Metab Res.* 51 (2019) 671–677. <https://doi.org/10.1055/a-0919-3879>.
- [24] D. Sun, L. Zhou, S. Wang, T. Liu, J. Zhu, Y. Jia, J. Xu, H. Chen, Q. Wang, F. Xu, Y. Zhang, L. Ye, Effect of Di-(2-ethylhexyl) phthalate on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in adolescent rat, *Endocr J.* 65 (2018) 261–268. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0272>.
- [25] J.R. Furr, C.S. Lambright, V.S. Wilson, P.M. Foster, L.E. Gray, A short-term in vivo screen using fetal testosterone production, a key event in the phthalate adverse outcome pathway, to predict disruption of sexual differentiation, *Toxicol Sci.* 140 (2014) 403–424. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu081>.
- [26] D. Nakamura, Y. Yanagiba, Z. Duan, Y. Ito, A. Okamura, N. Asaeda, Y. Tagawa, C.M. Li, K. Taya, S.Y. Zhang, H. Naito, D.H. Ramdhan, M. Kamijima, T. Nakajima, Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol, *Toxicol Lett.* 194 (2010) 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.02.002>.
- [27] K.L. Howdeshell, C. V. Rider, V.S. Wilson, J.R. Furr, C.R. Lambright, L.E. Gray, Dose addition models based on biologically relevant reductions in fetal testosterone accurately predict postnatal reproductive tract alterations by a phthalate mixture in rats, *Toxicol Sci.* 148 (2015) 488–502. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv196>.
- [28] W.Z. Zhang, L. Yong, X.D. Jia, N. Li, Y.X. Fan, Combined subchronic toxicity of bisphenol A and dibutyl phthalate on male rats, *Biomed Environ Sci.* 26 (2013) 63–69. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.01.008>.
- [29] C. V. Rider, V.S. Wilson, K.L. Howdeshell, A.K. Hotchkiss, J.R. Furr, C.R. Lambright, L.E. Gray, Cumulative effects of in utero administration of mixtures of “antiandrogens” on male rat reproductive development, *Toxicol Pathol.* 37 (2009) 100–113. <https://doi.org/10.1177/0192623308329478>.
- [30] V. Christen, P. Crettaz, A. Oberli-Schrämli, K. Fent, Antiandrogenic activity of phthalate mixtures: Validity of concentration addition, *Toxicol Appl Pharmacol.* 259 (2012) 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.021>.
- [31] F.M. Abdel-Maksoud, F.A.Z. Ali, B.T. Akingbemi, Prenatal exposures to bisphenol A and di (2-ethylhexyl) phthalate disrupted seminiferous tubular development in growing male rats, *Reprod Toxicol.* 88 (2019) 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.017>.
- [32] M. Oudir, H. Chader, B. Bouzid, K. Bendisari, B. Latreche, S. Boudalia, M. Iguer-ouada, Male rat exposure to low dose of di(2-ethylhexyl) phthalate during pre-pubertal, pubertal and post-pubertal periods: Impact on sperm count, gonad histology and testosterone secretion, *Reprod Toxicol.* 75 (2018) 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.11.004>.
- [33] E. Kasahara, E.F. Sato, M. Miyoshi, R. Konaka, K. Hiramoto, J. Sasaki, M. Tokuda, Y. Nakano, M. Inoue, Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate, *Biochem J.* 365 (2002) 849–856. <https://doi.org/10.1042/BJ20020254>.
- [34] S. Kaur, M. Saluja, M.P. Bansal, Bisphenol A induced oxidative stress and apoptosis in mice testes: Modulation by selenium, *Andrologia.* 50 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1111/and.12834>.
- [35] H.A.A. Aly, M.H. Hassan, H.A. El-Beshbishy, A.M. Alahdal, A.M.M. Osman, Dibutyl phthalate induces oxidative stress and impairs spermatogenesis in adult rats, *Toxicol Ind Health.* 32 (2016) 1467–1477. <https://doi.org/10.1177/0748233714566877>.
- [36] P.C. Huang, W.F. Li, P.C. Liao, C.W. Sun, E.M. Tsai, S.L. Wang, Risk for estrogen-dependent diseases in relation to phthalate exposure and polymorphisms of CYP17A1 and estrogen receptor genes, *Environ Sci Pollut Res.* 21 (2014) 13964–13973. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3260-6>.
- [37] C. Lindholst, K.L. Pedersen, S.N. Pedersen, Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus*

- mykiss), *Aquat Toxicol.* 48 (2000) 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00051-X).
- [38] K.S. Uchtmann, J.A. Taylor, B.G. Timms, R.W. Stahlhut, E.A. Rieke, M.R. Ellersieck, F.S. vom Saal, W.A. Rieke, Fetal bisphenol A and ethinylestradiol exposure alters male rat urogenital tract morphology at birth: Confirmation of prior low-dose findings in CLARITY-BPA, *Reprod Toxicol.* 91 (2020) 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.11.007>.
- [39] S. Takeuchi, M. Iida, S. Kobayashi, K. Jin, T. Matsuda, H. Kojima, Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors α and β , and androgen receptor, *Toxicology.* 210 (2005) 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.02.002>.
- [40] H.J. Lee, S. Chattopadhyay, E.Y. Gong, R.S. Ahn, K. Lee, Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor, *Toxicol Sci.* 75 (2003) 40–46. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg150>.
- [41] Y. Sun, J. Shen, L. Zeng, D. Yang, S. Shao, J. Wang, J. Wei, J. Xiong, J. Chen, Role of autophagy in di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)-induced apoptosis in mouse Leydig cells, *Environ Pollut.* 243 (2018) 563–572. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.089>.
- [42] S. Chin Lee, S. Pervaiz, Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus, 39 (2007) 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.09.007>.
- [43] X. Sun, Y. Lin, Q. Huang, J. Shi, L. Qiu, M. Kang, Y. Chen, C. Fang, T. Ye, S. Dong, Di(2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis in rat INS-1 cells is dependent on activation of endoplasmic reticulum stress and suppression of antioxidant protection, *J Cell Mol Med.* 19 (2015) 581–594. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12409>.
- [44] L. Li, F. Wang, J. Zhang, K. Wang, X. De, L. Li, Y. Zhang, Typical phthalic acid esters induce apoptosis by regulating the PI3K/Akt/Bcl-2 signaling pathway in rat insulinoma cells, *Ecotoxicol Environ Saf.* 208 (2021) 111461. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111461>.
- [45] Y. Lin, X. Sun, L. Qiu, J. Wei, Q. Huang, C. Fang, T. Ye, M. Kang, H. Shen, S. Dong, Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells, *Cell Death Dis.* 4 (2013) 1–10. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.206>.
- [46] A. Trautmann, K. Krüger, M. Akdis, D. Müller-Wening, A. Akkaya, E.B. Bröcker, K. Blaser, C.A. Akdis, Apoptosis and loss of adhesion of bronchial epithelial cells in asthma, *Int Arch Allergy Immunol.* 138 (2005) 142–150. <https://doi.org/10.1159/000088436>.
- [47] H. You, S. Chen, L. Mao, B. Li, Y. Yuan, R. Li, X. Yang, The adjuvant effect induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is mediated through oxidative stress in a mouse model of asthma, *Food Chem Toxicol.* 71 (2014) 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.012>.
- [48] S. Zhou, M. Han, Y. Ren, X. Yang, L. Duan, Y. Zeng, J. Li, Dibutyl phthalate aggravated asthma-like symptoms through oxidative stress and increasing calcitonin gene-related peptide release, *Ecotoxicol Environ Saf.* 199 (2020) 110740. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110740>.
- [49] X. Wang, B. Han, P. Wu, S. Li, Y. Lv, J. Lu, Q. Yang, J. Li, Y. Zhu, Z. Zhang, Dibutyl phthalate induces allergic airway inflammation in rats via inhibition of the Nrf2/TSLP/JAK1 pathway, *Environ Pollut.* 267 (2020) 115564. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115564>.
- [50] U. Acaroz, S. Ince, D. Arslan-Acaroz, Z. Gurler, H.H. Demirel, I. Kucukkurt, A. Eryavuz, R. Kara, N. Varol, K. Zhu, Bisphenol-A induced oxidative stress, inflammatory gene expression, and metabolic and histopathological changes in male Wistar albino rats: Protective role of boron, *Toxicol Res (Camb).* 8 (2019) 262–269. <https://doi.org/10.1039/c8tx00312b>.
- [51] S. Singh, S.S.L. Li, Bisphenol A and phthalates exhibit similar toxicogenomics and health effects, *Gene.* 494 (2012) 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.035>.
- [52] S. Singh, S.S.L. Li, Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates, *Epigenetics Pathol Explor Connect between Genet Mech Dis Expr.* (2013) 267–278. <https://doi.org/10.1201/b16304>.
- [53] S. Singh, S.S.L. Li, Phthalates: Toxicogenomics and inferred human diseases, *Genomics.* 97 (2011) 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.11.008>.
- [54] X. Dong, X. Qiu, S. Meng, H. Xu, X. Wu, M. Yang, Proteomic profile and toxicity pathway analysis in zebra fish embryos exposed to bisphenol A and di-n-butyl phthalate at environmentally relevant levels, *Chemosphere.* 193 (2018) 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.042>.
- [55] H. Boran, S. Terzi, Bis (2-ethylhexyl) phthalate induces DNA strand breaks and gene expression alterations in larval zebrafish *Danio rerio*, *Toxicol Ind Health.* 35 (2019) 520–529. <https://doi.org/10.1177/0748233719869531>.
- [56] N. Hamid, M. Junaid, R. Manzoor, P.P. Jia, D.S. Pei, Prioritizing phthalate esters (PAEs) using experimental in vitro/vivo toxicity assays and computational in silico approaches, *J Hazard Mater.* 398 (2020) 122851. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122851>.
- [57] X. Mu, X. Chen, J. Liu, L. Yuan, D. Wang, L. Qian, Y. Qian, G. Shen, Y. Huang, X. Li, Y. Li, X. Lin, A multi-omics approach reveals molecular mechanisms by which phthalates induce cardiac defects in zebra fish (*Danio rerio*)*, *Environ Pollut.* 265 (2020) 113876. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113876>.
- [58] S. Pu, N. Hamid, Y. Ren, D. Pei, *Chemosphere Effects of phthalate acid esters on zebra fish larvae : Development*

- and skeletal morphogenesis, *Chemosphere*. 246 (2020) 125808. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125808>.
- [59] L. Zhao, X. Li, Q. Yang, D. Zhuang, X. Pan, L. Li, Adsorption kinetics and mechanism of di-n-butyl phthalate by *Leuconostoc mesenteroides*, *Food Sci Nutr*. 8 (2020) 6153–6163. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1908>.
- [60] Y. ting Zhu, J. hui Lai, X. duo Liao, S. liang Liu, Screening of lactic acid bacteria strains for their ability to bind phthalate monoesters in vitro and the binding characteristics, *Food Control*. 90 (2018) 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.013>.
- [61] Y. ting Zhu, J. hui Lai, X. duo Liao, Z. ren Ge-rong, S. liang Liu, Binding ability of phthalate monoesters by *Saccharomyces cerevisiae* strains in vitro, *Food Control*. 102 (2019) 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.040>.
- [62] Y. ting Zhu, C. xiang Yang, B. Bin Luo, K. Zhou, S. liang Liu, Efficiency of dairy strains of lactic acid bacteria to bind bisphenol A in phosphate buffer saline, *Food Control*. 73 (2017) 1203–1209. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.039>.
- [63] Y. Endo, N. Kimura, I. Ikeda, K. Fujimoto, H. Kimoto, Adsorption of bisphenol A by lactic acid bacteria, *Lactococcus*, strains, *Appl Microbiol Biotechnol*. 74 (2007) 202–207. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0632-y>.
- [64] J. Ju, L. Shen, Y. Xie, Y. Guo, Y. Chenga, Q. He, W. Yaoa, Degradation potential of bisphenol A by *Lactobacillus reuteri*, *LWT - Food Sci Technol*. 106 (2019) 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.022>.
- [65] S. Taghizadeh Moghaddam, A. Javadi, A.A. Matin, Reduction of bisphenol A by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in yoghurt, *Int J Dairy Technol*. 73 (2020) 737–742. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12706>.
- [66] K. Oishi, T. Sato, W. Yokoi, Y. Yoshida, M. Ito, H. Sawada, Effect of probiotics, *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei*, on bisphenol A exposure in rats, *Biosci Biotechnol Biochem*. 72 (2008) 1409–1415. <https://doi.org/10.1271/bbb.70672>.
- [67] A. Oumeddour, D. Zaroure, R. Haroun, R. Zaimeche, K. Riane, Protective Effects of Propolis and Probiotic *Lactobacillus acidophilus* against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats, 25 (2019) 190–197. <https://doi.org/10.15171/PS.2019.36>.
- [68] H. Yadav, S. Jain, P.R. Sinha, Effect of dahi containing *Lactococcus lactis* on the progression of diabetes induced by a high-fructose diet in rats, *Biosci Biotechnol Biochem*. 70 (2006) 1255–1258. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.1255>.
- [69] H. Yadav, M. Sc, S. Jain, M. Sc, P.R. Sinha, M. Sc, D. Ph, Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats, 23 (2007) 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.09.002>.
- [70] M. Tabuchi, M. Ozaki, A. Tamura, N. Yamada, T. Ishida, M. Hosoda, A. Hosono, Antidiabetic effect of *Lactobacillus gg* in streptozotocin-induced diabetic rats, *Biosci Biotechnol Biochem*. 67 (2003) 1421–1424. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1421>.
- [71] S.W. Kim, K.Y. Park, B. Kim, E. Kim, C.K. Hyun, *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production, *Biochem Biophys Res Commun*. 431 (2013) 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.121>.
- [72] A. Everard, S. Matamoros, L. Geurts, N.M. Delzenne, P.D. Cani, *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice., *MBio*. 5 (2014) 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.01011-14>. Editor.
- [73] D.H. Kim, S. Soochan, J. Bum, J. Hyeon, H. Woo, D. Hyuk, X. Che, K. Cheong, J. Jeong, S. Yong, H. Cheol, J. Lee, T. Il, W. Ho, S. Won, J. Hee, International Journal of Medical Microbiology *Lactobacillus plantarum* CBT LP3 ameliorates colitis via modulating T cells in mice, *Int J Med Microbiol*. 310 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151391>.
- [74] M. Majlesi, S.S. Shekarforoush, H.R. Ghaisari, S. Nazifi, J. Sajedianfard, M.H. Eskandari, Effect of Probiotic *Bacillus Coagulans* and *Lactobacillus Plantarum* on Alleviation of Mercury Toxicity in Rat, *Probiotics Antimicrob Proteins*. 9 (2017) 300–309. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9250-x>.
- [75] L. Chen, J.C.W. Lam, L. Tang, L. Tang, C. Hu, M. Liu, M. Liu, P.K.S. Lam, B. Zhou, Probiotic modulation of lipid metabolism disorders caused by perfluorobutanesulfonate pollution in zebrafish, *Environ Sci Technol*. 54 (2020) 7494–7503. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02345>.
- [76] C. Hu, L. Tang, M. Liu, P.K.S. Lam, J.C.W. Lam, L. Chen, Probiotic modulation of perfluorobutanesulfonate toxicity in zebrafish: Disturbances in retinoid metabolism and visual physiology, *Chemosphere*. 258 (2020) 127409. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127409>.
- [77] B. Sun, M. Liu, L. Tang, C. Hu, Z. Huang, X. Zhou, L. Chen, Probiotic supplementation mitigates the developmental toxicity of perfluorobutanesulfonate in zebrafish larvae, *Sci Total Environ*. 799 (2021) 149458. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149458>.
- [78] C. Giommi, H.R. Habibi, M. Candelma, O. Carnevali, F. Maradonna, Probiotic administration mitigates bisphenol a reproductive toxicity in zebrafish, *Int J Mol Sci*. 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22179314>.
- [79] L. Zang, Y. Ma, W. Huang, Y. Ling, L. Sun, X. Wang, A. Zeng, R.A. Dahlgren, C. Wang, H. Wang, Dietary

Lactobacillus plantarum ST-III alleviates the toxic effects of triclosan on zebrafish (*Danio rerio*) via gut microbiota modulation, *Fish Shellfish Immunol.* 84 (2019) 1157–1169. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.007>.

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. **Baralić K**, Bozic D, Živančević K, Milenković M, Javorac D, Marić Đ, Miljković Antonijeвић E, Buha Djordjević A, Vukomanović P, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijeвић B, Đukić-Ćosić D. Integrating *in silico* with *in vivo* approach to investigate phthalate and bisphenol A mixture-linked asthma development: Positive probiotic intervention. *Food and Chemical Toxicology*; 2021 Nov 15:112671. (IF 6.023)

Назив часописа: *Food and Chemical Toxicology*

Импакт фактор (2020): 6.023

Категорија: M21a

Ранг часописа у области *Toxicology*: 9/93

2. **Baralić K**, Živančević K, Jorgovanović D, Javorac D, Radovanović J, Gojković T, Djordjević AB, Ćurčić M, Mandinić Z, Bulat Z, Antonijeвић B, Đukić-Ćosić D. Probiotic reduced the impact of phthalates and bisphenol A mixture on type 2 diabetes mellitus development: merging bioinformatics with *in vivo* analysis. *Food and Chemical Toxicology*; 2021 Jun 5:112325. (IF 6.023)

Назив часописа: *Food and Chemical Toxicology*

Импакт фактор (2020): 6.023

Категорија: M21a

Ранг часописа у области *Toxicology*: 9/93

3. **Baralić K**, Živančević K, Javorac D, Djordjević AB, Anđelković M, Jorgovanović D, Miljković EA, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijeвић B, Đukić-Ćosić D. Multi-strain probiotic ameliorated toxic effects of phthalates and bisphenol A mixture in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*; 2020 Sep 1;143:111540. (IF 6.023)

Назив часописа: *Food and Chemical Toxicology*

Импакт фактор (2020): 6.023

Категорија: M21a

Ранг часописа у области *Toxicology*: 9/93

Радови објављени у врхунским међународним часописима (M21)

1. **Baralić K**, Buha Djordjević A, Živančević K, Antonijeвић E, Anđelković M, Javorac D, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijeвић B, Đukić-Ćosić D. Toxic effects of the mixture of Phthalates and Bisphenol A—Subacute Oral Toxicity Study in Wistar Rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health*; 2020 Jan;17(3):746. (IF 3.390)

Назив часописа: *International Journal of Environmental Research and Public Health*

Импакт фактор (2020): 3.390

Категорија: M21

Ранг часописа у области *Public, Environmental and Occupational Health*: 81/296

2. **Baralić K**, Jorgovanović D, Živančević K, Djordjević AB, Miljaković EA, Miljković M, Kotur-Stevuljević J, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Combining *in vivo* pathohistological and redox status analysis with *in silico* toxicogenomic study to explore the phthalates and bisphenol A mixture-induced testicular toxicity. *Chemosphere*; 2020 Dec 13:129296. (IF 7.086)

Назив часописа: *Chemosphere*

Импакт фактор (2020): 7.086

Категорија: M21

Ранг часописа у области *Environmental Sciences*: 30/274

Рад објављен у међународном часопису (M23)

1. **Baralić K**, Živančević K, Božić D, Jennen D, Djordjević AB, Miljaković EA, Đukić-Ćosić D. Potential genomic biomarkers of obesity and its comorbidities for phthalates and bisphenol A mixture: *In silico* toxicogenomic approach. *Biocell*; 2022;46(2):519. (IF 1.254)

Назив часописа: *Biocell*

Импакт фактор (2020): 1.254

Категорија: M23

Ранг часописа у области *Biology*: 73/93

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

1. **Baralić K**, Jorgovanovic D, Živančević K, Javorac D, Buha Djordjevic A, Vukomanović P, Bulat Z, Đukić-Ćosić D. Phthalate and bisphenol a mixture-linked asthma development: positive probiotic intervention. 11th Congress of Toxicology in Developing Countries (online), Kuala Lumpur, Malaysia, 13 – 16 June 2021. Book of Abstracts; 87p.
2. **Baralić K**, Živančević K, Javorac D, Anđelković M, Antonijević E, Djordjević AB, Ćurčić M, Bulat Z, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Histopathologic changes in rat tissues induced by phthalate and bisphenol A mixture after subacute exposure: more pronounced effect of the mixture in comparison with the single substances. 56th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) (online), 26 September – 1 October 2021. *Toxicology Letters*; 350: 184p.
3. **Baralić K**, Živančević K, Ćurčić M, Bulat Z, Buha Đorđević A, Matović V, Jovanović D, Đukić-Ćosić D. Toxicogenomics analysis of phthalates and bisphenol A mixture: Lung cancer. IUTOX 15th International Congress of Toxicology Book of Abstracts, Honolulu, Hawaii, USA, 15 – 18 July 2019. Book of Abstracts; 133p.
4. **Baralić K**, Jorgovanović D, Matović V, Antonijević B, Bulat Z, Ćurčić M, Antonijević E, Đukić-Ćosić D. Toxicogenomics analysis of phthalates and bisphenol A mixture: Obesity and

- comorbidities. 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Brussels, Belgium, 2 – 5 September 2018. Toxicology Letters; 295S: 69–266p.
5. **Baralić K**, Jorgovanović D, Jennen D, Đukić-Ćosić D. Phthalates (diethylhexyl phthalate (DEHP) and dibutyl phthalate (DBP)) and Obesity: a Toxicogenomics Approach. 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10), Belgrade, Serbia, 18 – 21 April 2018. Book of Abstracts; 105 p.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у целини (M63)

1. **Baralić K**, Živančević K, Jorgovanović D, Javorac D, Antonijević E, Djordjević AB, Ćurčić M, Bulat Z. Protective role of sulforaphane against phthalate and bisphenol A mixture linked hepatocellular carcinoma: in silico toxicogenomic datamining. Macedonian Pharmaceutical Bulletin. 2020; 66 (Supl 1): 9 – 10 p.

Д. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата магистра фармације – медицинског биохемичара Катарине Баралић састоји се из два *in vivo* модела, као и *in silico* токсикогеномичке анализе података. Први део студије заснива се на испитивању токсичности смеше *DEHP*, *DBP* и *BPA* у односу на токсичност појединачних супстанци на два експериментална модела, пацовима и зебрицама, уз додатно испитивање механизма токсичности смеше применом *in silico* анализе токсикогеномичких података. У другом делу студије испитана је потенцијална ефикасност пробиотских култура у умањењу штетних ефеката смеше фталата и *BPA* код пацова и зебрица. Извршена је провера оригиналности докторске дисертације, а добијена вредност за *Similarity index* сматра се прихватљивом. Сходно томе, може се извести закључак да је приложена докторска дисертација кандидата магистра фармације – медицинског биохемичара Катарине Баралић оригинално научно дело.

На основу резултата ове докторске дисертације, утврђена је повезаност између *DEHP*, *DBP*, *BPA* и њихове смеше са различитим токсичним ефектима/обољењима и показано је протективно дејство пробиотика, при чему су изведени следећи закључци:

- Смеша *DEHP*, *DBP* и *BPA* довела је значајних промена у погледу снижења уноса хране, воде и релативне масе слезине и повишења релативне масе бубрега у односу на контролу и групе које су примале појединачне супстанце.
- Већина хематолошких параметара (еритроцити, хемоглобин, хематокрит, *MCHC*, леукоцити, лимфоцити, неутрофили и моноцити) била је значајно повишена у групи третираној смешом у односу на контролу. Ефекти смеше на леукоците и лимфоците били су слични ефектима испитиваних фталата, а на еритроците, хемоглобин, хематокрит и *MCHC* ефектима *BPA*.
- Смеша, али не и појединачне супстанце, проузроковала је значајно повишење *AST*, *ALT*, укупног билирубина и уреје у односу на контролу. Ефекти смеше на *CRP*, глукозу и холестерол били су слични ефектима испитиваних фталата. Појединачне супстанце, али

не и смеша, довеле су до снижења нивоа серумског гвожђа, повишење нивоа *LDL*, *ALP* и триглицерида у односу на контролу.

- Смеша је довела до значајног повишења *T4* у односу на контролу, а појединачне супстанце деловале су супротно, сниживши ниво овог хормона. Снижење *T3/T4* односа било је присутно само при изложености смеси *DEHP*, *DBP* и *BPA*, у односу на контролу и на појединачне супстанце.
- Значајно снижење тестостерона у односу на контролу било је присутно само при изложености смеси *DEHP*, *DBP* и *BPA*, а не и појединачним супстанцама.
- Смеша је испољила израженије патохистолошке ефекте на ткиву јетре, тестиса, слезине и бубрега у односу на појединачне супстанце и контролу, док на ткиву мозга нису уочене промене.
- Значајне промене у параметрима оксидативног стреса/антиоксидативне заштите биле су присутне само у групи третираној смешом у односу на контролу (*TOS* и *SOD* у плазми, *MDA*, O_2^- и *SH* групе у тестису, *TOS* у јетри, *TOS*, *SOD*, *SH* групе у панкреасу, *MDA* и *SH* групе у слезини, *TOS* и O_2^- у тимусу) или израженије у односу на значајне промене у групама третираним појединачним супстанцама (*MDA* у јетри и бубрезима, *TAS*, *TOS* и *SOD* у тестисима, *SOD* у плућима).
- Значајне промене у нивоу биоелемената биле су присутне само у групи третираној смешом у односу на контролу (*Fe* у јетри и тимусу и *Zn* у плућима) или израженије у односу на значајне промене у групама третираним појединачним супстанцама (*Zn* у јетри и тимусу).
- *In silico* анализом утврђено је да смеша може да изазове оштећења јетре, поремећаје мушког репродуктивног система, дијабетес мелитус типа 2, астму и гојазност, а најзначајнији механизми токсичности били су оксидативни стрес и апоптоза.
- На моделу зебрице, смеша је била значајно токсичнија од појединачних супстанци у погледу ефеката на раст и развој, хепатотоксичности, кардиотоксичности и леталитета. Сви ембриони су угинули при изложености највишим концентрацијама супстанци у смеси. Све испитиване појединачне супстанце проузроковале су ефекте на раст и развој, хепатотоксичност и кардиотоксичност, са следећим редоследом опадања токсичности – *DBP* > *BPA* > *DEHP*.
- Ефекат *BPA* усмеравао је ефекат смеше, а појединачни фталати и *BPA* испољили су или сличне или супротне хепатотоксичне ефекте на моделу зебрице у зависности од примењене концентрације.
- Примена вишекомпонентног пробиотика умањила је или готово у потпуности отклонила штетне ефекте изазване смешом *DEHP*, *DBP* и *BPA* при субакутној изложености пацова (промене очуваности структуре ткива јетре, тестиса, бубрега и слезине, снижење телесне масе, уноса хране и воде, промене нивоа биохемијских параметара повезаних са функцијом јетре и бубрега, липидног статуса и глукозе у серуму, хормона, параметара оксидативног стреса/антиоксидативне заштите и биоелемената).
- На моделу зебрица, вишекомпонентни пробиотик био је ефикаснији од једнокомпонентног, смањивши хепатотоксичност, токсичности по раст и развој и леталитет, а једнокомпонентни је довео до смањења само хепатотоксичног ефекта смеше.

- На основу *in vitro* испитивања, вишекомпонентни пробиотик био је ефикаснији у умањењу концентрације супстанци *DEHP*, *DBP* и *BPA* у смеши у поређењу са једнокомпонентним

Сумарно, добијени резултати у оквиру ове докторске дисертације потврдили су да је токсичност смеше *DEHP*, *DBP* и *BPA* већа у односу на токсичност појединачних супстанци, док показано дејство вишекомпонентног пробиотика указује на могућност будућих разматрања његове примене, а тиме и протективног ефекта код поремећаја до којих може довести смеша *DEHP*, *DBP* и *BPA*.

Подаци представљени у овој докторској дисертацији дају оригинални допринос бољем сагледавању и разумевању токсиколошких профила фталата, *BPA* и њихове смеше, нарочито пошто су ове супстанце свеprisутне у животној средини и што се свакодневна и истовремена изложеност људи фталатима и *BPA* све више може довести у везу са развојем различитих болести. Из ових разлога, спроводена бројна истраживања на животињама, као и у оквиру ове докторске дисертације настоје да утврде не само токсичност ових ендокриних ометача појединачно, већ и токсични потенцијал њихове комбиноване примене. Такође, појединачна употреба испитиваних фталата и *BPA* ограничена је регулативом имајући у виду висок ниво изложености људи, као и токсичност ових супстанци. Самим тим, резултати ове докторске дисертације представљају значајан научни допринос на пољу праћења комбинованих ефеката ових супстанци када су присутне у смеши, што представља реални сценарио изложености. Додатно, испитивања протективног дејства пробиотика, за чију примену се показало да је значајно умањила штетне ефекте испитиване смеше ендокриних ометача, како на моделу пацова, тако и на моделу зебрице, доприносе бољем сагледавању потенцијала пробиотика да умањи изложеност фталатима и *BPA*, а тиме и ублаже њихове штетне ефекте.

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 резултати ове докторске дисертације до сада публиковани у оквиру шест радова у међународним часописима, категорије М21а (три рада), М21 (два рада), односно М23 (један рад). На основу свега изложеног, Комисија сматра да је кандидат испунио постављене захтеве у докторској дисертацији под називом „**Токсичност смеше фталата и бисфенола А и процена протективног дејства пробиотика на моделима пацова и зебрице**“, те предлажемо Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати Извештај и упуту га Већу научних области медицинских наука, ради добијања сагласности за јавну одбрану.

У Београду, 8. јула 2022. године

Чланови комисије

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

др. сц. Александра Буха Ђорђевић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

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

др. сц. Александар Павић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду – Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство