

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
UNIVERZITET U BEOGRADU - FARMACEUTSKI FAKULTET**

U Beogradu, 18. maj 2017.

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 06. aprila 2017. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Mirjana Đukić - mentor rada i predsednik Komisije, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Dr sc. Ivana Stevanović - mentor rada, viši naučni saradnik, Univerzitet odbrane – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Beograd
3. Dr sc. Marijana Ćurčić - docent, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
4. Dr sc. Marina Nikolić Đurović - vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
5. Dr sc. Miloš Petković - docent, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Efekat disulfirama na mehanizme reproduktivne subakutne toksičnosti etanola i/ili kadmijuma kod mužjaka pacova**“ kandidata mr Ane Đurić. Na osnovu analize priložene doktorske disertacije podnosimo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

I Z V E Š T A J

A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dipl. pharm. Ane Đurić pod nazivom „**Efekat disulfirama na mehanizme reproduktivne subakutne toksičnosti etanola i/ili kadmijuma kod mužjaka pacova**“ napisana je na 165 strana kucanog teksta formata A4, fontom *Times New Roman*, veličine 12 i proredom 1,5. Disertacija se sastoji iz sledećih celina: 1. Uvod, 2. Hipoteza i cilj istraživanja, 3. Materijal i metode, 4. Rezultati, 5. Diskusija, 6. Zaključak, 7. Literatura, 8. Prilozi, i Izjave (3 administrativne izjave).

Na početku doktorske disertacije dat je sažetak na srpskom i engleskom jeziku. Disertacije je napisana jasnim jezičkim stilom i sadrži 13 grafikona, 7 slika (imidži HP sa po dve-tri podslike) i 22 tabela u Rezultatima; 15 tabela i 12 grafika u Prilogu; i 351 literaturnih navoda.

U uvodu je dat detaljan prikaz dosadašnjih saznanja iz oblasti koje su neposredno vezane za predmet disertacije i podeljen je u pet odeljaka. U *prvom i drugom odljeku* posvećenih alkoholu i kadmijumu (Cd) dat je istorijat, osobine i metabolizam, kao i mehanizmi toksičnosti ova dva agenasa, sa naglaskom na reproduktivnu toksičnost. Dokumentovano je da mehanizam oksidativnog stresa posreduje u sveukupnim toksičnim efektima oba toksična agensa. Istaknuto je vezivanje Cd za tiolne (-SH) grupe proteina, peptida i drugih komponenti, što i uslovljava akumulaciju Cd u tkivima i depoziciju u ciljnim mjestima), zatim metabolizam (istaknuto je učešće CYP2E1 enzima u oksidacionom metabolizmu etanola) kao i putevi ekskrecije, poluvreme eliminacije, kao i najznačajnije toksikokinetičke karakteristike, dok je kod etanola detaljno opisana uloga ALDH enzima. U *trećem odljeku* pisano je o disulfiramu (DSF) leku koji se koristi u averzivnoj terapiji alkoholizma bazirana na inhibiciji enzima ALDH. Zbog prisustva -SH grupe, metaboliti DSF su prepoznati kao potencijalni helatni agensi, kako za esencijalne, tako i za toksične metale (te i Cd); kao i redukcionim agensima. Opisana je enterhepatična cirkulacija i kompletna farmakokinetika DSF. Dualni efekat DSF na red-oks homeostazu je objašnjen prooksidativnim efektom metabolita DSF u smislu moguće tiolizacije proteina, kao i antioksidativni efekat, zbog heliranja metala sa prelaznom i stabilnom valencom, kao i redukcionim osobinama -SH grupe. Četvrto poglavlje bavi se esencijalnim metalima, sa osvrtom na gvožđe (Fe), bakar (Cu), cink (Zn), magnezijum (Mg) i selen (Se), njihovom ulogom u organizmu i prirodu ovih elementa. *Peto poglavlje* se bavi detaljno oksidativnim stresom (OS): definišu se slobodni radikali, putevi njihovog nastanka i vrste; i napisano je o principima antioksidativne zaštite i (ne)enzimskim komponentama ovog sistema. *Šesto poglavlje* je posvećeno anatomiji i funkciji reproduktivnog sistema kod mužjaka sisara, a *sedmo* upućuje na neželjene efekte OS na testise.

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su sledeći: 1) postaviti animalni model na Wistar pacovima koji imitira humane uslove izlaganja etanolu i Cd; 2) na osnovu promene redoks parametara u tkivu testisa pacova proceniti uključenost SR u mehanizam toksičnog delovanja etanola i Cd i ustanoviti najosetljiviji oksidativni marker njihove reproduktivne toksičnosti; 3) utvrditi

eventualni protektivni efekat DSF na testise pacova prethodno subakutno izloženih etanolu i/ili Cd i pri udruženoj ekspoziciji sa Cd, ispitujući androgeni status, morfološke i funkcionalne karakteristike testisa; 4) izvršiti evaluaciju antioksidativnog efekata DSF u testisima i njegovog uticaja na status esencijalnih bioelemenata, kao i toksičnog Cd u testisima.

U poglavlju **Materijal i metode** detaljno su navedeni podaci o eksperimentalnim modelima i protokolu ispitivanja. U *in vivo* eksperimentu korišćeni su mužjaci *Wistar* pacova podeljenih na dve kontrolne grupe (n = 6) i 7 eksperimentalnih grupa (n = 24) od kojih je svaka bila podeljena na po 4 podgrupe (n = 6) prema trajanju izloženosti ispitivanim supstancama i/ili kombinaciji supstanci, sa izuzetkom grupe izložene Cd koja je podijeljena u 6 podgrupa. Vreme izloženosti pacova ispitivavnim agensima je bilo tokom 1, 3, 10, 21, 31 i 42 dana (subakutna/subhronična ekspozicija), te su ova vremena navedena u subskriptu odgovarajućih grupa. Kontrolnoj grupi životinja su davani voda, odnosno maslinovo ulje kao rastvarač za DSF, a eksperimentalne grupe su: Cd grupa - individualna ekspozicija *i.p.* 1 mg vodenog rastvora CdCl₂/kg t.m./dan u jednoj dozi (Cd₁, Cd₁₋₃, Cd₁₋₁₀, Cd₁₋₂₁, Cd₁₋₃₁ i Cd₁₋₄₂); A grupe – individualna *per os* izloženost, putem oralne sonde, 3 ml 20% rastvora etanola/dan u dve podeljene doze ujutro i poslijepodne tokom označene (A₁, A₁₋₃, A₁₋₁₀ i A₁₋₂₁); DSF grupe – individualna *per os* subakutna izloženost 178,5 mg DSF/kg t.m./dan u jednoj (DSF₁, DSF₁₋₃, DSF₁₋₁₀ i DSF₁₋₂₁); A/Cd grupe – subakutna kombinovana ekspozicija etanolu i Cd. Na isti način su primenjivani agensi (A₁/Cd₁, A₁₋₃/Cd₁₋₃, A₁₋₁₀/Cd₁₋₁₀ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₁); A/DSF grupe - subhronična kombinovana ekspozicija etanolu i DSF. Nakon individualne ekspozicije etanolu tokom 21 dana, koja se potom prekida, daje se DSF (način primene je prethodno naveden) (subhronična kombinovana ekspozicija) (A₁₋₂₁/DSF₂₂, A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₂₄, A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₃₁ i A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂); Cd/DSF grupe - subhronična kombinovana ekspozicija Cd i DSF (vreme ekspozicije indicovano je u subskriptu, a način davanja je prethodno naveden (Cd₁₋₂₂/DSF₂₂, Cd₁₋₂₄/DSF₂₂₋₂₄, Cd₁₋₃₁/DSF₂₂₋₃₁ i Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂); i Cd/A/DSF grupe - subhronična kombinovana ekspozicija (paralelna ekspozicija Cd i etanolu otkom 21 dan, a potom Cd i DSF narednih 21 dan) (A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₂/DSF₂₂, A₁₋₂₁/Cd₁₋₂₄/DSF₂₂₋₂₄, A₁₋₂₁/Cd₁₋₃₁/DSF₂₂₋₃₁ i A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂). Animalni model je dizajniran da imitira alkoholičar-pušače na terapiji DSF, kada se prestaje sa unosom alkohola ali se nastavlja sa pušenjem. Prestanak unosa etanola tokom terapije se podrazumeva, kako bi se izbegla neželjena DSF-alkohol reakcija. Tokom

izvođenja eksperimenta, svakodnevno je praćena promena telesne mase životinja i unos hrane i vode.

U okviru ovog poglavlja opisana je metoda za histopatološku analizu tkiva testisa; metode za određivanje koncentracije testosterona; plamena i hidridna atomska apsorpciona spektrometrija za merenje metala Cd, Cu, Fe, Zn, Mg, odnosno selena Se; i spektrofotometrijske metode za merenje parametara OS: malondialdehid (MDA), superoksidni anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD), aktivnost katalaze (CAT), aktivnost glutation reduktaze (GR), aktivnost glutation-S-transferaze (GST). Iz fiziološkog medijuma određivani su redukovani glutation (GSH) i oksidirani glutation (GSSG) metodom tečne hromatografije, te je utvrđen njihov odnos GSSG/GSH.

U odeljku Statistička obrada podataka je navedeno da se koristila jednofaktorska analiza varijanse (one-way ANOVA) i post-hok Tukey-jev test (Graph Pad, verzija 5.0) za obradu dobijenih podataka, a nivo statističke značajnosti je bio $p < 0,05$.

U poglavlju **Rezultati** dati su grafički, tabelarni i slikoviti prikazi dobijenih rezultata. Sveukupni tretmani na pojedinačne ispitivane paramtere predstavljeni su grafički radi preglednosti ostvarenih efekata; efekti pojedinačnih tretmana na status bioelemanta, oksidativni stres i testosteron prikazani su tabelarno, radi detaljnije analize ostvarenih rezultata. Takođe, dati su histopatološki prikazi finalnih efekata primenjenih tretmana na tkivo testisa (slike).

U ukupnom skorur urađeno je cc 5000 analiza.

U poglavlju **Diskusija**, kandidat je dobijene rezultate detaljno poredio sa odgovarajućim rezultatima drugih autora. Rezultati uporedne analize upućivali su na objašnjenja mogućih mehanizama dejstva i tipa interakcija nakon izloženosti ispitivanim agensima, sa aspekta red-oks statusa i statusa bioelemenata, kao i morfološko/funkcionalnog profila testisa.

Na kraju disertacije, dati su **Zaključci** koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

U poglavlju **Literatura** dat je spisak literaturnih navoda (351) citiranih vankuverskim stilom.

U poslednjem poglavlju **Prilozi** prikazano 15 tabela i 12 grafika (Prilog 1 – 5 tabela; Prilog 2 - 9 tabela; Prilog 3 – 1 tabela; i Prilog 4 – 12 grafika) koje se odnose na dodatne rezultate ove doktorske disertacije.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Potvrđeni su efekti reproduktivne toksičnosti individualne i paralelene ekspozicije Cd i etanola, te i protektivna uloga DSF u primenjenim kombinovanom tretmanima. Posebno je značajno rasvetljavanje interferencije sulfhidrilne (–SH) grupe metabolita DSF sa antioksidativnim odgovorom, kao i statusom beolelmenata u testisima u datim eksperimentalnim uslovima. Saglasno postavljenoj hipotezi, dobijeni rezultati su potvrdili da pojedinačna i paralelna izloženost etanolu i Cd ispoljava toksične efekte na testise tretiranih pacova; da pored specifičnih mehanizama toksičnosti testirani agensi ispoljavaju zajednički mehanizam toksičnosti u čijoj osnovi je razvoj OS u testisima tretiranih pacova; i da DSF i njegovi metaboliti ostvaruju antioksidativni efekat, tako što heliraju metale (uključujući i Cd), te tako onemogućavaju generisanje slobodnih radikala posredstvom Fentonove reakcije, a i poseduju redukciona svojstva.

Rezultati su pokazali značajan protektivni efekat DSF u pojedinačnom ili udruženom toksičnom delovanju etanola i/ili Cd.

Alkohol: Pri odabranoj dozi i subakutnoj izloženosti etanolu, u testisima pacova došlo je do nastanka OS, generisanjem slobodnih radikala tokom njegovog metabolizma, inhibicijom antioksidativnih enzima (SOD i GST) i razvojem procesa LPO. Nastalim promenama je doprineo i porast katalitički aktivnog Fe, oslobođenog iz feritina, koje u Fentonovoj reakciji doprinosi nastanku LPO. Rezultati pokazuju da primena etanola u trajanju od 21 dana dovodi do smanjenja koncentracije testosterona u plazmi i testisima i pokreće značajne morfološke promene u testisima (prisustvo nezrelih germinativnih ćelija u lumenu, acidofilnih ćelija i vakuolizacije; mikroarhitektura tkiva testisa potpuno izgubila svoj morfološki integritet; prisutni su acelularni prostori uklopljeni u amorfnu blede-eozinofilnu supstancu). Naši podaci su konzistentni sa studijama koje su zabeležile degeneraciju, dezorganizaciju, atrofiju i vakuolizaciju tkiva testisa nakon ekspozicije etanolu

Cd: Pokazano je da individualna *i.p.* administracija 1 mg CdCl₂/kg/dan kod mužjaka pacova dovodi do trenutnog deponovanja Cd u testisima. Uočene su promene u statusima bioelemenata već posle 10 dana izloženosti Cd (koncentracije Zn su smanjene, dok je sadržaj Cu and Fe povećan) Takođe je došlo do trenutnog razvoja OS u testisima, što je dokumentovano trenutnim smanjenjem aktivnosti tSOD i povećanim stvaranjem O₂^{•-} (zabeležene još od prvog dana

izloženosti Cd) Kadmijum je doveo do smanjenja aktivnosti CAT, GST i GR i povećanja GSSG/GSH odnosa i LPO (povećanje nivoa MDA). Smanjenje koncentracije testosterona u plazmi i testisima zajedno sa makroskopskim i mikroskopskim promenama u testisima (edematozne semiferne tubule sa uništenim germinativnim slojem i nepravilnim rasporedom spermatogenih ćelija) potvrdili su odsustvo spermatogeneze.

DSF: Subakutna izloženost DSF dovela je do promena u statusima Fe (povećanja) i Cu (smanjenja); povećano je stvaranje $O_2^{\bullet-}$ i smanjenje su aktivnosti tSOD i GST; pad sadržaja MDA u testisima pacova 21 dan nakon primene, što potvrđuje protektivni efekat od lipidne peroksidacije. Prema našim rezultatima DSF *per se* nije uticao na produkciju testosterona, niti je izazvao morfološke promene u testisima.

Alkohol/Cd: Paralelna subakutna ekspozicija Cd i etanolu dovela je do povećanja Fe i Cu u odnosu na kontrolnu grupu, kao i do povećanja koncentracije Cu u odnosu na A₂₁ grupu i smanjenja u odnosu na Cd₂₁ grupu. Rezultati sprovedene studije ukazuju da subakutna koekspozicija Cd i etanolu smanjuje koncentraciju Zn u testisima u poređenju sa odgovarajućom kontrolnom grupom. Suprimirana je aktivnost tSOD i CAT. Porast nivoa MDA u odnosu na kontrolnu grupu životinja je zabeležen ali je istog nivoa kao prilikom pojedinačne izloženosti Cd i etanolu, te se ne može govoriti o sinergističkom efektu etanola i Cd na razvoj LPO. Smanjen je GSH na račun povećanja GSSG (porast GSSG/GSH). Narušavanje glutationskog statusa je potvrđeno i zabeleženim smanjenjem aktivnosti GST. Došlo je do smanjenja koncentracije testosterona u plazmi u odnosu na pojedinačnu izloženost ovim agensima, dok je u testisima zabeleženo smanjenje koncentracije testosterona samo u odnosu na A-grupu. Histopatološkom analizom utvrđeno je da paralelna ekspozicija dovodi do sličnih oštećenja tkiva testisa kao i usled pojedinačne primene Cd.

Alkohol/DSF: Primena DSF nakon prestanka subakutne izloženosti etanolu povećava Fe i smanjuje Cu u testisima izloženih pacova. Nivo Zn u testisima je snižen. Uvođenje DSF nakon završene subakutne ekspozicije etanolu je ispoljilo povoljan efekat na samo nekoliko parametara OS ($O_2^{\bullet-}$, MDA i GSH) u testisima tretiranih. Stvaranje $O_2^{\bullet-}$ je značajno niže u A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupi u odnosu na A₂₁ grupu, ali i dalje više od produkcije u odgovarajućoj kontrolnoj grupi. Međutim, zabeleženo smanjenje sadržaja MDA u A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupi u odnosu na A₂₁ grupu i približavanje vrednosti ovog parametra kontrolnoj vrednosti se izdvaja kao najznačajniji

pozitivan efekat DSF na narušen oksidativni status u testisima pacova usled subakutne izloženosti etanolu. Imajući u vidu da se razvoj LPO u testisima dovodi u vezu sa poremećajima morfologije i pokretljivosti sperme i degenerativnim promenama seminiferusnih tubula, smanjenje LPO nakon uvođenja DSF, ukazuje na njegov protektivni efekat na tkivo testisa. Zabeleženo je povećanje nivoa GSH i registrovan je pad GSSG/GSH odnosa u poređenju sa A₂₁ grupom što potvrđuje antioksidativni efekat DSF. Međutim, davanje DSF nakon završene subakutne aplikacije etanola nije pokazalo pozitivan efekat na sve parametre OS. Uvođenje DSF je izazvalo dalje smanjenje aktivnosti tSOD i GST u odnosu na kontrolne vrednosti. Uvođenje DSF po završetku subakutnog davanja etanola pokazao je trend daljeg smanjenja nivoa testosterona u plazmi, dok je u homogenatima testisa zabeležen blagi porast testosterona u odnosu na A₂₁ grupu. Histopatološkom analizom utvrdili smo da DSF nije doveo do značajnijih promena u A₁₋₂₁/DSF₂₂₋₄₂ grupi u odnosu na A₂₁ grupu

Cd/DSF: Uvođenje DSF 22. dana od primene Cd ostvaruje pozitivan efekat na narušenu homeostazu Fe i Cu. Pokazan je protektivni efekat na Cd narušen oksidativni status u testisima (povišene su aktivnosti tSOD, CAT i GR i smanjena je O₂^{•-} i MDA, GSSG/GSH u odnosu na odgovarajuću Cd grupu životinja). Međutim, subakutni tretman DSF nije pokazao protektivni efekat na produkciju testosterona u testisima, koja je prethodno narušena subakutnim izlaganjem Cd. Udružena izloženost Cd i DSF dovela je do povećanja nivoa testosterona u plazmi u grupi Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ u odnosu na Cd₄₂, ali su te vrednosti i dalje daleko ispod kontrolnih vrednosti. Histopatološka analiza u našoj studiji potvrđuje da DSF nema potencijal da popravi negativne efekte na morfološke promene do kojih je dovela subakutna upotreba Cd. Sa mikrografija se teško može pretpostaviti da se radi o tkivu testisa (jedino je dobro definisana bazalna membrana). Lumen kanalića je potpuno acelularan i ispunjen grudvičasto-homogenim ili mrvičasto-rastresitim sadržajem koji se boji jako eozinofilno.

Alkohol/Cd/DSF: Disulfiram je ostvario pozitivan efekat na narušenu homeostazu Fe, Cu i Zn izazvanu paralelnim davanjem etanola i Cd, kao i protektivni efekat na narušen oksidativni status u testisima što se ogleda u pomeranju vrednosti svih merenih parametara ka kontrolnim vrednostima. U grupi A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ detektovano je blago povećanje koncentracije testosterona u plazmi u odnosu na Cd₄₂ grupu životinja, ali ne i u odnosu na A₂₁/Cd₂₁. Koncentracija testosterona u homogenatima testisa je nastavila sa trendom opadanja i nakon

uvođenja DSF, te je u grupi A₁₋₂₁/Cd₁₋₄₂/DSF₂₂₋₄₂ drastično niža u odnosu na A₂₁ i kontrolnu grupu, tako da ne možemo govoriti o protektivnom efektu DSF na nivo testosterona u testisima. Na osnovu analize preseka tkiva testisa ne može se zaključiti da li je DSF ostvario protektivni efekat u odnosu na pojedinačne i udruženu ekspoziciju etanolu i Cd.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje efekta DSF, u pogledu analize parametara OS i statusa bioelemenata, u kombinovanom tretmanu sa Cd, te Cd i etanolom *in vivo*, dok su ranije samo istraživani efekti kombinovani efekti tretmana Cd i etanol (Nation i sar., 1994; Brzóska i sar., 2000, 2002, 2013,).

U testisima pacova došlo je do nastanka OS usled izloženosti etanolu, generisanjem SR tokom njegovog metabolizma, inhibicijom antioksidativnih enzima (SOD i GST) i razvojem procesa LPO što je u skladu sa literaturom (Schlorff i sar., 1999; Nordmann i sar., 1990 Oremosu i Akang, 2014). Nastalim promenama je doprineo i porast katalitički aktivnog Fe, oslobođenog iz feritina, koje u Fentonovoj reakciji doprinosi nastanku LPO (Shaw i Jayatilleke, 1990)

Rezultati disertacije nedvosmisleno potvrđuju da Cd indukuje OS. Razvoj OS se ogleda u stvaranju SR, razvoju LPO, oštećenju antioksidativnog neenzimskog sistema odbrane (smanjenju GSH i povećanju GSSG) i inhibiciji aktivnosti antioksidativnih enzima što je u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima (Casalino i sar., 2000; Ognjanovic i sar., 2010; Maret i Wedd, 2014). Nastanak OS je praćen i narušavanjem homeostaze merenih bioelemenata (povećanja koncentracije Fe i Cu i smanjenja koncentracije Zn), kao i retencijom Cd u testisima od samog početka tretmana što je takođe u skladu sa literaturnim podacima (Gupta i sar., 2004; Bonda i sar., 2004; Ognjanovic i sar., 2010).

Na osnovu podataka studije utvrđeno je da paralelna izloženost Cd i etanolu je narušila redoks balans u testisima u većoj meri nego pojedinačni tretmani, posebno se ističe povišen GSSG/GSH odnos u poređenju sa individualnim tretmanima.

Rezultati prethodnih studija su pokazali da DSF pokazuje antioksidativne i pro-oksidativne efekte (Ploemen i sar.,1996; Wadhwa i Mumper, 2013). Subakutna izloženost DSF dovela je do promena u statusima Fe (povećanja) i Cu (smanjenja). Disulfiram je izazvao povećano stvaranje $O_2^{\cdot-}$, smanjenje aktivnosti tSOD i GST i sadržaja MDA u testisima pacova 21 dan nakon primene.

Podaci iz doktorske disertacije upućuju da se protektivni efekat DSF na testise pacova prethodno izložene etanolu može opisati kao delimično antioksidativan, pošto je, prema našim rezultatima DSF pozitivno uticao i značajno smanjio koncentracije $O_2^{\cdot-}$ i MDA. Takođe tretman DSF nakon ekspozicije Cd i nastavak koekspozicije ostvario je pozitivan efekat na narušenu homeostazu merenih metala (Fe, Cu, Zn) i vratio gotovo sve merene parametre OS na kontrolne vrednosti. Uvođenje DSF i nakon kombinovanog tretmana Cd i alkohola je ostvarilo protektivni efekat na narušene homeostaze bioelemenata (smanjenje koncentracije metala u odnosu na pojedinačnu izloženost primenjenih supstanci) i redoks sistema u testisima tretiranih pacova.

Prema rezultatima iz doktorske disertacije DSF nema potencijal da popravi negativne efekte na morfološke promene, niti je pokazao protektivni efekat na produkciju testosterona u testisima, koja je prethodno narušena izlaganjem A (subakutno) i/ili Cd (subakutno/subhronično)

Literatura

- ATSDR. Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 2012
- Bonda E, Wlostowski T, Krasowska A. Testicular toxicity induced by dietary cadmium is associated with decreased testicular zinc and increased hepatic and renal metallothionein and zinc in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Biometals* 2004; 17: 615-24.
- Brzóška MM, Gałazyn-Sidorczuk M, Dzwilewska I. Ethanol consumption modifies the body turnover of cadmium: a study in a rat model of human exposure. *J Appl Toxicol* 2013; 33(8): 784-98.
- Brzóška MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Jurczuk M, Gałazyn-Sidorczuk M, Rogalska J. Effect of short-term ethanol administration on cadmium retention and bioelement metabolism in rats continuously exposed to cadmium. *Alcohol Alcohol* 2000; 35(5): 439-45.
- Brzóška MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Jurczuk M, Gałazyn-Sidorczuk M. Cadmium turnover and changes of zinc and copper body status of rats continuously exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol Alcohol* 2002; 37 (3): 213-21.
- Casalino E, Calzaretto G, Sblano L, Landriscina C. Cadmium dependent enzyme activity alteration is not imputable to lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 2000; 383: 288-95.

- Emanuele MA, Emanuele N. Alcohol and the male reproductive system. *Alcohol Res Health* 2001; 25 (4): 282-7.
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxic Appl Pharmacol.* 2009; 238:209-214.
- Gupta RS, Gupta ES, Dhakal BK, Thakur AR, Ahnn J. Vitamin C and Vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Mol cells* 2004;17: 132-9.
- Maret W, Wedd A. Binding, transport and storage of metal ions in biological cells. *RSC Metallobiology.* 2014.
- Nation JR, Burkey RT, Grover CA, Bratton GR. The effects of cadmium exposure on ethanol pharmacokinetics. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 48(2):543-6
- Nordmann R, Ribière C, Rouach H. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol* 1990; 25(2-3): 231-7.
- Ognjanovic B, Markovic S, Djordevic N, Trbojevic I, Stajna A, Saicib Z. Cadmium induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reproductive Toxicol* 2010; 29: 191-7.
- Oremosu AA, Akang EN. Impact of alcohol on male reproductive hormones, oxidative stress and semen parameters in Sprague–Dawley rats. *Middle East Fertility Society Journal* 2014.
- Ploemen JP, van Iersel ML, Wormhoudt LW, Commandeur JN, Vermeulen NP, van Bladeren PJ. In vitro inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by disulfiram and diethyldithiocarbamate. *Biochem Pharmacol* 1996; 52(2): 197-204.
- Schlörff EC, Husain K, Somani SM. Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol* 1999; 18(2-3): 203-14.
- Shaw S, Jayatilleke E. Ethanol-induced iron mobilization: role of acetaldehyde-aldehyde oxidase generated superoxide. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9:11-17.
- Wadhwa S, Mumper RJ. D-penicillamine and other low molecular weight thiols: Review of anticancer effects and related mechanisms. *Cancer Letters* 2013; 337: 8-21.

D. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Brojni hemijski agensi kojima je čovek svakodnevno izložen, uključujući i one koji dovode do stvaranja zavisnosti, kao što je etanol (alkoholna pića) i cigarete (pušenje cigareta povećava rizik po zdravlje jer je potvrđeno da sadrže Cd, pored brojnih štetnih sastojaka) uzrokuju oštećenje reproduktivnih organa kod muškaraca. Postavljena animalna studija je imala za cilj da imitira scenario alkoholičara – pušača na terapiji DSF, imajući u vidu da je navika pušenja često udružena sa zloupotrebom alkohola, a da su pušači izloženi Cd, putem duvana.

Izučavanje toksikologije kombinovane ekspozicije je veoma kompleksna i verovatno nedokučiva grana toksikologije. Koekspozicija čoveka brojnim agensima iz životne sredine je realan scenario. Izučavanje neželjenih/toksičnih efekata individualne ekspozicije nekom agenasu je važno i neophodno, u smislu sticanja znanja o osnovnim patofiziološkim mehanizmima agenoasa, ali ovaj scenario je u domenu hipotetičnog, ako govorimo o realnom životu. Iz tih razloga svakako je najmeritornije izučavati tzv. „koktel efekte“ udruženih ekspozicija. U konkretnom slučaju ispitivali smo efekte etanola i/ili Cd na status bioelemenata (Fe, Cu, Zn, Mg, Se) i oksidativnog stresa ($O_2^{\bullet-}$, MDA, CAT, SOD, GR, GST, GSH, GSSG i GSSG/GSH) u testisima, testosterona u testisima i plazmi, kao i morfologiju testisa pacova. Pokazano je da etanol i Cd štetno deluju na reproduktivni sistem mužjaka pacova, a na bazi ispitivanih parametara.

Do sada su ispitivani efekti individualne ekspozicije Cd, etanolu i DSF, dok rezultati ove doktorske teze predstavljaju originalni naučni doprinos o subakutnim/subroničnim kombinovanim tretmanima etanolom, Cd i DSF i njihovim efektima na reproduktivni sistem mužjaka pacova. Uzimajući u obzir reaktivnost i hemijsku strukturu DSF, tj. posedovanje sulfhidrilne grupe, praćen je status bioelemenata u testisima (zbog mogućeg heliranja metala, kao i samih inetrakcija između bioelemenata i Cd), red-oks status testisa (zbog direktnog redukcionog efekta sulfhidrilne grupe metabolita DSF) i status testosterona i morfologije testisa, kao pokazatelja reproduktivne funkcije kod mužjaka pacova izloženih testiranim agensima. S druge strane, metaboliti DSF mogu helirati metale sa promenljivom valencom, te na taj način suzbiti njihovo učešće u Fentonovoj reakciji i posledično stvaranje štetnih slobodnih radikala, zbog čega DSF može delovati kao antioksidans.

Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju sigurnu primenu DSF kod pacova, prethodno subakutno izloženih alkoholu. Potvrđeni su mehanizmi toksičnosti ispitivanih agenasa, odnosno da je zajednički mehanizam toksičnosti indukovani OS. Uvođenje DSF u tretman dovodi do smanjenja ROS i LPO do određenog stepena. Kombinovani tretmani su takođe potvrdili interakcije –SH grupe metabolita DSF (DDC) sa glutationom i nastanak Cd-DDC kompleksa koji u određenoj meri omogućava oporavak testisa.

Ova studija potvrđuje parcijalno protektivni efekat DSF od redroaktivne toksilčnosti Cd i/ili etanola, a na bazi ispitivanih parametara. Ova *in vivo* animalna studija je pokazala da je

parcijalno ostvarena protektivna uloga DSF podržana helatnim, tj. antidoskim potencijalom DSF u smislu heliranja Cd, a s druge strane redukcionim svojstvima sulfhidrilne grupe DSF metabolita, što je doprinelo oporavku narušenog red-oks statusa tkiva testisa, indukovano etanolom i/ili Cd. Ova doktorska teza je pokazala da DSF i njegovi metaboliti poseduju antioksidativni potencijal koji je suštinski zasnovan na helatnim i redukcionim svojstvima, što je takođe izuzetan naučni doprinos. S obzirom da se za sada DSF kao terapeutik koristi samo u averzivnoj terapiji alkoholizma, ova doktorska teza predstavlja izuzetan naučni odprinos jer otvara put novim terapeutskim primenama DSF, uz naravno dodatna klinička istraživanja i verifikacije.

E. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Rad u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M21): 2

Prvi je autor u 2 objavljena rada.

1. Djuric A, Begic A, Gobeljic B, Pantelic A, Zebic G, Stevanovic I, et.al. Subacute alcohol and/or disulfiram intake affects bioelements and redox status in rat testes. Food and Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2017;105:44-51. (IF: 3.584)
2. Djuric A, Begic A, Gobeljic B, Stanojevic I, Ninkovic M, Vojvodic D, et.al. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium, Food and Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2015; 86:25–33. (IF: 3.584)

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34): 5

Prvi je autor u 5 objavljenih saopštenja.

1. Djuric A, Djukic M, Begic A, Djukic-Cosic D, Stevanovic I, Ninkovic M. Disulfiram Reduces Lipid Peroxidation in Testes of Rat Subchronically Exposed to Ethanol and Cadmium. 14th ISANH Congress on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants. June 12-13, 2014. Paris, France. Abstract book: 112.
2. Djuric A, Djukic M, Begic A, Djukic-Cosic D, Pantelic A, Zebic G, et al. Cadmium Induces Oxidative Stress in the Rat Testes. 11th Serbian Congress of Toxicology “New Frontiers and Challenges in Toxicology”. June 24-27, 2014. Sremski Karlovci, Serbia. Abstract book: 27-28.
3. Djuric A, Djukic M, Begic A, Djukic-Cosic D, Pantelic A, Zebic G, et al. Oxidative Status in Testes of Rats Subchronically Exposed to Ethanol and Cadmium. 11th Serbian Congress of Toxicology “New Frontiers and Challenges in Toxicology”. June 24-27, 2014. Sremski Karlovci, Serbia. Abstract book: 29-30.
4. Djuric A, Djukic M, Begic A, Djukic-Cosic D, Pantelic A, Zebic G, et al. Changed status of bioelements in testes of rats subchronically exposed to cadmium. 6. Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem. 15 - 19. oktobar 2014. Beograd. Abstract book: 444-445.
5. Djuric A, Djukic M, Begic A, Pantelic A, Zebic G, Stevanovic I, et al. Impaired Bioelements Status Retrieval with Disulfiram in Testes of Rats Subchronically Exposed to Cadmium. II Simpozijum magistara farmacije Tuzlanskog kantona. 21-22. mart 2015. Tuzla, Bosna i Hercegovina.

F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Pregledom završene doktorske disertacije, može se konstatovati da je kandidat uspešno ostvario postavljene ciljeve, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u naučnim časopisima međunarodnog značaja. Na osnovu izloženog, može se zaključiti da rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pružaju originalan i značajan naučni doprinos u oblasti ispitivanja toksičnosti smeša.

Uzimajući u obzir sve što je izloženo, predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj izveštaj i odobri kandidatu dipl. pharm. Ani Đurić javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Efekat disulfirama na mehanizme reproduktivne subakutne toksičnosti etanola i/ili kadmijuma kod mužjaka pacova“

Dr sc. Mirjana Đukić - mentor rada i predsednik Komisije, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Ivana Stevanović - mentor rada, viši naučni saradnik, Univerzitet odbrane – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Beograd

Dr sc. Marijana Ćurčić - docent, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Marina Nikolić Đurović - vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Miloš Petković - docent, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu