

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Katarina V. Baralić

**TOKSIČNOST SMEŠE FTALATA I  
BISFENOLA A I PROCENA PROTEKTIVNOG  
DEJSTVA PROBIOTIKA NA MODELIMA  
PACOVA I ZEBRICE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Katarina V. Baralić

**TOXICITY OF PHTHALATE AND BISPHENOL  
A MIXTURE AND ASSESSMENT OF THE  
PROTECTIVE EFFECT OF PROBIOTIC ON  
RAT AND ZEBRAFISH MODELS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022

## Mentor

---

dr sc. Danijela Đukić-Ćosić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

## Članovi komisije

---

dr sc. Biljana Antonijević, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

dr sc. Aleksandra Buha Đorđević, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

dr sc. Marijana Ćurčić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

dr sc. Aleksandar Pavić, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

U Beogradu, \_\_\_\_\_

## **Toksičnost smeše ftalata i bisfenola A i procena protektivnog dejstva probiotika na modelima pacova i zebrice**

### Sažetak

Široka upotreba bis(2-etilheksil)ftalata (DEHP), dibutil ftalata (DBP) i bisfenola A (BPA) otvara niz mogućnosti za istovremenu izloženost ljudi ovim toksičnim supstancama u svakodnevnom životu. Cilj ove doktorske disertacije bio je da ispita toksičnost smeše DEHP, DBP i BPA u odnosu na pojedinačne supstance na eksperimentalnim modelima pacova i zebrice, razjasni mehanizme toksičnosti smeše *in silico* toksikogenomičkom analizom podataka i utvrdi potencijalnu efikasnost probiotika u umanjenju štetnih efekata ispitivane smeše kod pacova i zebrica. Nakon subakutne izloženosti pacova, smeša je proizvela značajne promene u telesnoj masi, unosu hrane i vode, nivou hormona, lipidnom profilu, pojedinim hematološkim i biohemijskim parametrima, patohistološkim nalazima tkiva, nivoima parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite i bioelementima. Neki od ovih efekata bili su prisutni samo u grupi tretiranoj smešom ili izraženiji u odnosu na grupe tretirane pojedinačnim supstancama. Eksperiment na embrionima zebrica potvrdio je da je toksičnost smeše izraženija u odnosu na toksičnost pojedinačnih supstanci, kao i da je efekat smeše prvenstveno diktiran efektima BPA. *In silico* analiza ukazala je na povezanost ispitivane smeše i razvoja različitih poremećaja pri čemu su kao dominantni molekularni mehanizmi izdvojeni oksidativni stres i apoptoza. Pokazan je zaštitni efekat probiotika protiv štetnih efekata smeše, posebno u slučaju smanjenja telesne mase, unosa hrane, biohemijskih i hematoloških parametara, nivoa hormona, parametara redoks statusa i bioelementa u plazmi, tkivu pankreasa, pluća, timusa, bubrega i testisa pacova, kao i protiv efekata na rast i razvoj, hepatotoksičnosti i letaliteta ispitivane smeše kod embriona zebrica.

Ključne reči: endokrini ometači, bis(2-etilheksil) ftalat, dibutil ftalat, bisfenol A, *in vivo*, pacov, zebrice, *in silico*, mehanizmi toksičnosti, višekomponentni probiotik

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Toksikologija

## **Toxicity of phthalates and bisphenol A mixture and assessment of probiotic protective effect on rat and zebrafish models**

### Abstract

The widespread use of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), dibutyl phthalate (DBP) and bisphenol A (BPA) opens up a range of possibilities for simultaneous human exposure to these toxic substances. The aim of this doctoral dissertation was to examine DEHP/DBP/BPA mixture toxicity in relation to individual substances in rat and zebrafish experimental models, clarify the mechanisms of toxicity by conducting *in silico* toxicogenomic analysis and determine the potential efficacy of multicomponent probiotic in reducing the adverse effects of the tested mixture in rats and zebrafish. After subacute exposure of rats, the mixture produced significant changes in bodyweight, food and water consumption, hormone levels, lipid profile, certain hematological and biochemical parameters, pathohistological findings, redox status parameters and bioelements. Some effects were present only or more prominent in the group treated with the mixture in relation to the groups treated with individual substances. Zebrafish embryos experiment confirmed that mixture toxicity was more pronounced than toxicity of individual substances, and that mixture effects were primarily dictated by BPA. *In silico* analysis indicated an association between the mixture and development of various disorders, with oxidative stress and apoptosis being the dominant molecular mechanisms. Probiotic protective effect against mixture harmful effects has been shown, especially in the case of bodyweight gain, food intake, biochemical and hematological parameters, hormone levels, redox status parameters and bioelements in plasma, pancreatic, lung, thymus, kidney and testis in rats, as well as against lethal, teratogenic and hepatotoxic effects in zebrafish embryos.

Keywords: endocrine disruptors, bis(2-ethylhexyl) phthalate, dibutyl phthalate, bisphenol A, *in vivo*, rat, zebrafish, *in silico*, mechanisms of toxicity, multicomponent probiotic

Academic expertise: Pharmacy

Major in: Toxicology

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>13</b>
1.1. ENDOKRINI OMETAČI .....	2
1.2. FTALATI.....	2
1.2.1. Struktura i primena.....	2
1.2.2. Izloženost .....	3
1.2.3. Toksikokinetika .....	3
1.2.4. Toksičnost .....	3
1.2.5. Reglativa .....	4
1.3. BISFENOL A .....	4
1.3.1. Struktura i primena.....	4
1.3.2. Izloženost .....	5
1.3.3. Toksikokinetika .....	5
1.3.4. Toksičnost .....	5
1.3.5. Reglativa .....	6
1.4. SMEŠA FTALATA I BISFENOLA A.....	6
1.5. PROTEKTIVNO DEJSTVO PROBIOTIKA .....	7
<b>2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>11</b>
3.1. HEMIKALIJE .....	11
3.2. PROBIOTIK .....	11
3.3. <i>IN VIVO</i> ISPITIVANJE NA MODELU PACOVA .....	11
3.3.1. Eksperimentalne životinje .....	11
3.3.2. Eksperimentalni protokol .....	11
3.3.3. Prirast telesne mase i relativna masa organa.....	12
3.3.4. Uzorkovanje krvi i organa .....	12
3.3.5. Određivanje hematoloških parametara .....	12
3.3.6. Određivanje biohemijskih parametara .....	12
3.3.7. Određivanje nivoa hormona .....	13
3.3.8. Patohistološka analiza tkiva.....	13
3.3.9. Određivanje parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite .....	13
3.3.9.1. Izdvajanje plazme i priprema homogenata tkiva.....	13
3.3.9.2. Merenje parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite.....	13
3.3.10. Određivanje bioelemenata .....	14
3.3.10.1. Reagensi i standardi .....	14
3.3.10.2. Priprema uzoraka tkiva .....	15
3.3.10.3. Merenje koncentracije bioelemenata .....	15
3.4. <i>IN VIVO</i> ISPITIVANJE NA MODELU ZEBRICE .....	15
3.4.1. Zebrice.....	15
3.4.2. Eksperimentalni protokol .....	15
3.4.3. Ispitivanje akutne toksičnosti .....	16
3.4.4. Ispitivanje hepatotoksičnosti .....	17
3.4.5. Benčmark modelovanje doza-odgovor .....	17
3.5. <i>IN SILICO</i> TOKSIKOGENOMIČKA ANALIZA PODATAKA .....	17
3.6. <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJE UTICAJA PROBIOTIKA NA SMANJENJE KONCENTRACIJE FTALATA I BISFENOLA A .....	24
3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	25
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>26</b>
4.1. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI FTALATA, BISFENOLA A I NJIHOVE SMEŠE .....	26
4.1.1. <i>In vivo</i> rezultati na modelu pacova .....	26
4.1.1.1. Prirast telesne mase.....	26
4.1.1.2. Unos hrane i vode .....	26
4.1.1.3. Relativne mase organa .....	28
4.1.1.4. Hematološki parametri.....	29
4.1.1.5. Biohemijski parametri .....	30
4.1.1.6. Nivoi hormona.....	34
4.1.1.7. Patohistološki nalazi .....	35
4.1.1.7.1. Jetra .....	35

4.1.1.7.2.	Testisi .....	35
4.1.1.7.3.	Slezina .....	37
4.1.1.7.4.	Bubrezi .....	38
4.1.1.7.5.	Mozak .....	39
4.1.1.8.	Parametri oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite .....	40
4.1.1.9.	Bioelementi .....	44
4.1.2.	<i>In vivo</i> rezultati na modelu zebrice .....	46
4.1.2.1.	Letalni i efekti na rast i razvoj .....	46
4.1.2.2.	Hepatotoksičnost .....	47
4.1.2.3.	Benčmark analiza doza-odgovor .....	49
4.1.3.	<i>In silico</i> rezultati toksikogenomičke analize podataka .....	50
4.1.3.1.	Interakcije sa genima .....	50
4.1.3.2.	Oštećenje jetre .....	50
4.1.3.3.	Poremećaj muškog reproduktivnog sistema .....	54
4.1.3.4.	Dijabetes .....	58
4.1.3.5.	Astma .....	63
4.1.3.6.	Gojaznost .....	65
4.2.	<b>ISPITIVANJE PROTEKTIVNOG DEJSTVA PROBIOTIKA</b> .....	72
4.2.1.	<i>In vitro</i> rezultati uticaja probiotika na smanjenje koncentracije ftalata i bisfenola A .....	72
4.2.2.	<i>In vivo</i> rezultati na modelu pacova .....	72
4.2.2.1.	Prirast telesne mase .....	72
4.2.2.2.	Unos hrane i vode .....	73
4.2.2.3.	Relativne mase organa .....	75
4.2.2.4.	Hematološki parametri .....	75
4.2.2.5.	Biohemijski parametri .....	76
4.2.2.6.	Nivoi hormona .....	77
4.2.2.7.	Patohistološki nalazi .....	78
4.2.2.7.1.	Jetra .....	78
4.2.2.7.2.	Testisi .....	79
4.2.2.7.3.	Bubrezi .....	80
4.2.2.7.4.	Slezina .....	81
4.2.2.7.5.	Mozak .....	82
4.2.2.8.	Parametri oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite .....	82
4.2.2.9.	Bioelementi .....	86
4.2.3.	<i>In vivo</i> rezultati na modelu zebrice .....	87
4.2.3.1.	Letalni i efekti na rast i razvoj .....	87
4.2.3.2.	Hepatotoksičnost .....	88

## **5. DISKUSIJA ..... 90**

5.1.	<b>TOKSIČNOST FTALATA, BISFENOLA A I NJIHOVE SMEŠE</b> .....	90
5.1.1.	Prirast mase, unos hrane i vode .....	90
5.1.2.	Inflamacija i dejstvo na slezinu .....	91
5.1.3.	Dejstvo na lipidni profil .....	91
5.1.4.	Dejstvo na jetru .....	92
5.1.5.	Dejstvo na bubrege .....	95
5.1.6.	Dejstvo na štitastu žlezdu .....	96
5.1.7.	Molekularni mehanizmi poremećaja funkcije muškog reproduktivnog sistema povezani sa smešom ftalata i bisfenola A .....	97
5.1.7.1.	Androgena aktivnost i nivo testosterona u serumu .....	97
5.1.7.2.	Zajednički geni i molekularni putevi .....	99
5.1.7.3.	Nuklearni receptori i receptor za aromatične ugljovodonike .....	100
5.1.7.4.	Apoptoza .....	100
5.1.7.5.	Oksidativni stres .....	101
5.1.8.	Molekularni mehanizmi razvoja dijabetesa povezani sa smešom ftalata i bisfenola A .....	102
5.1.8.1.	Zajednički geni i molekularni putevi .....	103
5.1.8.2.	Apoptoza .....	103
5.1.8.3.	Oksidativni stres .....	104
5.1.9.	Molekularni mehanizmi razvoja astme povezani sa smešom ftalata i bisfenola A .....	105
5.1.9.1.	Zajednički geni i molekularni putevi .....	105
5.1.9.2.	Oksidativni stres .....	105
5.1.9.3.	Bioelementi .....	106
5.1.10.	Molekularni mehanizmi razvoja gojaznosti povezani sa smešom ftalata i bisfenola A .....	107
5.1.10.1.	Zajednički geni i molekularni putevi .....	107
5.1.11.	Ostali toksični efekti na zebricama .....	110
5.2.	<b>PROTEKTIVNO DEJSTVO PROBIOTIKA</b> .....	111
5.2.1.	Promene kod pacova izazvane smešom ftalata i bisfenola A .....	113
5.2.1.1.	Dejstvo na jetru .....	113

5.2.1.2.	Dejstvo na glukozu i lipidni profil .....	114
5.2.1.3.	Dejstvo na slezinu i inflamaciju.....	115
5.2.1.4.	Dejstvo na bubrege .....	116
5.2.1.5.	Dejstvo na ostale parametre .....	117
5.2.2.	Promene na zebricama izazvane smešom ftalata i bisfenola A.....	117
<b>6.</b>	<b><u>ZAKLJUČCI.....</u></b>	<b>119</b>
<b>7.</b>	<b><u>LITERATURA.....</u></b>	<b>121</b>
<b>8.</b>	<b><u>PRILOZI.....</u></b>	<b>141</b>
	BIOGRAFIJA AUTORA.....	141
	OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE.....	142
	ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ .....	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
	ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА.....	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
	<b>DEFINED.</b>	
	ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ .....	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>



## Spisak slika

Slika 1. Dijagram <i>in silico</i> analize sprovedene da bi se ispitaio uticaj smeše DEHP/DBP/BPA na oštećenja jetre.....	20
Slika 2. Dijagram <i>in silico</i> analize sprovedene sa ciljem ispitivanja uticaja smeše DEHP/DBP/BPA na razvoj poremećaja muškog reproduktivnog sistema .....	21
Slika 3. Dijagram <i>in silico</i> analize sprovedene sa ciljem ispitivanja uticaja smeše DEHP/DBP/BPA na razvoj dijabetes melitusa tipa 2 .....	22
Slika 4. Dijagram <i>in silico</i> analize sprovedene sa ciljem ispitivanja uticaja smeše DEHP/DBP/BPA na razvoj astme .....	23
Slika 5. Dijagram <i>in silico</i> analize sprovedene sa ciljem ispitivanja uticaja smeše DEHP/DBP/BPA na razvoj gojaznosti .....	24
Slika 6. A. Unos hrane (g/dan) i B. vode (mL/dan) nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana .....	28
Slika 7. Biohemijski parametri u serumu povezani sa funkcijom jetre nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana.....	33
Slika 8. Lipidni profil nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana .....	34
Slika 9. Patohistološki nalazi u jetri nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana.....	35
Slika 10. Patohistološki nalazi u testisima nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana .....	36
Slika 11. Patohistološki nalazi u slezini nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana .....	38
Slika 12. Patohistološki nalazi u bubrezima nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana .....	39
Slika 13. Patohistološki nalazi u mozgu nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana .....	40
Slika 14. Akutna toksičnost nakon 5-dnevnog izlaganja embriona zebrica različitim koncentracijama BPA, DEHP, DBP i njihovoj smeši (n = 90 po dozi) .....	46
Slika 15. Hepatotoksičnost nakon izlaganja embriona zebrice Tg(-2.8fabp10a:EGFP) sa fluorescentno obeleženom jetrom (n = 10) različitim koncentracijama BPA, DEHP, DBP i njihovoj smeši u različitim koncentracijama .....	48
Slika 16. Dozna zavisnost hepatotoksičnosti kod embriona zebrice procenjena na osnovu indeksu površine jetre u različitim scenarijima izloženosti.....	49
Slika 17. Ontologija gena - GO: biološki procesi i molekularne funkcije povezani sa genima uključenim u oštećenje jetre i smešom DEHP, DBP i BPA .....	52
Slika 18. Konstruisane mreže gena uključenih u oštećenje jetre i povezanih sa smešom DEHP/DBP/BPA .....	53
Slika 19. Konstruisane mreže gena uključenih u poremećaje muškog reproduktivnog sistema i povezanih sa smešom DEHP/DBP/BPA .....	56
Slika 20. Konstruisane mreže gena uključenih u razvoj T2DM i povezanih sa smešom DEHP/DBP/BPA .....	59
Slika 21. Mreža interakcija između 31 gena povezanih sa razvojem gojaznosti na koji deluju DEHP, DBP i BPA dobijena pomoću <i>SetAnalyzer</i> alata ( <i>SetAnalyzer</i> CTD tool - <a href="http://ctdbase.org/tools/analyzer.go">http://ctdbase.org/tools/analyzer.go</a> ; integrisano iz <i>BioGRID</i> baze podataka) .....	67

Slika 22. Konstruisana mreža gena uključenih u razvoj gojaznosti i povezanih sa smešom DEHP/DBP/BPA ( <i>GeneMANIA</i> prediktivni server - <a href="https://genemania.org">https://genemania.org</a> ).....	68
Slika 23. Koncentracije ispitivanih supstanci DEHP, DBP, BPA prisutnih u smeši nakon inkubacije kada je prisutna sama smeša ispitivanih supstanci (MIX metanolni rastvor), nakon inkubacije sa jednodokomponentnim probiotskim preparatom (MIX metanolni rastvor + B), nakon inkubacija sa višekomponentnim probiotskim preparatom (MIX rastvor metanola + P).....	72
Slika 24. A. Unos hrane (g/dan) i B. vode (mL/dan) nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika .....	74
Slika 25. Relativna masa organa nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika .....	75
Slika 26. Nivoi hormona u serumu nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika.....	78
Slika 27. Patohistološki nalazi na jetri nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika.....	79
Slika 28. Patohistološki nalazi na testisima nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika .....	80
Slika 29 Patohistološki nalazi na bubrezima nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika .....	81
Slika 30. Patohistološki nalazi na slezini nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika .....	82
Slika 31. Patohistološki nalazi na mozgu pacova nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika .....	82
Slika 32. Efekti različitih koncentracija višekomponentnog i jednodokomponentnog probiotika na embrionima zebrica.....	88
Slika 33. Protektivni efekat probiotika protiv hepatotoksičnosti DEHP, DBP, BPA i njihove smeše kod embriona zebrice Tg(-2.8fabp10a:EGFP) sa fluorescentno obeleženom jetrom (n = 10) ..	89

## Spisak tabela

Tabela 1. Metode određivanja parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite u plazmi i tkivima pacova nakon izlaganja DEHP, DBP, BPA i njihovoj smeši, kao i smeši sa dodatkom probiotika, u toku 28 dana.....	14
Tabela 2. Koncentracije bis(2-etilheksil) ftalata (DEHP), dibutil ftalata (DBP) i bisfenola A (BPA), primenjene u smeši .....	16
Tabela 3. Praćeni letalni i efekti na rast i razvoj na embrionima zebrice tokom 120 h časova posle oplodjenja (hpf).....	16
Tabela 4. Prirast telesne mase nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana.....	26
Tabela 5. Unos hrane nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana.....	27
Tabela 6. Unos vode nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana.....	27
Tabela 7. Relativne mase organa nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana.....	28
Tabela 8. Hematološki parametri nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana.....	29
Tabela 9. Biohemijski parametri u serumu nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana .....	30
Tabela 10. Nivoi hormona u serumu nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana.....	34
Tabela 11. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi i tkivima nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana .....	42
Tabela 12. Bioelementi (Cu, Zn i Fe) u različitim tkivima nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana .....	45
Tabela 13. Efekat DEHP, DBP i BPA i njihove smeše na razvoj jetre embriona zebrice nakon dvodnevno izlaganja procenjen prema indeksu površine jetre (engl. <i>Liver area index</i> , LA)..	48
Tabela 14. Broj gena/proteina i interakcija za ftalate i bisfenol A (CTD ( <a href="http://CTD.mdibl.org">http://CTD.mdibl.org</a> ))...	50
Tabela 15. Geni uključeni u razvoj oštećenja jetre izazvanog hemikalijama DEHP, DBP, BPA i njihovom smešom (CTD ( <a href="http://CTD.mdibl.org">http://CTD.mdibl.org</a> ) + <i>MyVenn CTD tool</i> ( <a href="http://ctdbase.org/tools/myVenn.go">http://ctdbase.org/tools/myVenn.go</a> )) .....	51
Tabela 16. Interakcije između svake od pojedinačnih supstanci (DEHP, DBP i BPA) i 10 izdvojenih najznačajnijih gena povezanih sa oštećenjem jetre (CTD ( <a href="http://CTD.mdibl.org">http://CTD.mdibl.org</a> )) .....	54
Tabela 17. Geni uključeni u razvoj poremećaja muškog reproduktivnog sistema izazvanih DEHP, DBP, BPA i njihovom smešom (CTD ( <a href="http://CTD.mdibl.org">http://CTD.mdibl.org</a> ) i <i>MyVenn CTD alat</i> ( <a href="http://ctdbase.org/tools/myVenn.go">http://ctdbase.org/tools/myVenn.go</a> )) .....	54
Tabela 18. Interakcije između svake od ispitivanih supstanci (DEHP, DBP i BPA) i 20 zajedničkih gena povezanih sa poremećajima muškog reproduktivnog sistema - neplodnošću, kriptorhidizmom, hipospadijom, neoplazmama testisa i tumorom germinativnih ćelija testisa (CTD ( <a href="http://CTD.mdibl.org">http://CTD.mdibl.org</a> )) .....	55
Tabela 19. Ontologija gena - GO: biološki procesi i molekularne funkcije povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na poremećaje muškog reproduktivnog sistema - mušku neplodnost, kriptorhidizam, hipospadiju, neoplazme testisa i tumor germinativnih ćelija testisa ( <i>ToppGene ToppFun</i> funkcija) .....	57

Tabela 20. Geni uključeni u razvoj T2DM izazvanog DEHP, DBP, BPA i njihovom smešom (CTD ( <a href="http://CTD.mdibl.org">http://CTD.mdibl.org</a> ) i <i>MyVenn</i> CTD alat ( <a href="http://ctdbase.org/tools/myVenn.go">http://ctdbase.org/tools/myVenn.go</a> )).....	58
Tabela 21. Interakcije između svake od pojedinačnih supstanci (DEHP, DBP i BPA) i 44 zajednička gena povezana sa razvojem T2DM (CTD ( <a href="http://CTD.mdibl.org">http://CTD.mdibl.org</a> )) .....	60
Tabela 22. Ontologija gena - GO: biološki procesi povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na T2DM ( <i>TopGenne's ToppFun</i> funkcija - <a href="https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp">https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp</a> ) .....	61
Tabela 23. Molekularni putevi povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na razvoj T2DM ( <i>TopGenne's ToppFun</i> funkcija - <a href="https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp">https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp</a> ) .	62
Tabela 24. Najvažnijih 15 bolesti povezanih sa T2DM u kojima su uključena 44 gena zajednička za DEHP, DBP, BPA ( <i>TopGenne's ToppFun</i> funkcija - <a href="https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp">https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp</a> ) .....	62
Tabela 25. Geni uključeni u razvoj astme izazvane DEHP, DBP, BPA i njihovom smešom (CTD ( <a href="http://CTD.mdibl.org">http://CTD.mdibl.org</a> ) + <i>MyVenn</i> CTD alat ( <a href="http://ctdbase.org/tools/myVenn.go">http://ctdbase.org/tools/myVenn.go</a> )).....	63
Tabela 26. Interakcije između svake od pojedinačnih supstanci (DEHP, DBP i BPA) i 24 zajednička gena povezana sa razvojem astme (CTD ( <a href="http://CTD.mdibl.org">http://CTD.mdibl.org</a> )). .....	64
Tabela 27. Ontologija gena (GO: biološki procesi i molekularne funkcije) i molekularni putevi povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na razvoj astme ( <i>TopGenne's ToppFun</i> funkcija – <a href="https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp">https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp</a> ). .....	64
Tabela 28. 31 DEHP/DBP/BPA gen povezan sa razvojem gojaznosti na koji sve tri supstance deluju na isti način (CTD ( <a href="http://CTD.mdibl.org">http://CTD.mdibl.org</a> )).....	65
Tabela 29. Molekularni putevi povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na razvoj gojaznosti (CTD ( <a href="http://CTD.mdibl.org">http://CTD.mdibl.org</a> ) – <i>MyVenn</i> ( <a href="http://ctdbase.org/tools/myVenn.go">http://ctdbase.org/tools/myVenn.go</a> ) i <i>SetAnalyzer</i> CTD alati ( <a href="http://ctdbase.org/tools/analyzer.go">http://ctdbase.org/tools/analyzer.go</a> )) .....	68
Tabela 30. Ontologija gena – GO: biološki procesi i molekularne funkcije povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na razvoj gojaznosti ( <i>TopGenne's ToppFun</i> funkcija - <a href="https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp">https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp</a> ) .....	69
Tabela 31. Najvažnijih 10 komorbiditeta gojaznosti u koje je uključen 31 gen zajednički za sve tri ispitivane supstance (DEHP, DBP, BPA) ( <i>TopGenne's ToppFun</i> funkcija - <a href="https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp">https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp</a> ) .....	70
Tabela 32. Najznačajniji gen-bolest parovi za odabranih 7 gena - CCL2, IL6, LPL, PPARA, PPARG, SERPINE1, TNF ( <i>DisGeNET</i> baza podataka - <a href="http://www.disgenet.org">http://www.disgenet.org</a> ).....	71
Tabela 33. Prirast telesne mase nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika.....	72
Tabela 34. Ukupan unos hrane i vode nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika.....	74
Tabela 35. Hematološki parametri nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika.....	76
Tabela 36. Biohemijski parametri nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika.....	77
Tabela 37. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi i tkivima nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika .....	84
Tabela 38. Bioelementi u tkivima nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika.....	87

## 1. Uvod

Poslednjih decenija, usled široke upotrebe hemikalija, važnost procene rizika pri izloženosti smeši hemikalija postaje realan scenario, s obzirom na to da su ljudi konstantno i istovremeno izloženi većem broju hemijskih supstanci [1–3]. Izloženost se obično javlja pri niskim dozama, iz različitih izvora ekspozicije i kroz različite puteve unosa [4]. Iako je broj studija koje se bave ispitivanjem toksičnosti smeša u porastu i dalje je nedovoljno relevantnih, kvalitativnih i kvantitativnih podataka o tzv. „koktel“ efektima supstanci u smeši. Više studija toksičnosti pokazalo je značaj koncepta aditivnosti u istraživanju kombinovanih efekata hemikalija, što podrazumeva da se efekti smeše javljaju čak i kada su sve komponente smeše prisutne u nivoima ispod doza koje izazivaju štetne efekte u studijama koje ispituju toksičnost pojedinačnih hemikalija [5,6]. Imajući, pak, u vidu da većina smeša sadrži više komponenti, kvantifikovanje ovih interakcija u smislu procene rizika je veoma zahtevan zadatak, posebno kada se uzme u obzir složenost formulacije problema, veliki broj hemikalija prisutnih u životnoj sredini, kao i broj podataka potrebnih za opisivanje složenih toksikoloških profila i obrazaca izloženosti [7,8]. Jedan od najvećih izazova toksikologije je da se kvantitativno predvide efekti smeša hemikalija iz znanja o toksičnosti njihovih pojedinačnih komponenti. Takva predviđanja se mogu postići ako se pretpostavi da hemikalije u smeši deluju tako što ispoljavaju svoje efekte bez umanjivanja ili povećanja toksičnosti drugih hemikalija prisutnih u smeši - pretpostavka aditivnosti ili nepostojanja interakcije. S druge strane, sinergizam i antagonizam se mogu definisati u odnosu na pretpostavku aditivnosti, kao odstupanje u vidu pojave jačeg ili slabijeg odgovora usled postojanja određenih interakcija [7].

Studije na životinjama predstavljaju tradicionalni pristup koji se decenijama unazad sprovodi za procenu toksičnosti [9,10]. Međutim, ove metode su ograničene dugim vremenom ispitivanja, ogromnim finansijskim izdacima, kao i etičkim pitanjima [9]. Ipak, na osnovu podataka američke Agencije za zaštitu životne sredine (engl. *U.S. Environmental Protection Agency*, US EPA), godišnje se podnese oko 20000 do 100000 zahteva za sprovođenje eksperimenata na životinjama, najčešće na vrstama poput miševa, pacova, kunića, zamoraca, pasa itd. [11]. Međutim, različite neprofitne organizacije, regulatorne agencije (US EPA, Evropska agencija za hemikalije – engl. *European Chemical Agency*, ECHA) i međunarodne organizacije (Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj – engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) promovišu inicijativu za smanjenje broja testiranja na životinjama [12]. Sve više se sprovode validirani *in vitro* testovi da bi se ispitala bezbednost različitih hemikalija, dok su nedavno učinjeni napor da se razviju novi *in vitro* modeli kao što je „organ na čipu“ kako bi se smanjili ukupni troškovi ispitivanja. Međutim, ovi pristupi i dalje su u povoju i iziskuju dodatna ulaganja i validaciju kako bi bili prihvaćeni za ispitivanje toksičnosti [13].

Poslednjih godina, model zebrića (*Danio rerio*) pronalazi sve veću ulogu i široku primenu u biomedicinskim, farmakološkim i toksikološkim ispitivanjima kao alternativna metoda procene toksičnosti, imajući u vidu da su molekularno-genetički putevi i fiziološke funkcije na nivou ćelija i organa visoko uporedivi između zebrića i ljudi [14,15]. Prema EFSA (2005) smernicama, upotreba embriona zebrića je prihvatljivija jer embrion u ranom stadijumu razvoja ne oseća bol i nelagodnost [16]. Ovaj model ispitivanja ima mnoge prednosti za proučavanje primarnih bioloških procesa, efekata i mehanizama. Ima kratak reproduktivni ciklus, visoku plodnost, optički transparentne embrione sa brzim razvojem, kao i dostupnu sekvencu celog genoma [17]. Štaviše, jetra embriona zebriće poseduje veliki broj enzima uključenih u fazu I i fazu II metaboličke transformacije, što omogućava detekciju hepatotoksičnih efekata [18–20]. Potpuna optička transparentnost embriona zebrića omogućava praćenje uticaja toksičnih supstanci na razvoj unutrašnjih organa primenom neinvazivnih metoda mikroskopiranja i vizualizaciju pojave toksičnih efekata kao što su efekti na

rast i razvoj, hepatotoksičnost, kardiotoksičnost, neurotoksičnost, mijelosupresija, inflamacija i nekroza tkiva. Takođe, zbog visoke osjetljivosti, za sprovođenje testova toksičnosti na zebrićama dovoljne su veoma male količine ispitivanih supstanci. Dodatno, ova metoda ispitivanja je jednostavna za izvođenje i ne iziskuje značajna finansijska sredstva [21].

Takođe, u cilju daljeg smanjenja testiranja na životinjama do 2035. godine, US EPA je preporučila *in silico* ispitivanje za procenu različitih štetnih efekata [11], što podrazumeva primenu raznovrsnih računarskih pristupa koji mogu da analiziraju, simuliraju, vizuelizuju, ili predvide toksičnost. *In silico* modeli su veoma složeni i zasnovani na obimnom broju podataka iz statistike, matematike, bioinformatike, biohemije i molekularne biologije [22,23]. I pored njihovih značajnih ograničenja i nepouzdanosti, očekuje se da će *in silico* testovi unaprediti procenu kombinovane toksičnosti hemikalija i da će, integracijom sa eksperimentalnim testovima, obezbediti sveobuhvatni pristup za procenu rizika po zdravlje ljudi [24,25]. Štaviše, tokom poslednjih nekoliko decenija, ogromne količine podataka o toksičnosti prikupljene su u bazama podataka. U većini slučajeva ove baze koriste se za pristup eksperimentalnim podacima i sadrže informacije koje mogu poslužiti kao osnova za razvoj novih naučnih hipoteza [26]. Toksikogenomičke metode, koje mogu uključivati ne samo genomiku, već i transkriptomiku, proteomiku, metabolomiku i epigenomiku, nastoje da razjasne molekularne mehanizme toksičnosti. Osim toga, pokušavaju da identifikuju obrasce ekspresije (tj. biomarkere), da predvide toksičnost ili genetsku predispoziciju na štetno dejstvo hemikalija i na taj način usmere dalja *in vitro* i *in vivo* istraživanja. Toksikogenomičke metode imaju potencijal da predvide funkcije gena u okviru specifičnih bioloških puteva, kao i da smanje skupove gena za dalja ispitivanja [27]. Samim tim, analiza toksikogenomičkih podataka može biti posebno korisna za istraživanje mehanizama toksičnosti hemikalija prisutnih u životnoj sredini i identifikaciju njihovog kombinovanog uticaja na različite štetne ishode, sa ciljem da se ustanovi prioritet daljih laboratorijskih istraživanja [28]. Ovo je od posebnog značaja imajući u vidu da su rezultati epidemioloških ispitivanja i studija humanog biomonitoringa pokazali da izloženost smešama hemikalija može da se dovede u vezu sa razvojem različitih bolesti, odnosno toksičnim efektima po zdravlje ljudi, koji se ispoljavaju na različitim organima i sistemima organa, kao što su jetra, bubrezi, centralni nervni i kardiovaskularni sistem, dok se poslednjih godina intenzivno proučavaju efekti hemikalija na endokrini sistem [3,29–31].

## 1.1. Endokrini ometači

Endokrini ometači (engl. *Endocrine disruptors*, ECDs) su jedinjenja sa potencijalom da naruše regulaciju hormona i normalno funkcionisanje endokrinog sistema, utičući na zdravlje i reprodukciju kako ljudi, tako i životinja [32]. Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije (enlg. *World Health Organisation*, WHO), predstavljaju „egzogene supstance ili smeše koje menjaju funkciju endokrinog sistema i posledično izazivaju štetne efekte u intaktnom organizmu, njegovom potomstvu, ili (sub)populaciji“ [33]. Na osnovu regulative Evropske unije o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničenjima hemikalija (engl. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*, REACH), brojne hemikalije svrstane su na listu endokrinih ometača, poput dihlordifeniltrihloroetana (DDT), polihlorovanih bifenila (PCB), polibromovanih difeniletara (PBDE), parabena, pojedinih toksičnih metala (olovo, kadmijum), kao i ftalata i BPA [34–37].

## 1.2. Ftalati

### 1.2.1. Struktura i primena

Dialkil/alkil-aril estri o-ftalne kiseline, poznatiji pod nazivom ftalati, imaju primenu kao plastifikatori u proizvodnji polivinil hlorida (PVC), u koji se dodaju radi poboljšanja elastičnosti i mogu činiti i do 40% finalnog proizvoda [38]. Naširoko se koriste već više od 50 godina i 2011. u Zapadnoj Evropi njihova proizvodnja na godišnjem nivou obuhvatala je količinu veću od milion tona godišnje [38,39]. U zavisnosti od alkohola koji sadrže, mogu se podeliti na kratkolančane i

dugolančane. Dugolančani ftalati (diizononil ftalat (DINP), didizodecil ftalat (DIDP), bis(2-etilheksil) ftalat (DEHP), di-n-oktil ftalat (DNOP), itd) koriste se kao plastifikatori u PVC industriji, koji se upotrebljava za izradu velikog broja potrošačkih proizvoda, ambalaže za hranu, građevinskog materijala, dečijih igračaka i medicinske opreme [38,40]. Kratkolančani ftalati, poput dimetil ftalata (DMP), dietil ftalata (DEP), benzil butil ftalata (BBP), diizobutil ftalata (DIBP), koriste se pri izradi plastike celuloznog sastava, lekova, kozmetičkih proizvoda, boja i lakova [38]. Ftalati sa plastičnim polimerima stupaju u slabe fizičke interakcije, ne formirajući čvrste hemijske veze, zbog čega postoji mogućnost njihove migracije i isparavanja iz proizvoda [41]. Samim tim, usled njihove široke primene i konstantnog oslobađanja, ljudi neprestano dolazi u kontakt sa ovim supstancama [38]. Od svih ftalata, DEHP i DBP su najčešće istraživani i smatraju se najzastupljenijima u životnoj sredini [42,43].

### 1.2.2. Izloženost

Ljudi mogu dospeti u kontakt sa ftalatima iz velikog broja izvora (hrana, vazduh, prašina, kozmetički proizvodi, itd) [44]. Dugolančani ftalati dospevaju u organizam ljudi dominantno ingestijom kontaminirane hrane ili prašine, ili, kada su deca u pitanju, u kontaktu sa plastičnim igračkama, a kratkolančani inhalacijom (u slučaju isparavanja iz plastike, lakova za nokte, dezodoransa, sprejeva za kosu i ostalih proizvoda koji ih sadrže) ili preko kože, najčešće putem kozmetičkih proizvoda [40]. U organizam se mogu uneti čak i parenteralnim putem, primenom medicinskih sredstava u intenzivnoj nezi pacijenata [38,45]. Takođe, dodaju se kao pomoćne supstance velikom broju farmaceutskih oblika za peroralnu primenu, gde mogu imati ulogu plastifikatora u film-oblogama tableta, veziva u kapsulama, ili, pak, služiti za kontrolu viskoziteta određenih tečnih formulacija [44]. Ipak, hrana se smatra glavnim izvorom izloženosti opšte populacije ftalatima [46].

### 1.2.3. Toksikokinetika

Nakon apsorpcije, ftalati se brzo metabolišu pomoću reakcija hidrolize i oksidacije [38]. Mogu da prođu i kroz placentu, dovodeći do negativnog uticaja na fetus i novorođenčad [47]. Većina ftalata se eliminiše iz organizma u toku prva 24 časa nakon izloženosti, pri čemu su monoestri glavni metaboliti kratkolančanih ftalata, dok se, u slučaju dugolančanih, monoestri dalje metabolišu oksidacijom do velikog broja metabolita (alkoholi, ketoni, karboksilne kiseline) [38]. Putem urina izlučuje se 70% unete količine ftalata. Samo 2-7% unete količine dugolančanih ftalata izluči se u obliku monoestara. Sekundarni metaboliti, nastali  $\omega$ -,  $\omega$ -1- i  $\beta$ -oksidacijom, predstavljaju glavne metabolite dugolančanih ftalata koji se mogu detektovati u urinu [38]. Pored urina, ftalati i njihovi metaboliti mogu se detektovati u krvi, salivi, amnijskoj tečnosti i majčinom mleku [41].

### 1.2.4. Toksičnost

Štetni efekti koji mogu biti prouzrokovani ftalatima razlikuju se u zavisnosti od njihove hemijske strukture, dužine ekspozicije i unete doze, dok su mladi organizmi osetljiviji od odraslih [48]. Dejstvo na reproduktivni sistem izdvojeno je kao najznačajniji toksični efekat ftalata, pri čemu ove supstance remete androgenu funkciju dovodeći do izmena u ekspresiji gena uključenih u razvoj muškog reproduktivnog sistema [38]. *In utero* ekspozicija ftalatima ometa sintezu steroidnih hormona na nivou transkripcione regulacije, prouzrokujući smanjenje njihovog nivoa u krvi [49]. Takođe, utiču na sintezu insulini sličnog faktora 3, kao i folikulostimulirajućeg hormona, što dalje može prouzrokovati malformacije internih i eksternih genitalnih organa, kriptorhizam, smanjenje spermatogeneze i plodnosti. Svi ovi simptomi, čija pojava je zabeležena kod eksperimentalnih životinja, i koji se najviše odražavaju u fetalnom razvoju i reproduktivnim anomalijama, jednim imenom označeni su kao „sindrom ftalata“ [38,47]. Pokazano je da ftalati mogu izazvati različite štetne efekte na jetru podstičući akumulaciju lipida i dovodeći do nastanka oksidativnog stresa u hepatocitima blokiranjem JAK2/STAT5 puta. Pored toga, izloženost ftalatima može uticati na

metabolizam holesterola u jetri, time doprinoseći razvoju fibroze [50]. Takođe, izloženost ftalatima može se dovesti u vezu sa različitim oboljenjima poput dijabetes melitusa (DM), insulinske rezistencije, gojaznosti, alergije, astme i neurorazvojnih poremećaja [47]. Mogu uticati na preuzimanje i oksidaciju glukoze u jetri, kao i na sniženje ekspresije mRNA insulinskih receptora [51], sniženja sekrecije insulina i, samim tim povišenja nivoa glukoze u serumu [52], što su pojedini naučnici povezali sa aktivacijom Jun-N-terminalne kinaze (JNK) [53], nastankom reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) i apoptozom  $\beta$ -ćelija pankreasa posredovanom PI3K/Akt/Bcl-2 molekularnim putem [54], kao i smanjenjem odnosa Bcl-2/Bax i povećanjem nivoa ekspresije gena kaspaze 9 i kaspaze 3 [54]. Dodatno, izloženost ftalatima povezana je sa indukcijom infiltracije inflamatornih ćelija u disajnim putevima [55], oslabljenom funkcijom pluća, atopijskim dermatitisom i pojačanim odgovorom *T helper 2* (Th2) ćelija [56]. Ove supstance mogu uticati na razvoj gojaznosti, direktno intereagujući sa adipocitima, ometanjem regulisanja apetita, metabolizma lipida i njihove homeostaze dejstvom na receptore povezane sa aktivacijom proliferatora peroksizoma (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR) [47], kao i remećenjem antiandrogene aktivnosti i funkcije štitaste žlezde [40,47]. Dva najprisutnija i najčešće istraživana ftalata, DEHP i DBP, ispoljavaju toksičnost sličnim mehanizmima i imaju najveći uticaj na razvoj metaboličkih poremećaja [42,43].

### 1.2.5. Regulativa

Usled široke upotrebe i izloženosti ljudi, kao i potencijala ispoljavanja toksičnog efekta na reproduktivni sistem, a na osnovu REACH uredbe, uvedena su ograničenja i zabrane koje se odnose na upotrebu pojedinih ftalata. Prema Pravilniku o ograničenjima i zabranama proizvodnje, stavljanja u promet i korišćenja hemikalija („Sl. glasnik RS“, br. 90/2013-26, 25/2015-83, 2/2016-15, 44/2017-50, 36/2018-53, 9/2020-164, 57/2022-9) ograničena je upotreba DEHP, DBP, BBP i DiBP u proizvodnji dečjih igračaka i predmeta namenjenim za negu dece, kao i DINP, DIDP i DNOP u proizvodnji igračaka i predmeta namenjenih za negu dece koje deca mogu stavljati u usta, pri čemu njihov sadržaj ne sme da bude veći od 0,1% ukupne mase plastificiranog materijala. Dodatno, najnovija ograničenja i zabrane (koje će se primenjivati od 2023. godine) odnose se na DEHP, DBP, BBP i DiBP, kojih ne sme biti više 0,1% od masenog udela u plastificiranom materijalu proizvoda koji se koriste u zatvorenom prostoru. Ova zabrana se odnosi i na predmete koji se koriste na otvorenom prostoru, prilikom čega su u dužem kontaktu sa ljudskom kožom, što, prema pravilniku, podrazumeva neprekidni kontakt u trajanju dužem od 10 minuta ili povremeni kontakt tokom perioda od 30 minuta dnevno. Takođe, na osnovu regulative Evropske unije REACH i člana 43. stava 1. Zakona o hemikalijama („Službeni glasnik RS“, br. 36/09, 88/10, 92/11 i 93/12), DEHP, DBP, BBP i DiBP svrstani su na Listu supstanci koje izazivaju zabrinutost („Službeni glasnik RS“, br. 94/2013, 101/2016, 22/2018, 86/2021), a zbog utvrđene toksičnosti po reprodukciju, prilikom čega je za DEHP, DBP i BBP navedeno da nije potrebno propisati dodatne mere za smanjenje rizika ako se koriste za izradu ambalaže koja je u direktnom kontaktu sa lekom, u skladu sa propisima kojima se uređuju lekovi i medicinska sredstva.

## 1.3. Bisfenol A

### 1.3.1. Struktura i primena

Bisfenol A (BPA) je monomer prvobitno razvijen kao sintetički estrogen 1890-ih godina, a za koga je eksperimentalnim studijama potvrđeno da oponaša dejstvo estrogena i na taj način stimuliše aktivnost ženskog reproduktivnog sistema [57]. Kasnije, BPA je korišćen u proizvodnji mnogih potrošačkih proizvoda, najčešće kao polimer u polikarbonatnoj i PVC plastici, ambalaži za hranu, zubnim plombama, termičkom papiru, bojama na bazi epoksidne smole, medicinskim uređajima, mastilima za štampanje i sredstvima za usporavanje gorenja [57,58]. Ukupno 2,8 miliona tona BPA proizvedeno je 2002. godine, dok je 2011. godine procenjena proizvodnja iznosila 5,5 miliona tona [57].



### 1.3.2. Izloženost

Ljudi u organizam BPA mogu uneti oralnim, dermalnim i inhalacionim putem. Opšta populacija izložena je BPA zahvaljujući mnogobrojnim proizvodima od plastike i metalnih kontejnera sa plastičnim i epoksidnim oblogama. Izvori BPA uključuju plastične flaše za piće, prehrambene proizvode, pića u konzervama i metalne posude za hranu (poput onih koje se koriste za konzervirano voće i povrće i formule za bebe). Brojni drugi potrošački proizvodi takođe mogu sadržati BPA, poput kompaktnih diskova, naočara, igračkica, biciklističkih kaciga i medicinskih uređaja i sredstava [59]. Takođe, podovi i električna oprema izrađena od polikarbonata i polietilena može biti izvor BPA. Za opštu populaciju od najvećeg značaja je izloženost putem hrane u koju ova supstanca može da dospe iz predmeta koji sa njom dolaze u kontakt, ali i boravak u zatvorenom prostoru u kome se nalaze predmeti koji u svom sastavu imaju BPA [60]. Zaposleni koji rade za kasom za izdavanje računa konstantno mogu biti izloženi preko termalnog papira ukoliko sadrži BPA, prilikom čega su više koncentracije BPA detektovane u urinu ovih osoba u odnosu na koncentracije kod opšte populacije [61]. Takođe, BPA može poticati iz elektronskih uređaja, lepila, boja i podnih obloga [62,63], kao i medicinskih sredstava, posebno materijala koji se koriste u stomatologiji (zubne plombe, punjenja i krunice), oftalmologiji, i aparata za dijalizu [63,64].

### 1.3.3. Toksikokinetika

Resorpcija BPA nakon peroralnog unosa je veoma brza i efikasna (95% unete doze), dok se njen maksimum dostiže 80 minuta nakon unosa [65,66]. U prvoj fazi metabolizma BPA ne stupa u reakcije poput oksidacije, redukcije, niti hidrolize, ali se u drugoj fazi odigrava njegova konjugacija sa glukuronidima ili sulfatima [65], što se smatra reakcijom deaktivacije, imajući u vidu da ni BPA-glukuronid, ni BPA-sulfat ne poseduju estrogenu aktivnost [67]. Eliminira se urinom, 85% u obliku glukuronida, a 15% u obliku sulfata, prilikom čega je poluvreme njegove eliminacije 6 h [66,68]. Može se detektovati u urinu gotovo svih odraslih ljudi i dece, kao i u serumu trudnica, majčinom mleku, folikularnoj i amniotskoj tečnosti, krvi pupčane vrpce i tkivu placente [69]. *In vivo* i *in vitro* eksperimentalnim studijama pokazano je da BPA može da se akumulira i utiče na funkciju mozga, srca, jetre, pankreasa i testisa [70]. Međutim, u slučaju izloženosti niskim dozama, ova supstanca se ne deponuje u tkivima, najverovatnije usled brze glukuronidacije i ekskrecije putem urina, kao i nedostatka enterohepatične cirkulacije u organizmu ljudi [66,68]. Kod ljudi je, takođe, usled dejstva enzima  $\beta$ -glukuronidaza, moguće da BPA-glukuronid ponovo bude preveden u svoj aktivan oblik [71]. U organizmu dece, za razliku od odraslih, proces glukuronidacije i sulfokonjugacije je usporen, zahvaljujući smanjenoj aktivnosti enzima, usled čega je eliminacija BPA putem urina produžena [65]. S druge strane, kod novorođenčadi je sulfatacija u najvećoj meri reakcija zaslužena za metaboličku transformaciju BPA [72].

### 1.3.4. Toksičnost

Bisfenol A deluje na mnogobrojne organe i sisteme organa, poput nervnog i imunskog, a posebno se izdvaja njegovo dejstvo na endokrini sistem. Mehanizmi toksičnosti ove supstance uključuju dejstvo na različite receptore, enzime, indukciju inflamacije i oksidativnog stresa, kao i genotoksične i epigenetske mehanizme (metilacija DNK, modifikacija histona i ekspresije RNK, promenjena dostupnost DNK) [73,74]. Laboratorijskim studijama je utvrđeno da se vezuje za estrogene receptore i oponaša dejstvo estrogena. Iako je otkriveno da ima niži afinitet prema nuklearnim estrogenim receptorima u odnosu na 17- $\beta$  estradiol (E2), njegova estrogena aktivnost jednaka je aktivnosti E2 kada su u pitanju reakcije posredovane nuklearnim estrogenim receptorima. Nadalje, BPA može delovati i kao antiestrogen, blokirajući estrogene odgovor kompeticijom sa endogenim E2 za vezivanje za estrogene receptore [75,76]. BPA takođe može direktno da se veže i za androgene receptore i najverovatnije, tim putem, ispolji antiandrogeno dejstvo blokiranjem dejstva endogenih androgena [77]. BPA inhibira steroidogenezu i smanjuje sekreciju testosterona, čime smanjuje aktivnost GnRH neurona i ekspresiju steroidogenih enzima

[78,79]. U testisima, ova supstanca može da izazove apoptozu, povećavajući ekspresiju kaspaze-7, kaspaze-9 i Bax proteina, ali i da smanji nivo transkripcije DNK metiltransferaze (DNMT) [80]. Takođe, dokazana je sposobnost BPA da se veže za tireoidne receptore, pri čemu može ispoljiti i agonističke i antagonističke efekte na funkciju štitaste žlezde [57,77]. Adipogeno dejstvo BPA može da se poveže sa podstaknutom diferencijacijom masnih matičnih/stromalnih ćelija i promenama u ekspresiji adipogenih gena (DLK, C/EBPa, IFG1, PPARg i LPL) [74]. Inflamacija, oksidativni stres i apoptoza označeni su kao najverovatniji mehanizmi uključeni u nastanak oštećenja jetre i fibroze izazvane BPA [81], dok promene u proteomu i fosfoproteomu izazvane dejstvom BPA dodatno mogu da podstaknu patogenezu poremećaja jetre [82]. BPA može uticati na diferencijaciju Th ćelija što, zajedno sa povišenom sintezom nivoa imunoglobulina promovisanom Th2 ćelijama (IgG1 i IgE), pogoduje razvoju alergije ili astme [83]. Sveukupno, izloženost ovoj supstanci može da se poveže sa mnogobrojnim štetnim efektima po zdravlje ljudi, uključujući efekte na reproduktivni sistem: plodnost, funkcija muškog reproduktivnog sistema, kvalitet sperme, koncentracija polnih hormona, poremećaji endometrijuma, sindrom policističnih jajnika, karcinom dojke, pobačaj, itd; efekte na rast i razvoj: telesna masa pri rođenju, razvoj centralnog nervnog sistema, astma kod dece; metaboličke poremećaje: dijabetes melitus tipa 2, kardiovaskularne bolesti, funkcija jetre i gojaznost; i druge efekte: poremećaji hormona štitaste žlezde, funkcija imunskog sistema, albuminurija [57,84].

### 1.3.5. Regulativa

Imajući u vidu široku izloženost BPA i potvrđene štetne efekte usledile su ograničenja i zabrane korišćenja kako bi se zaštitili život i zdravlje ljudi. Prema Pravilniku o ograničenjima i zabranama proizvodnje, stavljanja u promet i korišćenja hemikalija („Sl. glasnik RS“, br. 90/2013, 25/2015, 2/2016 i 44/2017, 36/2018-53, 9/2020-164), zabranjeno je stavljanje u promet posle 30. juna 2020. godine termičkog papira koji sadrži 0,02% (m/m) ili više BPA. Ograničenje o upotrebi BPA doneseno je Uredbom o plastičnoj masi (EU) br. 10/2011, dok je novom uredbom o BPA (EU) br. 2018/213 smanjen specifičan limit migracije za BPA sa 0,6 mg/kg na 0,05 mg/kg i proširena zabranu upotrebe BPA u proizvodnji polikarbonatnih bočica za hranjenje beba, pri čemu se BPA ne sme koristiti za izradu čaša ili boca od polikarbonatne plasitke koje su, zbog svojih karakteristika otpornosti na prosipanje, namenjeni odojčadima i maloj deci. Takođe, na osnovu člana 27. stav 3. Zakona o hemikalijama („Službeni glasnik RS“, br. 36/09, 88/10, 92/11, 93/12 i 25/15) i člana 17. stav 4. i člana 24. stav 2. Zakona o Vladi („Službeni glasnik RS“, br. 55/05, 71/05, 101/07, 65/08, 16/11, 68/12, 72/12, 7/14 i 44/14), BPA je svrstan na Listu supstanci kandidata za Listu supstanci koje izazivaju zabrinutost („Službeni glasnik RS“, br. 58/2016, 22/2018, 86/2021) usled toksičnosti po reprodukciju i moguće značajne efekte po zdravlje ljudi.

### 1.4. Smeša ftalata i bisfenola A

Ftalati i BPA sveprisutni su u životnoj sredini, prilikom čega je izloženost ljudi ovim supstancama svakodnevna i istovremena zbog čega se sprovode brojna istraživanja na životinjama da se utvrdi ne samo toksičnost ovih endokrinih ometača pojedinačno, već i toksični potencijal njihove kombinovane primene [30,31,34,85]. Studije na eksperimentalnim životinjama pokazale su da pojedinačni ftalati koji imaju sličan mehanizam toksičnosti (DEHP i DBP), ali različite aktivne metabolite (monoetilheksil ftalat (MEHP) naspram monobutil ftalata (MBP)), mogu ispoljiti dozno-aditivne efekte kada se primene u smeši [86]. Slični aditivni efekti zabeleženi su i u slučaju smeše ftalata sa antiandrogenim pesticidima različitih mehanizama toksičnosti [86,87], dok su, u studiji subhronične toksičnosti na pacovima, Zhang i sar. (2013) pokazali da, prilikom kombinovanog tretmana životinja, smeša DBP i BPA dovodi do povećanja ekspresije gena povezanih sa reproduktivnim hormonima, ukazujući na potencijalni sinergistični efekat ovih supstanci [88]. Ovo su potvrdili Christen i sar. (2012) nakon analize ekviefektivnih koncentracija ne samo binarnih smeša različitih ftalata (DBP, BBP i DEP, već i DEP i BPA. Ovi autori su predložili doznu

aditivnost kao odgovarajući koncept za ispitivanje efekata smeše gore pomenutih antiandrogenih supstanci [89]. Štaviše, Manikkam i sar. (2013) su pokazali da smeša DEHP, DBP i BPA primenjena intraperitonealno tokom gestacije može dovesti do oštećenja testisa mužjaka pacova generacije F1 i F3 [42]. Takođe, u eksperimentu na miševima potvrđen je uticaj pojedinačne subkutane doze DEHP na povećanje deponovanja oralno unetog BPA u epididimisu mužjaka [90].

### 1.5. Protektivno dejstvo probiotika

Poznato je da, nakon oralnog unosa, ftalati i BPA prolaze kroz gastrointestinalni trakt i jetru pre nego što dospeju do ciljnih tkiva poput materice, testisa ili fetusa [91,92]. Dodatno, studije su pokazale da polazni ftalati ostaju u gastrointestinalnom traktu i nekoliko sati, gde progresivno postaju dostupni, uglavnom kao monoestri [91]. Stoga su naučnici pretpostavili da bi pronalazak agensa koji bi vezao ili razgradio ftalate i BPA u gastrointestinalnom traktu i time umanjio njihovu apsorpciju mogao biti ključan u zaštiti ljudi od štetnih efekata ovih supstanci [46,93,94]. Kao rezultat, probiotske kulture teže da nađu svoje mesto među ostalim supstancama, kao što su vitamini i antioksidanti, za koje je predloženo da mogu ublažiti toksičnost ftalata i BPA [46,93–95].

Probiotske kulture predstavljaju živi mikrobiotski dodatak ishrani koji blagotvorno deluje na organizam domaćina pospešujući njegov crevni mikrobiotski balans [96]. Među probiotskim kulturama, pogotovo se mlečnokiselinske bakterije (engl. *Lactic acid bacteria*, LAB) mogu dovesti u vezu sa mnogobrojnim efektima korisnim po zdravlje ljudi. Neki od njih uključuju upotrebu u lečenju akutne dijareje povezane sa rotavirusom, ulceroznim kolitisom, infekcijom *Clostridium difficile* i *Helicobacter pylori*. Uočeni su i brojni preventivni efekti probiotika, kao što je prevencija dijareje izazvane antibioticima, kao i poboljšanje varenja laktoze i sindroma iritabilnog creva, dok se korisna upotreba probiotika kod oboljenja jetre i alergije još uvek istražuje [97,98]. Takođe, LAB mogu pozitivno uticati na sniženje krvnog pritiska kod pacijenata sa hipertenzijom, sniženje nivoa glukoze i triacilglicerida u plazmi, kao i oksidativnog stresa [46,99]. Probiotskim ćelijama se pripisuje sposobnost smanjenja nivoa holesterola u krvi pomoću nekoliko predloženih mehanizama. Ovi mehanizmi obuhvataju asimilaciju holesterola u crevima i smanjenje njegove apsorpcije, dekonjugaciju žučnih kiselina pomoću hidrolaze žučnih soli i sposobnost LAB da proizvode ferulinsku kiselinu, koja inhibira jetrenu HMG-CoA-reduktazu i podstiče izlučivanje kiselog sterola [100,101]. Takođe, postoje dokazi koji ukazuju na to da probiotski kvasci poput *Saccharomices boulardii* mogu pozitivno uticati na funkciju jetre i usporiti razvoj fibroze, steatoze, i ublažiti oštećenje izazvano infekcijom [102].

Nekoliko studija demonstriralo je sposobnost LAB, uključujući *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus rhamnosus*, da povećaju procenat izlučivanja različitih toksičnih supstanci iz organizma eksperimentalnih životinja i na taj način ublaže intenzitet i prirodu štetnih efekata. Neke LAB mogu efikasno da vežu i uklone toksične metale poput kadmijuma [103–105], olova [106] i mangana [107], kao i druge toksične supstance, poput benzo[a]pirena [108], ftalata [46] i BPA [94,95], smanjujujući njihovu apsorpciju i povećavajući eliminaciju iz gastrointestinalnog trakta. Dokazana je i sposobnost probiotskih kvasaca, kao što su *Saccharomices boulardii* i *Saccharomices cerevisiae*, da površinski vežu različite toksične supstance, naročito mikotoksine [109–111].

Pokazano je da na adsorpciju toksičnih supstanci u gastrointestinalnom traktu uglavnom utiču sastojci ćelijskog zida LAB [112]. Neke od ovih struktura, uključuju egzopolisaharide, teihoičnu kiselinu, proteine i peptidoglikane [93,103,113]. Takođe, poznato je i da probiotski kvasci poseduju sposobnost adsorbovanja različitih molekula na površini ćelijskog zida, zahvaljujući njegovoj strukturi koja sadrži manan-oligosaharide i glukane [109]. S obzirom na to da je ćelijski zid probiotskih bakterija bogat aminokiselinama koje sadrže sulfhidrilne (-SH) grupe, ovo svojstvo može doprineti njihovom potencijalu za inaktivaciju toksičnih metala površinskim vezivanjem [114]. U slučaju drugih toksičnih supstanci, poput aflatoksina, studije su potvrdile da je hidrofobnost ćelijskog zida odgovorna za adsorptivna svojstva probiotika [112]. U skladu sa time, Lili i sar. (2017) izveli su zaključak da je hidrofobnost u velikoj meri uključena u proces vezivanja

DBP za probiotske bakterije [93]. Takođe, Zhu i sar. (2018) pokazali su da, za razliku od nekih toksičnih metala poput kadmijuma, ftalati nisu toksični za LAB, ukazavši na to da nije bilo značajne razlike između broja ovih bakterija pre i posle interakcije sa metabolitima ftalata tokom 6 [46]. Ova grupa naučnika takođe je nagovestila da stepen vezivanja LAB za ftalate varira u zavisnosti od vrste soja (najviši stepen primećen je kod *Lactobacillus plantarum*), kao i temperature i koncentracije bakterija [46]. Štaviše, Zhu i sar. (2017) potvrdili su sposobnost šest održivih LAB sojeva da uklone BPA (24,48% - 50,80%) iz vodenog rastvora. U ovom slučaju, vezivanje je zavisilo od početne koncentracije bakterija, početne koncentracije BPA i temperature na kojoj je vršena inkubacija [94].

I pored više različitih ispitivanja koja ukazuju da probiotske vrste ispoljavaju sposobnost da umanje apsorpciju i ispoljavanje štetnih efekata, studije o sposobnosti probiotika da ublaže efekte smeše toksičnih supstanci su veoma ograničene.

## 2. Hipoteze i ciljevi istraživanja

S obzirom na to da je broj studija toksičnosti smeše dva najznačajnija ftalata u pogledu toksičnosti i izloženosti (DEHP i DBP) i BPA gotovo zanemarljiv, a da su ljudi svakodnevno istovremeno izloženi ovim supstancama, postoji potreba da se istraži toksični potencijal njihove smeše i uporedi sa toksičnošću pojedinačnih supstanci. Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja može se pretpostaviti da će efekti smeše ftalata i BPA biti izraženiji u odnosu na efekte pojedinačnih supstanci, čak i u onim slučajevima kada primenjene samostalno u istoj dozi ne bi ispoljile toksičnost. Upotreba dva eksperimentalna modela (pacov i zebrica) omogućava šire sagledavanje toksičnih efekata smeše, dok *in silico* analiza toksikogenomičkih podataka može dodatno razjasniti njene mehanizme toksičnosti, dovodeći ih u vezu sa razvojem različitih bolesti, pre svega poremećaje na nivou jetre i reproduktivnih organa, a zatim i drugih, poput, dijabetesa, astme i gojaznosti.

Takođe, iako postoje istraživanja u kojima je ispitano protektivno dejstvo različitih probiotskih vrsta na toksičnost pojedinačnih ftalata i BPA, studija u kojoj je istražena sposobnost probiotika da deluje protektivno protiv štetnih efekata smeše ftalata i BPA, tj. smeše DEHP/DBP/BPA i dalje nije sprovedena. Osim toga, na osnovu dosadašnjih rezultata istraživanja, pokazano je da je višekomponentni probiotik, koji u svom sastavu sadrži smešu korisnih mikroorganizama, sposoban da veže toksične supstance efikasnije od onih koji sadrže samo jedan soj probiotskih bakterija ili kvasaca, kao i da bi upotreba kombinacije mikrobiotskih sojeva mogla biti korisna kada se radi o vezivanju smeše toksičnih supstanci [106]. Iz ovih razloga, može se pretpostaviti da bi upotreba višekomponentnog probiotika bila efikasna u cilju smanjenja izloženosti, a time i umanjenja toksičnosti ispitivane smeše DEHP, DBP i BPA.

Samim tim, cilj istraživanja ove doktorske disertacije je bio da se ispita toksičnost smeše DEHP, DBP i BPA u odnosu na toksičnost pojedinačnih supstanci na dva eksperimentalna modela, pacovima i zebricama, kao i da se dodatno razjasni mehanizam toksičnosti ispitivane smeše primenom *in silico* analize toksikogenomičkih podataka. Takođe, doktorska disertacija imala je za cilj da utvrdi potencijalnu efikasnost višekomponentnog probiotika u umanjenju štetnih efekata ispitivane smeše endokrinih ometača, DEHP, DBP i BPA kod pacova i zebrica.

U svrhu realizacije postavljenih ciljeva sprovedena su tri dela istraživanja i u okviru svakog od njih sledeće:

I deo istraživanja

1. Studija na modelu *Wistar* pacova (*Ratus norvegicus*)

a) Ispitan je uticaj subakutne oralne ekspozicije DEHP, DBP i BPA i njihove smeše na:

- prirast telesne mase, unos hrane i vode
- hematološke i biohemijske parametre
- nivo hormona
- očuvanost strukture tkiva
- parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite
- distribuciju bioelemenata

b) Ispitano je da li postoji protektivno dejstvo višekomponentnog probiotika na toksičnost smeše DEHP, DBP i BPA praćenjem hematoloških i biohemijskih parametara, distribucije bioelemenata i parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i očuvanosti strukture tkiva pacova.

## 2. Studija na modelu zebrića (*Danio rerio*)

a) Upoređeni su toksični efekti DEHP, DBP i BPA sa toksičnim efektima njihove smeše uzimajući u obzir različite doze dva praćena ftalata i BPA nakon petodnevne izloženosti embriona zebrića koji su analizirani na:

- preživljavanje
- toksičnost na rast i razvoj
- ototoksičnost
- kardiotoksičnost
- hepatotoksičnost (nekroza, hepatomegalija, poremećaj aktivnosti enzima);

b) Ispitana je dozna zavisnost između doza i odgovora DEHP, DBP, BPA i njihove smeše;

c) Ispitano je da li postoji protektivno dejstvo probiotika na preživljavanje, toksičnost na rast i razvoj, ototoksičnost, kardiotoksičnost i hepatotoksičnost kod embriona zebrića tretiranih smešom DEHP, DBP i BPA.

## II deo istraživanja – *in silico* analiza toksikogenomičkih podataka

1. Korišćenjem javno dostupnih baza podataka i softvera ispitana je povezanost smeše DEHP, DBP i BPA sa razvojem različitih bolesti posredstvom interakcija sa genima;
2. Konstruisana je mreža interakcija između dobijenih setova gena;
3. Na osnovu izdvojenih setova gena istraženi su najznačajniji molekularni putevi, biološki procesi i molekularne funkcije uključene u mehanizam toksičnosti ispitivane smeše toksičnih supstanci.

III deo istraživanja – *in vitro* ispitivanje smanjenja koncentracije DEHP, DBP i BPA pod dejstvom probiotika – ispitana je i upoređena sposobnost jednokomponentnog i višekomponentnog probiotika da umanje koncentraciju DEHP, DBP i BPA i time smanje izloženost i toksičnost ispitivane smeše.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Hemikalije

Korišćeni su bis(2-etilheksil) ftalat ( $\geq 99.5\%$  DEHP, Sigma-Aldrich-Chemie, Štajnhajm, Nemačka), dibutil ftalat (98% DBP, Sigma-Aldrich-Chemie, Štajnhajm, Nemačka) i bisfenol A (97% BPA, Sigma-Aldrich-Chemie, Štajnhajm, Nemačka).

#### 3.2. Probiotik

U *in vivo* studiji (model pacova) primenjen je komercijalno dostupan višekomponentni probiotik Enterobiotik<sup>®</sup> FORTE (Abela Pharm, Beograd, Srbija), pakovan u kapsule. Kapsule su deklarirane da sadrže  $\geq 8,5 \times 10^9$  liofilizovanih ćelija mikroorganizama ( $2,5 \times 10^9$  *Saccharomyces boulardii*,  $2 \times 10^9$  *Lactobacillus rhamnosus*,  $2 \times 10^9$  *Lactobacillus plantarum* LP 6595 i  $2 \times 10^9$  *Lactobacillus plantarum* HEAL9). Takođe, u *in vivo* studiji (model zebrica) i *in vitro* ispitivanju smanjenja koncentracije DEHP, DBP i BPA primenjen je i jednokomponentan probiotik, Bulardi<sup>®</sup> (Abela Pharm, Beograd, Srbija), preparat čije kapsule su deklarirane da sadrže približno  $5 \times 10^9$  CFU *Saccharomices boulardii*.

#### 3.3. In vivo ispitivanje na modelu pacova

##### 3.3.1. Eksperimentalne životinje

Korišćeni su mužjaci Wistar pacova (*Rattus norvegicus*) telesne mase 150–200 g, uzgajani na farmi za uzgoj eksperimentalnih životinja Vojnomedicinske akademije, Beograd, Srbija. Životinje su čuvane u plastičnim kavezima zatvorenim žičanom rešetkom, u klimatski kontrolisanim uslovima (temperatura 20-24°C, relativna vlažnost vazduha 35-60%, konstantan svetlost/mrak ciklus- 12h/12h). Hrana (smeša za ishranu laboratorijskih životinja, Veterinarski zavod „Subotica“) i voda su im bili na raspolaganju *ad libitum* u toku perioda trajanja celog eksperimenta. Sve eksperimentalne procedure sprovedene u okviru doktorske disertacije odobrene su od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i Ministarstava poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede – Uprava za Veterinu (broj etičke dozvole: 323-07-11822/2018-05). Sa životinjama se postupalo u skladu sa Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

##### 3.3.2. Eksperimentalni protokol

Pacovi su nasumično podeljeni u sedam grupa ( $n = 6$ ), kontrolnu i šest tretiranih. Kontrolna grupa primala je kukuruzno ulje, dok su tretirane grupe dobijale pojedinačne supstance, smešu ispitivanih supstancu bez i u kombinaciji sa probiotikom, ili sâm probiotik u naznačenim dozama: (i) DEHP (50 mg/kg t.m./dan), (ii) DBP (50 mg/kg t.m./dan), (iii) BPA (25 mg/kg t.m./dan), (iv) smeša ispitivanih supstanci (MIX; 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA), (v) smeša ispitivanih supstanci u kombinaciji sa probiotikom (MIX + P; 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA +  $8,78 \times 10^8$  CFU/kg/dan probiotika čiji sastav čine: *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* LP 6595 i *Lactobacillus plantarum* HEAL9) i (vi) samo probiotik (P).

U istraživanju u okviru ove doktorske disertacije, ukupna najviša doza koja ne izaziva štetan efekat (engl. *No-observed adverse effects level*, NOAEL) (50 mg/kg t.m./dan) odabrana je kao doza za DBP [115], dok je NOAEL za efekte na telesnu masu (25 mg/kg t.m./dan) odabran kao doza za BPA [116]. Odabir doze DEHP (50 mg/kg t.m./dan) izvršen je na osnovu literaturnih podataka i

uočenih efekata na metabolizam lipida i homeostazu glukoze na modelu pacova [117]. Iako je ova doza 10 puta viša od *per os* NOAEL vrednosti (5 mg/kg t.m./dan) za efekte na rast i razvoj, odabrana doza DEHP je 15 puta niža od doze koja bi mogla da dovede do toksičnih efekata po reproduktivni sistem bez pojave simptoma sistemske toksičnosti (engl. *Lowest observed adverse effect level*, LOAEL) (750 mg/kg) [118]. Doza probiotika koja je primenjena u ovom istraživanju dobijena je iz doze ekvivalentne kod ljudi koristeći formulu Američke agencije za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA): uzimajući 60 kg kao prosečnu telesnu masu, doza odabranog probiotika ekvivalentna onoj koja bi odgovarala dozi kod ljudi iznosi:  $8,5 \times 10^9$  CFU / 60 kg /dan  $\times 6,2 = 8,78 \times 10^8$  CFU/kg/dan; koeficijent 6,2 je iskorišćen da bi se izvršila ekstrapolacija sa čoveka na pacova [119].

Ftalati i BPA rastvoreni u kukuruznom ulju i probiotik rastvoren u vodi svakodnevno tokom 28 dana aplikovani su pacovima oralnom sondom u jutarnjim časovima. U toku trajanja eksperimenta telesna masa, kao i unos hrane i vode, beleženi su svakodnevno.

### 3.3.3. Prirast telesne mase i relativna masa organa

Na kraju eksperimenta, zabeležene su telesne mase i izračunat je prirast mase za sve životinje. Prirast telesne mase (engl. *Body weight gain*, BWG) izračunat je pomoću sledeće formule:

$$BWG = \frac{(mf - mi)}{mi}$$

U ovoj jednačini mf označava finalnu, a mi inicijalnu telesnu masu. Relativna masa organa izračunata je tako što je masa organa podeljena sa telesnom masom životinja na kraju eksperimenta i predstavlja neimenovani broj.

### 3.3.4. Uzorkovanje krvi i organa

Nakon 28 dana od početka aplikovanja, izvršeno je humano žrtvovanje životinja i uzorci krvi su sakupljeni kardijačnom punkcijom. Za biohemijske i hormonalne parametre, krv je sakupljena u vakutejnere za izdvajanje seruma. Serum je izdvojen centrifugiranjem 30 min na  $3000 \times g$  i zamrznut ( $-20$  °C) do momenta izvođenja analiza. Jedan deo krvi odvojen je u heparinske vakutejnere za određivanje hematoloških parametara (puna krv) i parametara oksidativnog stresa (plazma). Izolovani su sledeći organi: jetra, bubrezi, mozak, pluća, srce, testisi, slezina, timus i pankreas. Deo organa fiksiran je u 10% neutralnom puferisanom formaldehidu za patohistološku analizu, deo je zamrznut u tečnom azotu i čuvan na  $-80$  °C za analizu parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite, dok je deo zamrznut na  $-20$  °C za analizu bioelemedenata.

### 3.3.5. Određivanje hematoloških parametara

Za određivanje hematoloških parametara korišćen je MYTHIC 22 analizator (Orphee Medical, Ženeva, Švajcarska), pri čemu su svi testovi izvedeni komercijalnim reagensima. Analizirani su sledeći parametri: broj leukocita sa leukocitarnom formulom (neutrofili, eozinofili, limfociti, bazofili i monociti), broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit, srednji volumen eritrocita (engl. *Mean corpuscular volumen*, MCV), srednji sadržaj hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean corpuscular hemoglobin*, MCH), srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean corpuscular hemoglobin concentration*, MCHC) i broj trombocita.

### 3.3.6. Određivanje biohemijskih parametara

Svi biohemijski testovi izvedeni su pomoću komercijalnih reagenasa na Cobas C311 analizatoru (Diagnostics Roche, Bazel, Švajcarska). U uzorcima seruma analizirani su sledeći biohemijski parametri: triacilgliceridi, holesterol, lipoprotein visoke gustine (engl. *High density lipoprotein*, HDL), lipoprotein niske gustine (engl. *Low density lipoprotein*, LDL), kreatinin,



mokraćna kiselina, ukupni proteini u serumu, albumin, direktni bilirubin, ukupni bilirubin, gvožđe u serumu, kalcijum ( $\text{Ca}^{2+}$ ), neorganski fosfor ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), magnezijum ( $\text{Mg}^{2+}$ ) i hloridi ( $\text{Cl}^-$ ). Takođe, izmerena je aktivnost enzima aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) i alkalne fosfataze (ALP).

### 3.3.7. Određivanje nivoa hormona

Uzorci seruma analizirani su pomoću komercijalnih reagenasa elektro-hemiluminiscentnim imunosejmem (ECLIA) na Cobas E411 analizatoru (Diagnostics Roche, Bazel, Švajcarska). Izmerene su koncentracije sledećih hormona: testosteron, trijodtironin (T3), tiroksin (T4).

### 3.3.8. Patohistološka analiza tkiva

Tkivo organa pacova (jetra, testisi, bubreg, slezina i mozak) prethodno fiksirano formalinom dehidrirano je i ugrađeno u parafinski vosak. Od parafinskih blokova pomoću mikrotoma isečeni su preseki debljine 5 mm, pričvršćeni na staklene pločice i deparafinizovani pre bojenja hematoksilinom i eozinom (H&E). Patohistološka analiza vršena je pod svetlosnim mikroskopom (Olimpus BKS43, Tokio, Japan).

### 3.3.9. Određivanje parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite

#### 3.3.9.1. Izdvajanje plazme i priprema homogenata tkiva

Za određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, iz heparinizirane krvi izdvojena je plazma centrifugiranjem 30 min na 3000x g i zamrznuta ( $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ) do momenta izvođenja analiza. Uzorci tkiva nepotpuno su odmrznuti na ledu ( $0 - 4\text{ }^\circ\text{C}$ ). Nakon toga, homogenizacija 0,2 - 0,4 g uzorka vršena je u hladnom fosfatnom puferu (0,1 mol/L, pH 7,4, koji sadrži 1,15% KCl) u odnosu 1:9 (v/v) pomoću homogenizatora T10 basic ULTRA-TURRAX (IKA, Nemačka). Nastali homogenati centrifugirani su na  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  na 800x g tokom 10 minuta, a zatim na 9500x g tokom 20 minuta. Na ovaj način, dobijen je postmitohondrijalni supernatant, koji je dalje odvajan u ependorf tube i korišćen za određivanje biomarkera oksidativnog stresa.

#### 3.3.9.2. Merenje parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite

U plazmi i homogenatima tkiva određeni su sledeći parametri oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite: totalni antioksidativni status (TAS), totalni oksidativni status (TOS), superoksidni anjon radikal ( $\text{O}_2^-$ ), aktivnost enzima superoksid dismutase (SOD), uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *Advanced oxidation protein products*, AOPP), malondialdehid (MDA) i ukupne sulfhidrilne grupe (SH). Svi korišćeni reagensi analitičkog stepena čistoće bili su nabavljeni iz komercijalnih izvora.  $\text{O}_2^-$ , TAS, TOS, SOD, i AOPP mereni su pomoću ILAB 300 Plus analizatora (Instrumentation Laboratory, Italija), dok je spektrofotometrijsko merenje MDA i SH grupa, kao i proteina u uzorcima tkiva sprovedeno pomoću SPECTROstar Nano UV/VIS spektrometra (BMG Labtech, Ortenberg, Nemačka). Indeks oksidativnog stresa (OSI) izračunat je kao količnik biomarkera TOS i TAS i predstavlja neimenovan broj. Detaljan opis metoda primenjenih za merenje odabranih parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite u plazmi i tkivima pacova nakon izlaganja DEHP, DBP, BPA i njihovoj mešavini u toku 28 dana prikazane su u Tabeli 1.

Tabela 1. Metode određivanja parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite u plazmi i tkivima pacova nakon izlaganja DEHP, DBP, BPA i njihovoj smeši, kao i smeši sa dodatkom probiotika, u toku 28 dana

Parametar	Princip metode	Analizator	Jedinice	Referenca
Aktivnost asuperoksida dizmutaze (SOD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sposobnost SOD da spreči autooksidaciju adrenalina u alkalnoj sredini, pri pH 10,2</li> </ul>	ILAB 300 plus (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy)	Procenat inhibicije autooksidacije adrenalina (IU/g proteina)	[120]
Superoksid anjon ( $O_2^-$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Redukcija žuto obojenog nitroplavog tetrazolijuma (NBT) u plavi formazan</li> </ul>	ILAB 300 plus (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy)	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ proteina	[121]
Ukupni oksidativni status (TOS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sposobnost oksidansa da konvertuje gvožđe-odanisidin kompleks u jon gvožđa</li> <li>U kiseljoj sredini, jon gvožđa formira obojeni kompleks sa ksilenol-narandžastim.</li> <li>Kalibracija sa vodonik peroksidom (<math>H_2O_2</math>)</li> </ul>	ILAB 300 plus (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy)	$\mu\text{mol}$ ekvivalenta $H_2O_2$ po g proteina	[122]
Ukupni antioksidativni stres (TAS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oksidacija 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfonata) (ABTS) u obojeni ABTS+ radikal katjona</li> <li>Promena boje izazvana antioksidansima prisutnim u uzorku merena je na 660 nm</li> </ul>	ILAB 300 plus (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy)	$\mu\text{mol}$ of Troloks ekvivalenta po g proteina	[123]
Ukupni nivo tiolnih grupa (SH grupe)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Merenje apsorbcije žutog produkta (dijanona 5-tio-2-nitrobenzoeve kiseline) nastalog u reakciji sa reagensom 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoevom kiselinom (DTNB) (pH 9,0)</li> </ul>	SPECTROstar Nano UV/VIS spektrofotometar (BMG Labtech, Ortenberg, Germany)	mmol/g proteina	[124]
Malondialdehid (MDA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Maksimum apsorpcije MDA i drugih supstanci koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS)</li> <li>Apsorbancija se određuje nakon zagrevanja uzoraka i reagenasa (<math>100\text{ }^\circ\text{C}</math> 5 min), hlađenja ledom 10 minuta i centrifugiranja (<math>10000\times</math> g na <math>+4\text{ }^\circ\text{C}</math> 10 minuta)</li> </ul>	SPECTROstar Nano UV/VIS spektrofotometar (BMG Labtech, Ortenberg, Germany)	$\mu\text{mol}/\text{g}$ proteina	[125]
Uznappedovali produkti oksidacije proteina (AOPP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reagensi: glacijalna sirćetna kiselina, 1,16 mol/L rastvor kalijum-jodida i fosfatni pufer (pH 7,4)</li> <li>Apsorbancija merena na 340 nm</li> </ul>	ILAB 300 plus (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy)	$\mu\text{mol}$ hloramin-T ekvivalenta po g proteina	[126]
Proteini	<ul style="list-style-type: none"> <li>Maksimalna apsorbcija se pomera sa 465 na 595 nm nakon što se reagens Coomassie Brilliant Blue G-250 veže za proteinski molekul u uzorku.</li> <li>Standard: goveđi serum albumin</li> </ul>	SPECTROstar Nano UV/VIS spektrofotometar (BMG Labtech, Ortenberg, Germany)	g	[127]

### 3.3.10. Određivanje bioelemenata

#### 3.3.10.1. Reagensi i standardi

Azotna kiselina ( $HNO_3$ ) (69,0% do 70,0% p.a, Baker Analyzed™ A.C.S. Reagent, J.T.Baker™, Phillipsburg, New Jersey, SAD) i  $H_2O_2$  (30% p.a, Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, SAD) nabavljeni su iz komercijalnih izvora, kao i osnovni multielementni standardni rastvor za atomsku apsorpcionu spektrometriju koncentracije 1 g/L u 2%  $HNO_3$  (Merck, Darmstadt, Nemačka). Od osnovnih standardnih rastvora metala do radnih standardnih rastvora za kalibraciju

pravljena su razblaženja sa 5% HNO<sub>3</sub>. Korišćen je modifikator matriksa NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.5%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, SAD) i Triton X (10%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, SAD).

### 3.3.10.2. Priprema uzoraka tkiva

Uzorci od oko 1 g tkiva (jetra, bubrezi, timus, pluća i srce) odmeravani su na analitičkoj vagi (Radwag AS 220.R2, Miami, Florida, SAD) i preneti u teflonsku posudu aparata za mikrotalasnu digestiju (Ethos One, Milestone, Sorisole, Italija). Nakon toga, dodavana je smeša oksidacionih sredstava za digestiju: 7 mL koncentrovane HNO<sub>3</sub> i 1 mL koncentrovanog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uslovi za mineralizaciju ispitivanog uzorka su postignuti podešavanjem sledećih parametara programa digestije: postizanje temperature od 200 °C tokom 15 min. Zatim, održavanje postignute temperature 15 min i, na kraju, ventilacija u trajanju od 15 minuta. Uzorci pripremljeni na prethodno opisan način kvantitativno su prenošeni u normalne sudove (25 mL) i razblaživani korišćenjem dejonizovane vode (Elga Purelab Prima, Bucks, Velika Britanija).

### 3.3.10.3. Merenje koncentracije bioelemenata

Koncentracija Cu, Zn, i Fe određivana je iz rastvora mineralizovanih uzoraka tkiva metodom plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS) na instrumentu GTA 120, 200 series AA (Agilent Technologies, Santa Klara, Kalifornija, SAD). Kvantifikacija Cu, Zn, Fe je izvršena metodom eksternog standarda, dok je kalibracija izvršena korišćenjem multielementnog standardnog rastvora 1 g/L u razblaženoj azotnoj kiselini (Merck, Darmstadt, Nemačka). Tačnost AAS analiza je potvrđena standardnim referentnim materijalom 1577c - goveđa jetra (LGS Standard, Velika Britanija). Dobijene *recovery* vrednosti bile su u rasponu od 88,4% do 106,2%.

## 3.4. *In vivo* ispitivanje na modelu zebrice

### 3.4.1. Zebrice

U ispitivanju na modelu zebrica (*Danio rerio*) korišćeni su embrioni divljeg AB soja zebrica (engl. *Wild type*), kao i embrioni transgene linije Tg(fabp10:EGFP) kod koje ćelije jetre ekspimiraju zeleni fluorescentni protein (engl. *Enhanced green fluorescent protein*, EGFP).

Odrasle zebrice gajene su u uzgajalištu zebrica Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, pod strogo kontrolisanim uslovima (svetlosni režim 14 h dan / 10 h noć, i temperatura od 28 ± 1°C). Ribice su hranjene 3 puta dnevno različitom vrstom hrane – proteinskom SDS300, lisnatom (TetraMinFlakes) i živom hranom (*Artemia salina*).

### 3.4.2. Eksperimentalni protokol

Ispitivanje na modelu zebrice vršeno je u skladu sa smernicama Evropske direktive (EU2010/86) i Pravilnika za rad sa eksperimentalnim životinjama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Dan neposredno pred mrest, odrasle zebrice u odnosu mužjaka i ženki 3:2 su odvojene u specijalizovane mrestilice. Mrest je indukovano sledećeg dana paljenjem svetla u ranim jutarnjim satima. Sakupljena jaja su isprana E3 vodom za uzgoj embriona, kako bi se uklonile sve potencijalne nečistoće koje bi mogli uticati na dalji razvoj embriona. Nakon toga, vršena je selekcija oplodjenih od neoplodjenih jaja pod svetlosnim mikroskopom (Motic SMZ140 Series, Kina). Oplodjena jaja (embrioni) su gajena u E3 vodi u Petrijevim šoljama i inkubirana u inkubatoru (Sanyo MCO-20AIC, Japan) na temperaturi od 27,5 ± 0,5°C do početka tretmana i tokom tretmana. Medijum za gajenje embriona - E3 vodu čine 5 mM NaCl (ACROS Organics<sup>TM</sup>, SAD), 0,17 mM KCl (Merck, Nemačka), 0,33 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Merck, Nemačka) i 0,33 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (ACROS Organics<sup>TM</sup>, SAD).

Eksperimenti su vršeni u mikrotitarskim pločama sa 24 udubljenja (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Priprema embriona pre početka eksperimenata podrazumevala je postavljanje po 10

embriona u svaki bunarić mikrotitarske ploče, potom uklanjanje viška vode iz svakog bunarića i dodavanje po 1 mL E3 vode, čime je obezbeđeno da svi embrioni budu izloženi istim početnim eksperimentalnim uslovima. Rastvori ispitivanih supstanci napravljeni su u DMSO. Embrioni gajeni u E3 vodi u prisustvu 0,25% DMSO (maksimalna dovoljena koncentracija) korišćeni su kao kontrola. Ispitivanje toksičnosti je vršeno u različitim koncentracijama: 0,5, 1, 2, 5, 10 i 20 µg/mL, a toksičnost smeše u odnosu koji je prikazan u Tabeli 2. Za deo ispitivanja sa probiotikom primenjena su oba probiotska preparata, višekomponentni i jednokomponentni probiotik koji su prethodno testirani u opsegu 0-25 µg/mL radi odabira koncentracije za ispitivanje potencijala za umanjeње štetnih efekata smeše MIX (DEHP/DBP/BPA) u najvišoj testiranoj koncentraciji. Za testiranje je korišćeno 30 embriona po dozi, odnosno 3 bunarića sa po 10 embriona po bunariću. Eksperimenti su ponovljeni dva puta.

Tabela 2. Koncentracije bis(2-etilheksil) ftalata (DEHP), dibutil ftalata (DBP) i bisfenola A (BPA), primenjene u smeši

MIX (DEHP+DBP+BPA)	Koncentracija (µg/mL)				
	1+1+0,5	2+2+1	5+5+2,5	10+10+5	20+20+10

### 3.4.3. Ispitivanje akutne toksičnosti

Akutna toksičnost ispitivana je na embrionima zebriće, po protokolu koji je uspostavljen u laboratoriji Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, a koji se zasniva se na primeni OECD test metode (236) – engl. *Fish Embryo Acute Toxicity Assay* (FET test) [128]. Test je sproveden na embrionima starim 6 h posle oplodjenja (hpf – hours post fertilization) u trajanju od 114 h, odnosno do 120 hpf. Preživljavanje, razvoj i pojava teratogenih malformacija kod tretiranih embriona praćeni su na svaka 24 h, u periodu do petog dana razvoja embriona (120 hpf), a uginuli embrioni su uklanjani svakodnevno u cilju otklanjanja mogućeg negativnog uticaja na razvoj živih embriona. Pri evaluaciji toksičnosti prikazani su letalni i efekti na rast i razvoj (Tabela 3) [128].

Tabela 3. Praćeni letalni i efekti na rast i razvoj na embrionima zebriće tokom 120 h časova posle oplodjenja (hpf)

Kategorija	Razvojni proces	Vreme (hpf)				
		24	48	72	96	120
<b>Letalni efekat</b>	Koagulacija jajeta (embriona) <sup>1</sup>	•	•	•	•	•
	Odsustvo formiranja somita	•	•	•	•	•
	Odvojenost repa	•	•	•	•	•
	Odsustvo srćanih kontrakcija	•	•	•	•	•
<b>Efekat na rast i razvoj</b>	Malformacija glave	•	•	•	•	•
	Malformacija oćiju <sup>2</sup>	•	•	•	•	•
	Malformacija otolita/sakula <sup>3</sup>	•	•	•	•	•
	Malformacija notohorde	•	•	•	•	•
	Skolioza	•	•	•	•	•
	Malformacija repa <sup>4</sup>		•	•	•	•
<b>Efekat na rast i razvoj</b>	Edem perikardijalne duplje	•	•	•	•	•
	Promena frekvencije rada srca		•	•	•	•
	Promena u cirkulaciji krvi		•	•	•	•
	Edem ųumanćane kese	•	•	•	•	•
	Deformacija ųumanćane kese	•	•	•	•	•
	Obojenost (nekroza) jetre			•	•	•
	Promene u velićini/duųini tela <sup>5</sup>			•	•	•

<sup>1</sup> Zastoj u razvoju embriona (organogenezi);

<sup>2</sup> Promene u veličini i obliku oka;

<sup>3</sup> Odsustvo otolita ili prisustvo više od dva otolita u sakulusu; redukcija ili uveličanje otolita i/ili sakulusa;

<sup>4</sup> Promene u obliku i položaju repa;

<sup>5</sup> Zastoj u razvoju embriona i povećanju njegove veličine (praćeno pre izleganja embriona, 24 hpf i 48 hpf), odnosno dužine tela (praćeno odmah po izleganju i 72 hpf).

#### 3.4.4. Ispitivanje hepatotoksičnosti

Potencijal DEHP, DBP i BPA da indukuju štetna dejstva na jetri praćen je izlaganjem embriona transgenih Tg(fabp10:EGFP) zebrića ispitivanim koncentracijama DEHP, DBP, BPA i njihovoj smeši, kao i smeši sa probiotikom u periodu od 72 hpf (kada je jetra formirana i počela sa metaboličkim transformacijama) do 120 hpf. Nakon 48 h tretmana praćeni su sledeći parametri: (i) fluorescencija jetre i veličina, (ii) nekroza jetre, (iii) resorpcija žumanceta, (iv) indeks jetre (engl. *Liver area index*, LA), kao prediktivni parametri hepatotoksičnosti opisani u literaturi [19,129].

#### 3.4.5. Benčmark modelovanje doza-odgovor

Koncept Benčmark doze (engl. *Benchmark dose*, BMD) je metoda koja se koristi za identifikaciju potencijalne veze između doze ispitivane supstance i intenziteta efekta/odgovora. Ovaj pristup se smatra naprednijim u poređenju sa njegovom alternativom, NOAEL pristupom [130]. Dok NOAEL pristup kao krajnji rezultat daje najvišu testiranu dozu koja ne izaziva toksične efekte u određenom eksperimentu, BMD je statistički izračunata koncentracija koja predviđa varijacije u intenzitetu toksičnog odgovora [131].

Za BMD analizu korišćen je *PROASTweb* 70.1 softver (<https://proastweb.rivm.nl/>) kreiran od strane Holandskog nacionalnog instituta za javno zdravlje i životnu sredinu (RIVM). BMD analiza sprovedena je u skladu sa specifikacijama softvera i preporukama Naučnog komiteta EFSA [130]. Koncentracije ftalata/BPA i LA indeks analizirani su kao kontinuirani podaci. Na osnovu prethodno izračunate statistički značajne promene u efektu, tj. referentnog odgovora (BMR), BMD pristup određuje dozu koja će rezultirati povećanom incidencom odgovora. Referentna doza definiše dozni interval koji odgovara određenom BMR, koji najčešće iznosi 5% ili 10%. Dok BMDL označava donju, BMDU označava gornju granicu pouzdanosti za izabrani BMR [130]. Preporučeno je da se BMD interval (BMDI), a ne pojedinačni rezultati, prikaže kao krajnji rezultat svake BMD analize [132]. U postupku modelovanja u okviru ove doktorske disertacije, BMR je podešen na 5%, a broj iteracija unutar analize iznosio je 200 (prema preporuci softvera) [130]. Prilikom BMD analize svi dostupni matematički modeli su uzeti u obzir, kako je preporučeno od strane Naučnog komiteta EFSA, imajući u vidu nepouzdanost modela i podataka [130,133], a BMDI je predstavljen kao krajnji rezultat.

### 3.5. *In silico* toksikogenomička analiza podataka

*In silico* analiza izvršena je pomoću sledećih javno dostupnih baza podataka, softvera i alata:

1. Komparativna toksikogenomička baza podataka (engl. *Comparative Toxicogenomics Database*, CTD; <http://ctdbase.org>) je jedinstveni, javno dostupan izvor podataka koji povezuje hemikalije i njihove interakcije sa genima sa uticajem na razvoj bolesti. Ova baza podataka omogućava konstruisanje mreže puteva štetnih ishoda i pruža mogućnost detaljne analize mehanizama toksičnosti, identifikacije biomarkera i ispitivanja istovremenog uticaja dve ili više hemikalija na gene i proteine, što predstavlja ogroman značaj u proceni toksičnosti smeša i polaznu osnovu za dalja laboratorijska ispitivanja [134,135]. Unutar baze podataka nalazi se pet korisnih alata za pretraživanje/izdvajanje podataka unutar toksikogenomičke analize. U pitanju su *Batch Query*, *Set Analyzer*, *MyGeneVenn*, *MyVenn* i *VennViewer*. *Batch Query* služi za pretragu podataka povezanih sa unetim hemikalijama, bolestima, genima, pojmovima ontologije gena ili referenci. *Set*

*Analyzer* analizira unete setove gena/hemikalija, prilikom čega generiše metaboličke puteve, bolesti i pojmove ontologije gena u kojima oni učestvuju. *MyGeneVenn* služi za upoređivanje unete liste gena sa genomom koji se može dovesti u vezu sa najviše dve hemikalije/bolesti. *MyVenn* i *VennViewer* alati kreiraju Venov dijagram, pri čemu *MyVenn* služi za istraživanje povezanosti između unetih hemikalija/bolesti/gena/ontologije gena/metaboličkih puteva, a *VennViewer* upoređuje skupove podataka o ispitanim hemikalijama/genima/bolestima/fenotipovima na osnovu najviše tri unete hemikalije, gena ili bolesti [136]. CTD se stalno ažurira i može se koristiti za generisanje hipoteza o mehanizmima koji leže u osnovi etiologije bolesti integrišući podatke sa bazama *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) i *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) [134,137,138]. CTD baza povezuje sve interakcije sa originalnim publikacijama kako bi korisnicima omogućila pristup izvornim podacima za specifične detalje o odgovarajućim eksperimentima [139]. Stoga, ako je potrebno, detaljnim pregledom literature iz koje su podaci izdvojeni, moguće je steći bolji uvid o interakciji između hemikalija i gena, kao i molekularnim putevima od interesa, a znanje izvedeno iz CTD baze može biti korisno za identifikaciju biomarkera izloženosti [134,140–142], pružanje uvida u mehanizme toksičnosti [143,144], otkrivanje mogućih molekularnih puteva sa kojima interferiraju ispitivane hemikalije [145], i skrining velikog broja hemikalija za efekte na molekularnom nivou [138]. Takođe može da se koristi za procenu toksičnosti smeša, uzimajući u obzir sve moguće hemijske, genske, proteinske i metaboličke interakcije koje mogu biti značajne u proceni njihove toksičnosti [146].

2. *Cytoscape* (<https://cytoscape.org>) je softverski paket za vizuelizaciju, modelovanje i analizu molekularnih i genetskih mreža interakcije [147]. Može se kombinovati sa velikim brojem baza podataka i alata koji sadrže informacije o proteinima, DNK i genetskim interakcijama, kao i brojnim dodacima koji pružaju način za implementaciju novih algoritama i dodatnih analiza povezanosti između gena i molekularnih funkcija, bioloških procesa, itd. [147,148].

Korišćeni su sledeći *Cytosape* plug-in dodaci:

- *GeneMANIA* je alat dostupan online (<http://www.genemania.org>) i u formi *Cytoscape* dodatka (<https://apps.cytoscape.org/apps/genemania>). Prilagođena je korisniku za generisanje hipoteza o funkciji gena, analizu setova gena i određivanje prioriteta gena za dalje laboratorijske analize. Takođe, *GeneMANIA* proširuje listu funkcionalno sličnim genima koje identifikuje koristeći dostupne podatke o genomici i proteomici, pri čemu *GeneMANIA* daje podatke i o prediktivnoj vrednosti svakog unetog skupa podataka [149]. Kao rezultat analize, dobijaju se informacije o interakciji između gena. Postoji 7 različitih tipova interakcija:
  - Ko-ekspresija znači da su nivoi ekspresije dva gena slični u svim uslovima u studiji ekspresije gena;
  - Interakcije predviđene od strane servera su predviđeni funkcionalni odnosi između gena, često interakcije proteina. Glavni izvor predviđenih podataka je mapiranje poznatih funkcionalnih interakcija iz drugog organizma putem ortologije. Predviđa se da će dva proteina interagovati ako se zna da njihovi ortolozi interaguju u drugom organizmu;
  - Molekularni put znači da dva gena učestvuju u istoj reakciji unutar puta;
  - Fizičke interakcije podrazumevaju da geni interaguju u studiji interakcije protein-protein;
  - Zajednički proteinski domeni znače da dva gena dele isti proteinski domen;
  - Ko-lokalizacija znači da se geni eksprimiraju u istom tkivu/proteinu i nalaze na istoj lokaciji;
  - Genetske interakcije znače da su dva gena funkcionalno povezana – otkriveno je da su efekti poremećaja jednog gena modifikovani perturbacijama drugog gena.
- *CytoHubba* (<https://apps.Cytoscape.org/apps/cytohubba>) služi za istraživanje najvažnijih gena unutar mreže, koristeći različite algoritme topološke analize. Ova platforma za vizuelizaciju može se primeniti na unet skup podataka (gena), pri čemu se kao rezultat

dobija grafički prikaz mreže najvažnijih gena, dok je prioritet gena prikazan datom šemom boja [150].

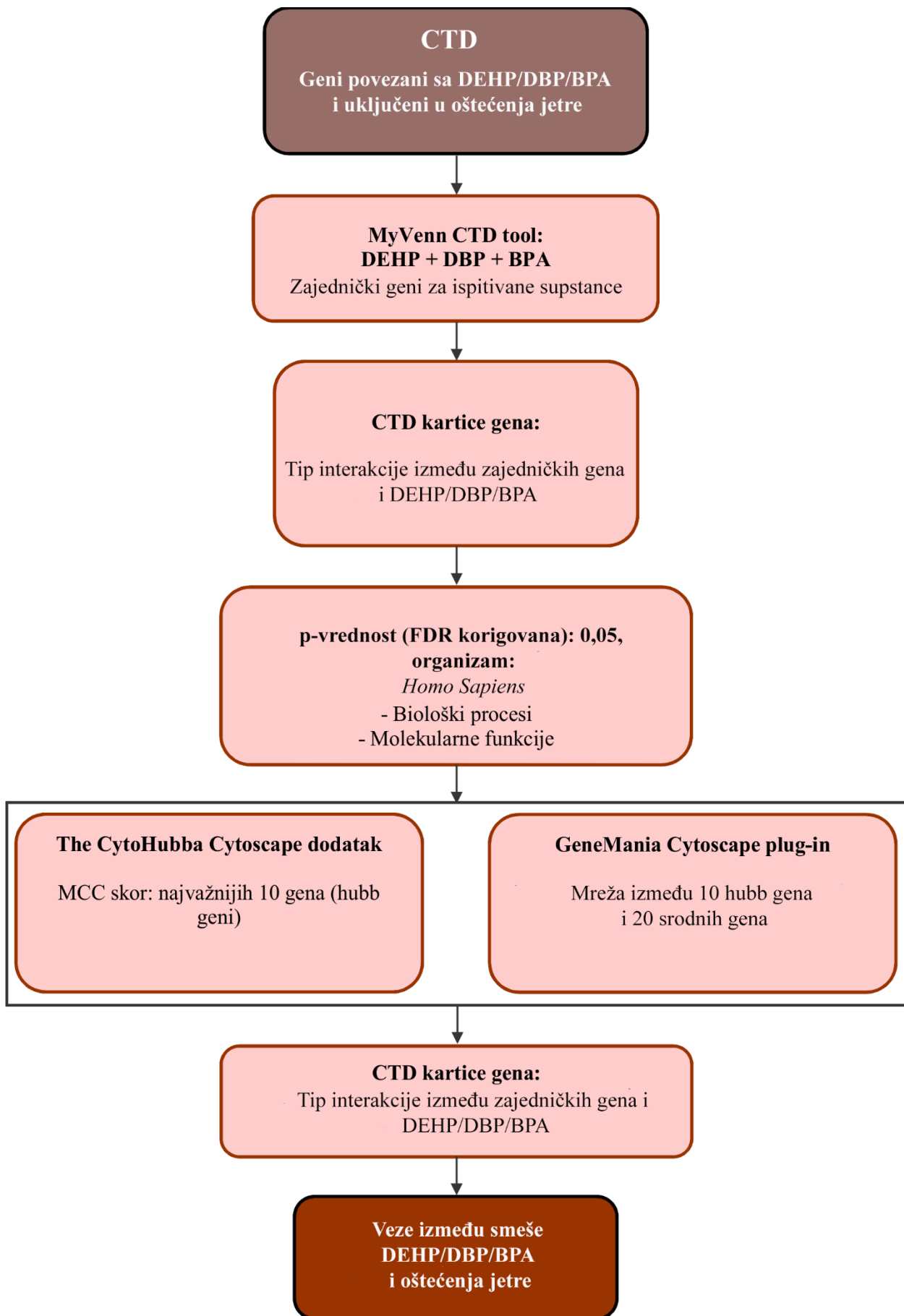
- *ClueGO + CluePedia*: *ClueGO* integriše GO termine i *KEGG/BioCard* molekularne puteve i stvara funkcionalno organizovanu mrežu GO/molekularnih puteva. Može da analizira jednu ili uporedi dve liste gena i sveobuhvatno vizuelizuje molekularne puteve i GO. Opcija ažuriranja jednostavnim klikom omogućava *ClueGO* da automatski preuzme najnovije GO/KEGG molekularne puteve u bilo kom trenutku [151]. *Cytoscape* dodatak *CluePedia* je alat za pretragu novih biomarkera koji su potencijalno povezani sa molekularnim putevima. Izračunava linearne i nelinearne statističke zavisnosti iz eksperimentalnih podataka. Geni, proteini i miRNA mogu biti povezani na osnovu *in silico* i/ili eksperimentalnih podataka i integrisani u *ClueGO* mrežu pojmova/puteva [152].

3. *ToppGene Suite* portal (<https://toppgene.cchmc.org>) je alat koji pomaže u identifikaciji gena i njihovom prioritetu na osnovu njihove funkcije i interakcija sa proteinima [153]. *ToppFun* *ToppGene* alat (<https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>) može se koristiti za analizu transkriptoma, ontologije gena i fenotipa na osnovu analize seta gena od interesa [153].

4. *DisGeNet* (<https://www.disgenet.org>) predstavlja jednu od najvećih dostupnih baza koja sadrži podatke o genima i genetskim varijacijama uključenim u razvoj bolesti kod ljudi. DisGeNET podaci su homogeno obeleženi kontrolisanim rečnicima i ontologijama. Pored toga, obezbeđeno je nekoliko originalnih pristupa koji pomažu u određivanju prioriteta odnosa genotip-fenotip. Ova platforma se može koristiti za različite svrhe, uključujući istraživanje molekularnih osnova specifičnih ljudskih bolesti i njihovih komorbiditeta, analizu svojstava povezanosti između gena i bolesti, stvaranje hipoteza o terapijskom delovanju lekova i njihovim štetnim efektima, validaciju računarski predviđenih gena i procenu performansi drugih *in silico* metoda [154].

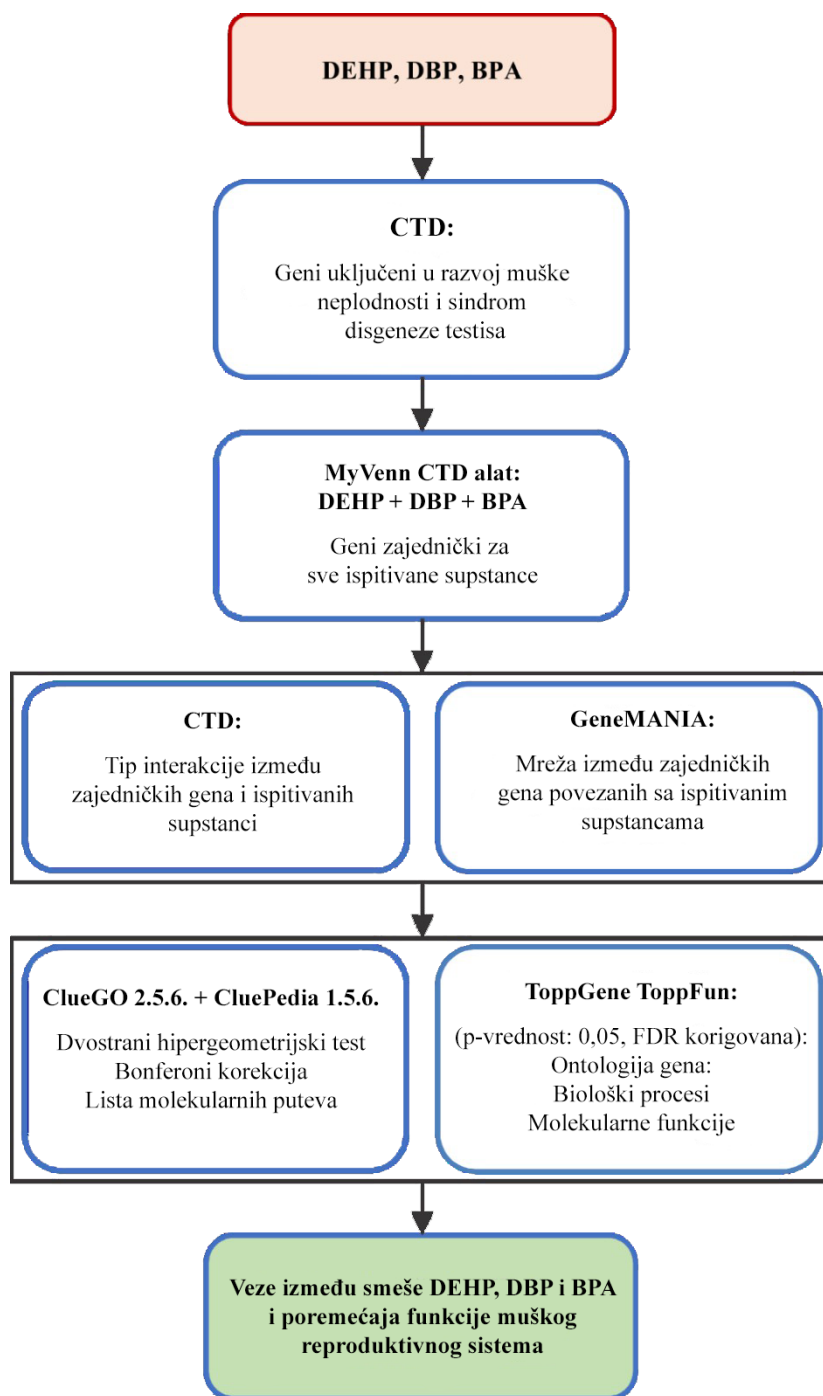
5. *ShinyGO* (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) omogućava GO analizu unete liste gena pomoću grafičke vizualizacije molekularnih puteva i interakcije proteina [155].

Na sledećim dijagramima toka dat je prikaz korišćenih koraka za *in silico* analizu uticaja smeše DEHP/DBP/BPA na razvoj oštećenja jetre (Slika 1), poremećaja muškog reproduktivnog sistema (Slika 2), dijabetes melitusa tipa 2 (Slika 3), astme (Slika 4) i gojaznosti (Slika 5).

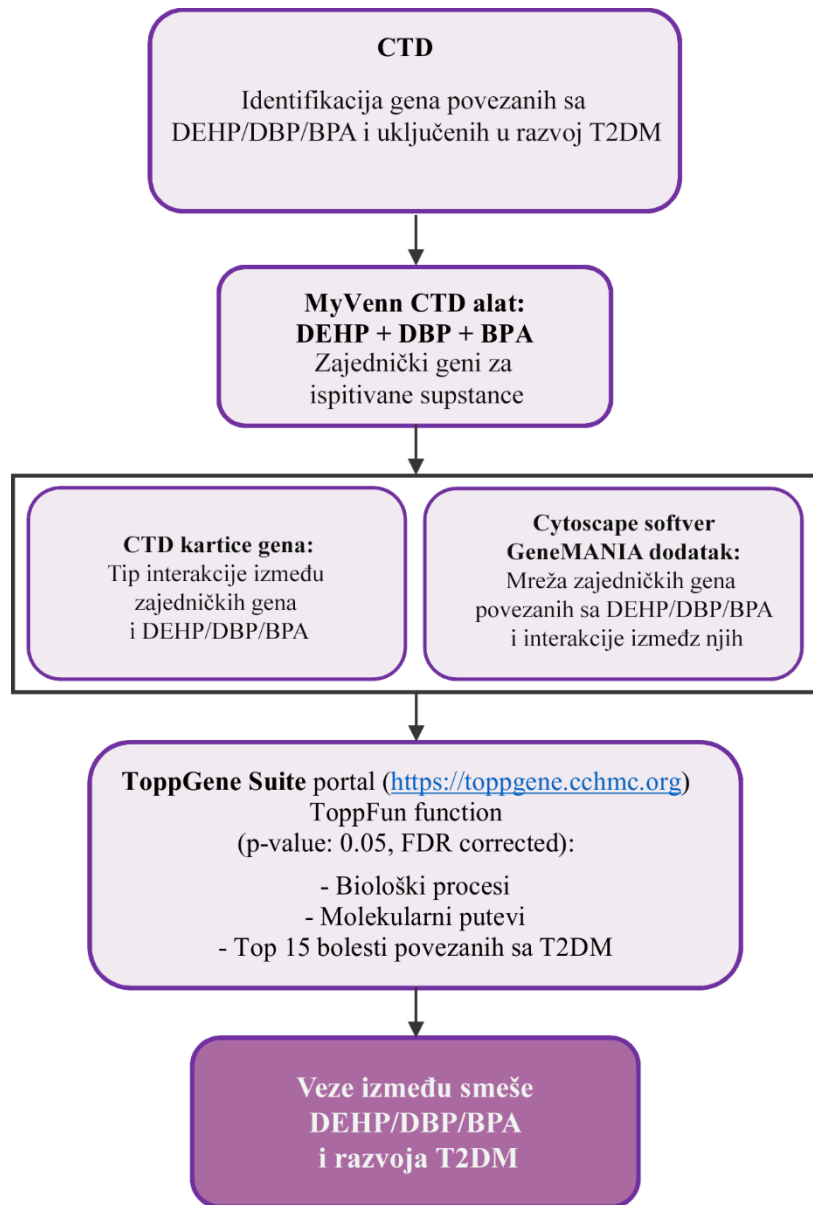


Slika 1. Dijagram *in silico* analize sprovedene da bi se ispitaio uticaj smeše DEHP/DBP/BPA na oštećenja jetre

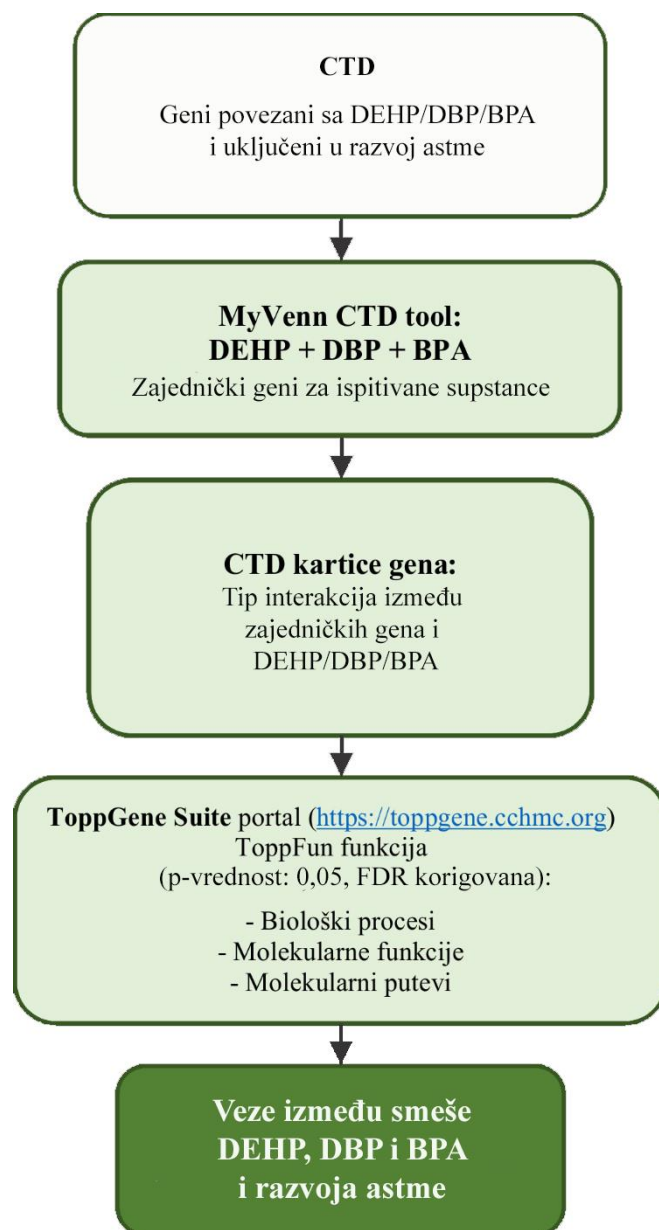




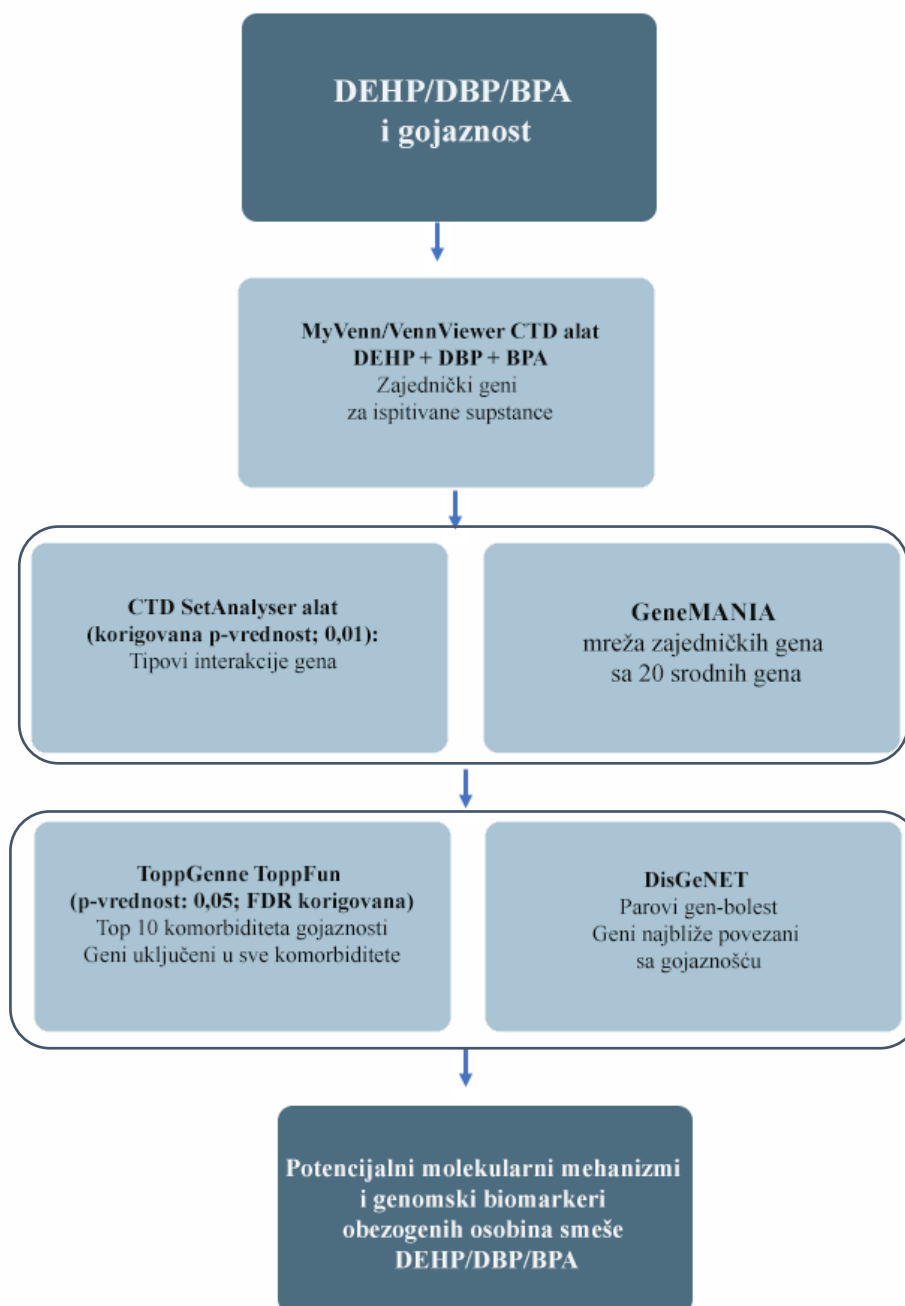
Slika 2. Dijagram *in silico* analize sprovedene sa ciljem ispitivanja uticaja smeše DEHP/DBP/BPA na razvoj poremećaja muškog reproduktivnog sistema



Slika 3. Dijagram *in silico* analize sprovedene sa ciljem ispitivanja uticaja smeše DEHP/DBP/BPA na razvoj dijabetes melitusa tipa 2



Slika 4. Dijagram *in silico* analize sprovedene sa ciljem ispitivanja uticaja smeše DEHP/DBP/BPA na razvoj astme



Slika 5. Dijagram *in silico* analize sprovedene sa ciljem ispitivanja uticaja smeše DEHP/DBP/BPA na razvoj gojaznosti

### 3.6. *In vitro* ispitivanje uticaja probiotika na smanjenje koncentracije ftalata i bisfenola A

Procenat smanjenja koncentracije DEHP, DBP i BPA nakon tretiranja probiotskim preparatom ispitan je metodom po Zhao i sar. (2013) [108], modifikovanom od strane Lili i sar. (2017) [93]. Smeša DEHP, DBP i BPA napravljena je rastvaranjem sve tri supstance u metanolu sa ciljem da se dobije rastvor koji sadrži 50 mg/L DEHP, 50 mg/L DBP i 25 mg/L BPA (MIX metanolni rastvor). Koncentracije supstanci u MIX metanolnom rastvoru su u korelaciji sa koncentracijama supstanci u rastvorima korišćenim u eksperimentu na pacovima.

Za eksperiment utvrđivanja smanjenja koncentracije DEHP, DBP i BPA pod dejstvom probiotika korišćena su dva komercijalno dostupna probiotska preparata (Abela Pharm, Beograd, Srbija):

- B: Bulardi®
- P: Enterobiotik® FORTE.

U eksperimentu je sadržaj jedne kapsule svakog probiotskig preparata suspendovan u 2 mL MIX metanolnog rastvora i inkubiran na 37 °C tokom 4 h. Analiza je obavljena u triplikatu. Čelije su uklonjene centrifugiranjem na 5000x g tokom 10 min na 4 °C. Supernatanti koji sadrže nevezani DEHP, DBP i BPA sakupljeni su za dalju analizu tečnom hromatografijom visokih performansi (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) (Agilent 1200 serija, Multi-Solvent HPLC Gradient Sistem, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) sa detektorom umreženih fotodioda (DAD). Uzorci su filtrirani kroz membranu od 0,45 µm i čuvani do analize na 4 °C u vijalama od 2 mL. Razdvajanje je izvedeno na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 mic, 4,6 k 150 mm) na sobnoj temperaturi. Mobilna faza je bila 10% vode – 90% acetonitrila i ultra čiste vode, a protok 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Zapremina injektovanja uzorka bila je 10 µL, dok je detekcija izvršena na 195 nm za DEHP i DBP i na 225 nm za BPA. Kvantifikacija DEHP, DBP i BPA je izvršena eksternom standardnom metodom, pri čemu je korišćen referentni materijal Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Nemačka) (99,3% DEHP, 99,4% DBP i 99,8% BPA). MIX metanolni rastvor je služio kao kontrola. Pripremljen je i analiziran na isti način kao i uzorci (bez dodatka analiziranih probiotskih preparata). Stopa vezivanja DEHP/DBP/BPA izračunata je korišćenjem sledeće formule:

$$\text{Procenat vezivanja (\%)} = \frac{\text{MIX površina ispod pika pozitivne kontrole} - \text{MIX površina pika uzorka}}{\text{MIX površina pika pozitivne kontrole}} \times 100$$

### 3.7. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka i grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću GraphPad Prism 6 softvera (*GraphPad Software, Inc.*, San Diego, California, USA). U prvom koraku testirana je normalnost distribucije (Šapiro–Vilkov metod). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) primenjena je u slučaju normalne distribucije, praćena Fišerovim testom najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Neparametarski *Kruskal–Wallis* test praćen *Dunn* post-hoc testom je rađen u slučaju distribucije koja nije bila normalna. Značajnost je prihvaćena za  $p < 0,05$ .

## 4. Rezultati

### 4.1. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI FTALATA, BISFENOLA A I NJIHOVE SMEŠE

#### 4.1.1. *In vivo* rezultati na modelu pacova

##### 4.1.1.1. Prirast telesne mase

Prirast telesne mase (BWG) i procentualna razlika u četiri odabrana vremenska perioda (7. dan, 14 dan, 21. dan i 28. dan) tokom eksperimenta predstavljeni su u Tabeli 4. BWG bio je značajno niži u svim predstavljenim vremenskim periodima u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolom, sa izuzetkom DEHP grupe. U ovoj grupi je BWG bio znatno niži tek nakon prve nedelje tretmana.

Međutim, prema smernicama WHO [156], štetnim efektom smatra se promena u telesnoj masi koja je 10% iznad ili ispod kontrolne vrednosti. Prema ovim kriterijumima, većina uočenih promena nalaze se van ovog opsega (+/- 10%) i mogu se smatrati štetnim efektom.

Nije bilo značajne razlike u BWG između MIX grupe i svih grupa u kojima su pacovi primali pojedinačne supstance u svim odabranim vremenskim tačkama.

Tabela 4. Prirast telesne mase nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

		7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
Kontrola	BWG	0,4344 ± 0,05996	0,8265 ± 0,1092	1,151 ± 0,1708	1,425 ± 0,2461
	BWG	0,3496 ± 0,02875*	0,7347 ± 0,09337	1,077 ± 0,1378	1,327 ± 0,2461
	% u odnosu na kontrolu	-20%	-11%	-6%	-7%
DEHP	BWG	0,2826 ± 0,05433***	0,5559 ± 0,05379***	0,8089 ± 0,06926***	1,016 ± 0,08851***
	% u odnosu na kontrolu	-35%	-33%	-30%	-29%
DBP	BWG	0,3228 ± 0,03756***	0,7001 ± 0,09798*	0,9503 ± 0,1422*	1,192 ± 0,1682*
	% u odnosu na kontrolu	-26%	-15%	-17%	-16%
BPA	BWG	0,3190 ± 0,03681***	0,6459 ± 0,04416**	0,9237 ± 0,3505**	1,147 ± 0,1048**
	% u odnosu na kontrolu	-26%	-22%	-20%	-19%
MIX	BWG	0,3190 ± 0,03681***	0,6459 ± 0,04416**	0,9237 ± 0,3505**	1,147 ± 0,1048**
	% u odnosu na kontrolu	-26%	-22%	-20%	-19%

\*p<0.05, \*\* p< 0.01; \*\*\* p< 0.001; Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD)/Neparametarski *Kruskal-Wallis* test + *Dunn* test. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti i standardne devijacije. (n = 6). BWG: Body weight gain; DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat (50 mg/kg t.m/dan); DBP: dibutil ftalat (50 mg/kg t.m/dan); BPA: bisfenol A (25 mg/kg t.m/dan); MIX: 50 mg/kg t.m/dan DEHP + 50 mg/kg t.m/dan DBP + 25 mg/kg t.m/dan BPA.

##### 4.1.1.2. Unos hrane i vode

Unos hrane i vode pacova u kontrolnoj i grupama tretiranim pojedinačnim ispitivanim supstancama DEHP/DBP/BPA i njihovoj smeši dat je u tabelama 5 i 6, dok je dnevni unos hrane i vode prikazan na slikama 6A i 6B, redom. Unos hrane u MIX grupi bio je značajno niži u poređenju sa kontrolom u sve četiri ispitivana perioda u odnosu na predstavljene vremenske tačke, dok je u DEHP grupi bio niži tek nakon prve nedelje tretmana. Povećanje unosa hrane zabeleženo je u DBP i BPA grupi nakon treće nedelje tretmana. Međutim, statistički značajna razlika u ukupnom unosu hrane bila je uočena u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolom, niža u DEHP i MIX grupi i viša u DBP i BPA grupi (Slika 6A). Takođe, unos hrane bio je značajno niži u MIX grupi u poređenju sa DBP i BPA grupama u svim ispitivanim vremenskim periodima, dok se značajno razlikovao od DEHP grupe tek nakon druge i četvrte odabrane vremenske tačke. Ipak, ukupan unos hrane bio je značajno niži u MIX grupi u poređenju sa svim ostalim grupama u kojima su pacovi tretirani pojedinačnim supstancama.

Značajno smanjenje ukupnog unosa vode u poređenju sa kontrolom zabeleženo je u BPA i MIX grupi, kao i u prve tri vremenske tačke (Tabela 6). Unos vode bio je značajno snižen u DBP grupi samo u trećem predstavljenom vremenskom periodu, a u DEHP grupi nakon četvrte nedelje tretmana. Razlika u ukupnom unosu vode nije zabeležena ni u DEHP, ni u DBP grupi u poređenju sa kontrolom (Slika 6B).

S druge strane, unos vode bila je značajno viša u DEHP i DBP grupama u poređenju sa MIX grupom u sve četiri predstavljene vremenska tačke, osim u trećoj nedelji, nakon čega nije bilo značajne razlike za DBP grupu u poređenju sa MIX. Nakon prve i druge nedelje tretmana unos vode bila je značajno viša u BPA grupi u poređenju sa MIX, ali niža u poređenju sa kontrolnom grupom. Međutim, nije bilo značajne razlike između BPA i MIX grupe nakon treće i četvrte nedelje. Što se tiče ukupnog unosa vode, ona je bila značajno viša u DEHP i DBP grupi u poređenju sa MIX, dok nije bilo značajne razlike između BPA i MIX grupe.

Tabela 5. Unos hrane nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

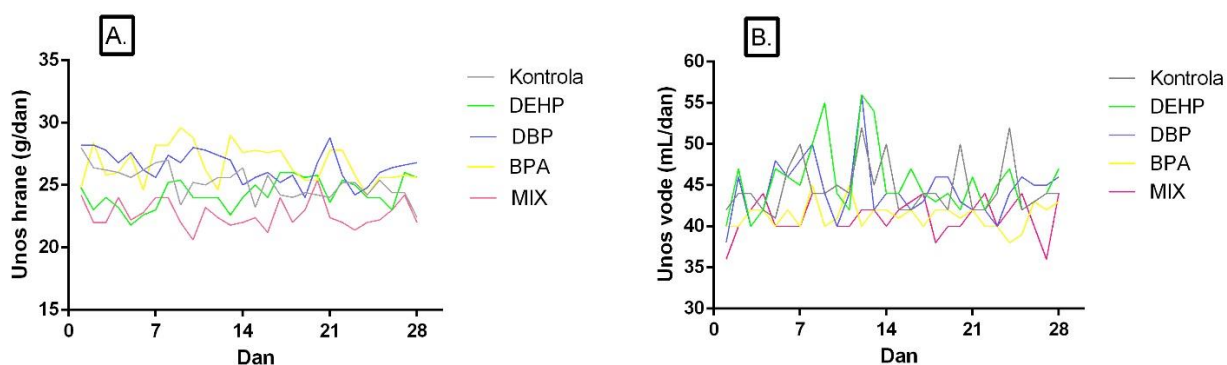
		7. dan	14. dan	21. dan	27. dan	Ukupna unos hrane
Kontrola	Unos hrane	26,13 ± 1,451	25,9 ± 1,010	25,5 ± 0,5477	26,17 ± 1,169	25,16 ± 1,261
DEHP	Unos hrane	23,50 ± 1,871**	24,83 ± 2,483‡	24,27 ± 2,439	25,27 ± 0,7659***	24,06 ± 1,796****
	% u odnosu na kontrolu	-10	-4	-5	-3	-4
DBP	Unos hrane	25,67 ± 1,211**	25,67 ± 0,0165**	27,47 ± 1,840****	27,13 ± 0,9933***	26,52 ± 1,243****
	% u odnosu na kontrolu	-2	-1	8	4	5
BPA	Unos hrane	26,87 ± 1,633***	27,10 ± 1,435***	27,97 ± 1,417****	25,43 ± 1,023***	26,70 ± 1,510****
	% u odnosu na kontrolu	3	5	10	-3	6
MIX	Unos hrane	23,17 ± 1,472**	22,50 ± 1,871**	22,57 ± 1,023**	22,17 ± 1,169**	22,66 ± 1,102**
	% u odnosu na kontrolu	-11	-13	-11	-15	-10

\*p<0.05, \*\* p< 0.01 (u poređenju sa kontrolom); ‡p<0.05, †† p< 0.01, ††† p<0.001 (u poređenju sa MIX grupom); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n = 6). DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat (50 mg/kg t.m/dan); DBP: dibutil ftalat (50 mg/kg t.m/dan); BPA: bisfenol A (25 mg/kg t.m/dan); MIX: Smeša (50 mg/kg t.m/dan DEHP + 50 mg/kg t.m/dan DBP + 25 mg/kg t.m/dan BPA)

Tabela 6. Unos vode nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

		7. dan	14. dan	21. dan	27. dan	Ukupna unos vode
Kontrola	Unos vode (mL)	45,20 ± 0,8367	43,80 ± 0,8367	46,20 ± 1,924	44,20 ± 0,8367	44,68 ± 3,198
DEHP	Unos vode (mL)	44,60 ± 1,140***	44,20 ± 0,8367***	45,20 ± 1,304***	46,80 ± 0,8367****	45,43 ± 4,095***
	% u odnosu na kontrolu	-1	1	-2	6	2
DBP	Unos vode (mL)	44,20 ± 1,095***	44,00 ± 0,7071***	41,40 ± 1,440***	45,20 ± 0,8367**	44,36 ± 3,551**
	% u odnosu na kontrolu	-2	0	-10	2	-1
BPA	Unos vode (mL)	41,60 ± 1,817****	40,08 ± 1,183****	41,50 ± 0,8944***	43,00 ± 1,531	41,29 ± 1,607**
	% u odnosu na kontrolu	-8	-8	-10	-3	-8
MIX	Unos vode (mL)	39,20 ± 1,304***	39,40 ± 1,140***	41,40 ± 0,8944***	43,00 ± 1,551	41,18 ± 2,294***
	% u odnosu na kontrolu	-13	-10	-10	-3	-8

\*p<0.05, \*\* p< 0.01 (compared to the control); ‡p<0.05, †† p< 0.01, ††† p<0.001 (compared to the MIX group). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n = 6). DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat (50 mg/kg t.m/dan); DBP: dibutil ftalat (50 mg/kg t.m/dan); BPA: bisfenol A (25 mg/kg t.m/dan); MIX: Smeša (50 mg/kg t.m/dan DEHP + 50 mg/kg t.m/dan DBP + 25 mg/kg t.m/dan BPA)



Slika 6. A. Unos hrane (g/dan) i B. vode (mL/dan) nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

#### 4.1.1.3. Relativne mase organa

Relativne mase organa (engl. *Relative organ weights*) predstavljene su u Tabeli 7. Zabeležen je značajan porast relativne mase jetre pacova koji su bili tretirani DEHP (24%), kao i u MIX grupi (17%) u poređenju sa kontrolom. Pored toga, relativna masa jetre bila je značajno niža i u DBP i u BPA grupi u poređenju sa MIX grupom, dok nije bilo značajne razlike između DEHP i MIX grupe. Relativna masa slezine bila je značajno niža u MIX grupi u poređenju sa kontrolom (-23%), dok je samo u DBP grupi bila značajno niža u poređenju sa MIX grupom, što je bio slučaj i sa relativnom masom mozga, značajno nižom samo u DBP grupi u poređenju sa MIX grupom. Relativna masa bubrega bila je viša u MIX grupi u poređenju sa kontrolom, kao i u odnosu na DBP i BPA grupe. Relativna masa timusa bila je značajno viša u DEHP grupi u poređenju sa MIX grupom. Iako razlika nije bila statistički značajna, u MIX grupi je zabeležen blagi porast relativne mase pluća, bubrega, testisa, mozga i štitaste žlezde u poređenju sa grupama koje su bile tretirane pojedinačnim supstancama, dok je zabeleženo smanjenje relativne mase slezine u MIX grupi u poređenju sa svim grupama tretiranim pojedinačnim supstancama.

Tabela 7. Relativne mase organa nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

		Jetra	Pluća	Srce	Bubrezi	Testisi	Slezina	Timus	Mozak
Kontrola	ROW	3,448 ± 0,3311	0,3917 ± 0,04355	0,2833 ± 0,03266	0,6067 ± 0,03615	0,8117 ± 0,1137	0,2000 ± 0,02098	0,1967 ± 0,03011	0,4950 ± 0,05822
	% u odnosu na kontrolu	24	-9	12	7	-3	-10	15	0
DEHP	ROW	4,266 ± 0,2100***	0,3560 ± 0,0251	0,3160 ± 0,02302*	0,6500 ± 0,05701	0,7880 ± 0,1011	0,1800 ± 0,02915	0,2260 ± 0,04615‡	0,4940 ± 0,03578
	% u odnosu na kontrolu	3	-12	12	-1	-3	-4	-13	-7
DBP	ROW	3,560 ± 0,2754**	0,3440 ± 0,05413	0,3160 ± 0,02302	0,600 ± 0,01414**	0,7860 ± 0,08264	0,1920 ± 0,03564‡	0,1720 ± 0,01483	0,4580 ± 0,01643‡
	% u odnosu na kontrolu	-2	-11	-4	0	0	-7	-15	-6
BPA	ROW	3,390 ± 0,1920***	0,3480 ± 0,04147	0,2720 ± 0,02588	0,6040 ± 0,03782‡	0,8120 ± 0,07120	0,1860 ± 0,03362	0,1680 ± 0,02387	0,4660 ± 0,03050
	% u odnosu na kontrolu	17	6	6	12	4	-23	-10	5
MIX	ROW	4,032 ± 0,2513**	0,4167 ± 0,03327	0,3017 ± 0,01602	0,6783 ± 0,05981*	0,8467 ± 0,08937	0,1550 ± 0,01517**	0,1767 ± 0,03445	0,5183 ± 0,03656
	% u odnosu na kontrolu	17	6	6	12	4	-23	-10	5

\*p<0.05, \*\* p< 0.01 (u poređenju sa kontrolom); ‡p<0.05, †† p< 0.01, ††† p<0.001 (u poređenju sa MIX grupom). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*)/Neparametarski *Kruskal-Wallis* test + *Dunn* test. Vrednosti so predstavljene kao srednje vrednosti ± standardna devijacija (n = 6). ROW: Relativne mase organa (engl. *Relative organ weights*); DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat (50 mg/kg t.m/dan); DBP: dibutil ftalat (50 mg/kg t.m/dan); BPA: bisfenol A (25 mg/kg t.m/dan); MIX: Smeša (50 mg/kg t.m/dan DEHP + 50 mg/kg t.m/dan DBP + 25 mg/kg t.m/dan BPA).



#### 4.1.1.4. Hematološki parametri

Hematološki parametri izmereni u ovom istraživanju predstavljani su u Tabeli 8. Kod pacova koji su primali DEHP zabeležen je značajan porast WBC, LYM i MON u poređenju sa kontrolom. U DBP grup je uočen značajan porast LYM i WBC, dok su u BPA grupi RBC, HGB, HCT i MCHC bili povišeni u poređenju sa kontrolom. Promene u većini parametara zabeležene su u MIX grupi, u kojoj su WBC, LYM, NEU, MON, RBC, HGB, HCT i MCHC bili povišeni u poređenju sa kontrolom. Zabeležen je značajan pad WBC, LYM i MON kod BPA grupe u poređenju sa MIX grupom, dok su u DBP grupi RBC i HGB niži u poređenju sa MIX grupom. Hematokrit i MCHC bili su značajno niži u DEHP i DBP grupama u poređenju sa MIX grupom. Nije bilo značajnih razlika u EOS, BAS, MCH i PLT kod tretiranih grupa u poređenju sa kontrolom.

Tabela 8. Hematološki parametri nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

Parametar		Kontrola	DEHP	DBP	BPA	MIX
WBC (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	5,400	9,000**	9,320**	5,340 <sup>‡</sup>	8,700**
	SD	1,740	0,9850	1,450	1,419	0,8958
	% u odnosu na kontrolu		67	73	-1	61
NEU (%)	Srednja vrednost	6,680	5,280	6,060	6,975	5,833
	SD	1,983	1,145	1,553	0,1500	0,7581
	% u odnosu na kontrolu		-21	-9	4	-13
LYM (%)	Srednja vrednost	86,40	93,20**	92,76*	88,86	92,67*
	SD	6,597	1,259	1,440	4,143	1,060
	% u odnosu na kontrolu		8	7	3	7
MON (%)	Srednja vrednost	0,4333	0,6800	0,4600	0,7600	0,9200*
	SD	0,1633	0,3768	0,2302	0,1140	0,3114
	% u odnosu na kontrolu		57	6	75	112
EOS (%)	Srednja vrednost	0,4167	0,3000	0,3400	0,3000	0,2333
	SD	0,1472	0,2000	0,1342	0,1225	0,1966
	% u odnosu na kontrolu		-28	-18	-28	-44
BAS (%)	Srednja vrednost	0,6000	0,5400	0,3800	0,6200	0,5167
	SD	0,2000	0,2881	0,08367	0,1483	0,2639
	% u odnosu na kontrolu		-10	-37	3	-14
NEU (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	0,4583	0,4683	0,5020	0,3700	0,6260*
	SD	0,1157	0,1516	0,1596	0,1089	0,05737
	% u odnosu na kontrolu		2	10	-19	37
LYM (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	4,810	8,205**	7,634**	4,958 <sup>‡</sup>	7,440**
	SD	0,3540	0,9052	0,7413	1,335	2,180
	% u odnosu na kontrolu		71	59	3	55
MON (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	0,03667	0,0780*	0,0600	0,0320 <sup>‡</sup>	0,06333
	SD	0,02503	0,02280	0,03312	0,01095	0,04274
	% u odnosu na kontrolu		113	64	-13	73
EOS (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	0,0200	0,0280	0,0180	0,0260	0,01667
	SD	0,007071	0,01924	0,008367	0,008944	0,008165
	% u odnosu na kontrolu		40	-10	30	-17
BAS (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	0,03333	0,0492	0,0204	0,0531	0,04317
	SD	0,01325	0,02531	0,00666	0,0137	0,02740
	% u odnosu na kontrolu		48	-39	59	30
RBC (10 <sup>12</sup> /L)	Srednja vrednost	7,100	7,582	7,320 <sup>‡</sup>	7,850**	7,940**
	SD	0,5571	0,2384	0,1775	0,3424	0,6403
	% u odnosu na kontrolu		7	3	11	12
HGB (g/L)	Srednja vrednost	138,0	147	140,4	150,4**	151,7**
	SD	2,550	2,702	2,702	2,333	2,0101
	% u odnosu na kontrolu		7	2	2	10

HCT (%)	Srednja vrednost	0,4400	0,4448**	0,4476**	0,4816**	0,4940**
	SD	0,02052	0,01706	0,0065	0,0101	0,01937
	% u odnosu na kontrolu		1	2	9	12
MCV (fL)	Srednja vrednost	61,37	61,56	61,16	59,92	62,23
	SD	1,857	2,137	1,286	2,204	1,773
	% u odnosu na kontrolu		0	0	-2	1
MCH (pg)	Srednja vrednost	19,12	18,98	19,18	19,40	19,10
	SD	0,5020	0,7120	0,4324	0,4848	0,3735
	% u odnosu na kontrolu		-1	0	1	0
MCHC (g/L)	Srednja vrednost	313,2	313,0 <sup>‡</sup>	313,6 <sup>‡</sup>	317,4*	317,5*
	SD	3,114	2,550	4,159	3,194	4,215
	% u odnosu na kontrolu		0	0	1	1
PLT (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	548,0	627,6	568,0	515,3	589,4
	SD	22,64	46,16	60,55	44,92	55,89
	% u odnosu na kontrolu		15	4	-6	8

\*p<0.05, \*\* p< 0.01 (u poređenju sa kontrolom); ‡p<0.05, ‡‡ p< 0.01 (u poređenju sa MIX grupom); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD)/Neparametarski *Kruskal–Wallis* test + *Dunn* test. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti i standardne devijacije. DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat (50 mg/kg t.m/dan); DBP: dibutil ftalat (50 mg/kg t.m/dan); BPA: Bisfenol A (25 mg/kg t.m/dan); MIX: 50 mg/kg t.m/dan DEHP + 50 mg/kg t.m/dan DBP + 25 mg/kg t.m/dan BPA; WBC: leukociti, NEU: neutrofilii, LYM: limfociti, MON: monociti, EOS: eozinofili, BAS: bazofili, RBC: eritrociti, HGB: hemoglobin, HCT: hematokrit, MCV: srednji korpuskularni volumen, MCH: srednji korpuskularni hemoglobin, MCHC: srednja korpuskularna koncentracija hemoglobina, PLT: trombociti

#### 4.1.1.5. Biohemijski parametri

U Tabeli 9 predstavljeni su biohemijski parametri mereni u serumu nakon 28 dana izloženosti pacova ispitivanim supstancama i njihovoj smeši. Statistički značajna razlika primećena je kod više parametara u MIX grupi u poređenju sa kontrolom nego u grupama koje su primale pojedinačne supstance.

Biohemijski parametri u serumu povezani sa funkcijom jetre predstavljeni su na slici 7. U MIX grupi zabeleženo je značajno povišenje ALT, AST i ukupnog bilirubina u poređenju sa kontrolom (Slike 7A, 7B i 7E). Od parametara funkcije jetre, u DEHP i BPA grupi primećen je značajan porast samo u aktivnosti ALP (Slika 7F). U poređenju sa MIX grupom, aktivnost ALT bila je značajno niža u grupama koje su primale pojedinačne supstance, dok je AST bila značajno niža samo u DEHP grupi (Slike 7A i 7B).

U MIX grupi došlo je do značajnog povišenja nivoa uree u poređenju sa kontrolom. Značajan porast nivoa glukoze u poređenju sa kontrolnom grupom zabeležen je ne samo u MIX, već i u DEHP i DBP grupi. Nije bilo značajne razlike u nivou glukoze u BPA grupi u poređenju sa kontrolom, ali je nivo glukoze bio značajno niži u poređenju sa MIX grupom. Parametri lipidnog profila prikazani su na Slici 8. Značajno smanjenje nivoa holesterola zabeleženo je u DEHP, DBP i MIX grupama (Slika 8B), dok su LDL i trigliceridi bili značajno povišeni u DBP i BPA grupama u poređenju sa kontrolom (Slika 8A i 8D). Ni u jednoj grupi nije bilo značajne razlike u nivou HDL u poređenju sa kontrolom (Slika 8C). U poređenju sa MIX grupom, holesterol je bio značajno viši u BPA grupi, dok su trigliceridi bili značajno povišeni ne samo u BPA, već i u DBP grupi.

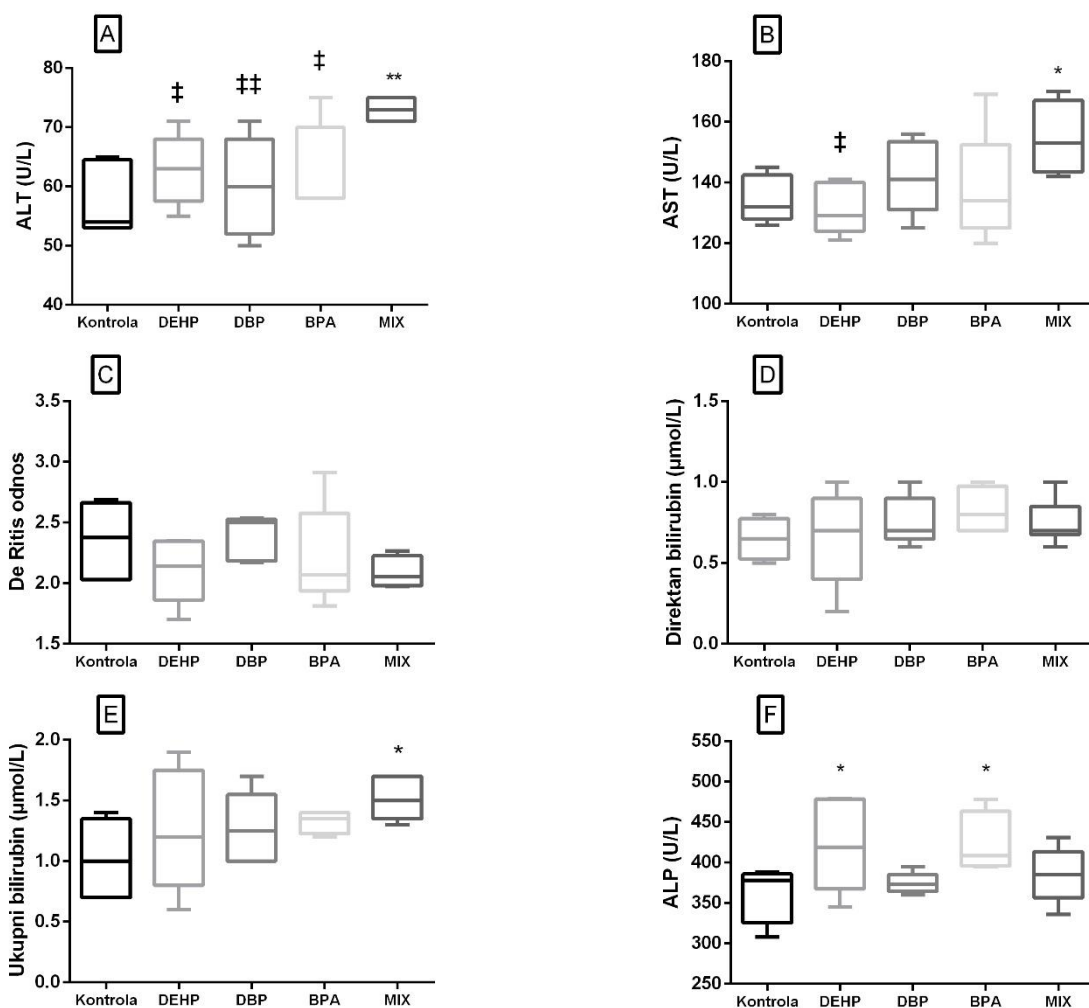
Tabela 9. Biohemijski parametri u serumu nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

Parametar		Kontrola	DEHP	DBP	BPA	MIX
Glukoza (mmol/L)	Srednja vrednost	11,78	14,86*	14,78*	11,06 <sup>‡</sup>	14,58*
	SD	2,931	2,808	1,630	2,241	1,941
	% u odnosu na kontrolu		26	25	-6	24
CRP (mg/L)	Srednja vrednost	0,4500	0,7800*	0,7400*	0,6000	0,7833*
	SD	0,05477	0,1789	0,1517	0,2449	0,1169
	% u odnosu na kontrolu		73	64	33	74

	kontrolu					
Urea (mmol/L)	Srednja vrednost	7,540	7,300	7,300	7,550	8,033*
	SD	0,4506	0,7517	0,7517	0,7937	0,8779
	% u odnosu na kontrolu		-3	-3	0	7
Kreatinin (μmol/L)	Srednja vrednost	43	43,80	44,20	44,25	42,50
	SD	4,743	3,347	3,114	3,775	2,345
	% u odnosu na kontrolu		2	3	3	-1
Mokraćna kiselina (μmol/L)	Srednja vrednost	337,2	360,8	373,4	304,0	355,8
	SD	71,71	98,04	98,04	40,32	59,18
	% u odnosu na kontrolu		7	11	-10	6
Ukupni proteini (g/L)	Srednja vrednost	76,20	78,80	76,40	72,50	76,17
	SD	4,207	8,408	2,074	7,506	2,639
	% u odnosu na kontrolu		3	0	-5	0
Albumin (g/L)	Srednja vrednost	50,75	53,00	50,080	49,75	53,00
	SD	2,500	5,149	1,643	5,252	2,530
	% u odnosu na kontrolu		6	1	0	6
Ukupni bilirubin (μmol/L)	Srednja vrednost	1,020	1,260	1,183	1,325	1,520*
	SD	0,3271	0,5079	0,3061	0,09574	0,1789
	% u odnosu na kontrolu		24	16	30	49
Direktni bilirubin (μmol/L)	Srednja vrednost	0,6500	0,6600	0,7600	0,8250	0,7500
	SD	0,1291	0,2966	0,1517	0,1500	0,1378
	% u odnosu na kontrolu		2	17	27	15
ALT (U/L)	Srednja vrednost	57,8	62,8 <sup>‡</sup>	60,0 <sup>‡‡</sup>	62,8 <sup>‡</sup>	73,00 <sup>**</sup>
	SD	6,140	5,933	8,396	7,463	2,309
	% u odnosu na kontrolu		2	1	5	27
AST (U/L)	Srednja vrednost	134,6	131,4 <sup>‡</sup>	142,0	137,8	154,5 <sup>*</sup>
	SD	7,733	8,417	12,17	18,5	12,26
	% u odnosu na kontrolu		-1	7	5	15
The De Ritis odnos	Srednja vrednost	2,353	2,111	2,384	2,220	2,087
	SD	0,3168	0,2680	0,1841	0,4169	0,1331
	% u odnosu na kontrolu		-10	1	-6	-11
ALP (U/L)	Srednja vrednost	363,00	422,2 <sup>*</sup>	374,7	422,5 <sup>*</sup>	385,0
	SD	36,98	57,76	12,88	38,51	34,29
	% u odnosu na kontrolu		16	3	16	2
Holesterol (mmol/L)	Srednja vrednost	1,584	1,274 <sup>**</sup>	1,356 <sup>*</sup>	1,796 <sup>†††</sup>	1,290 <sup>*</sup>
	SD	0,2031	0,2045	0,1232	0,1623	0,1377
	% u odnosu na kontrolu		0	7	18	4

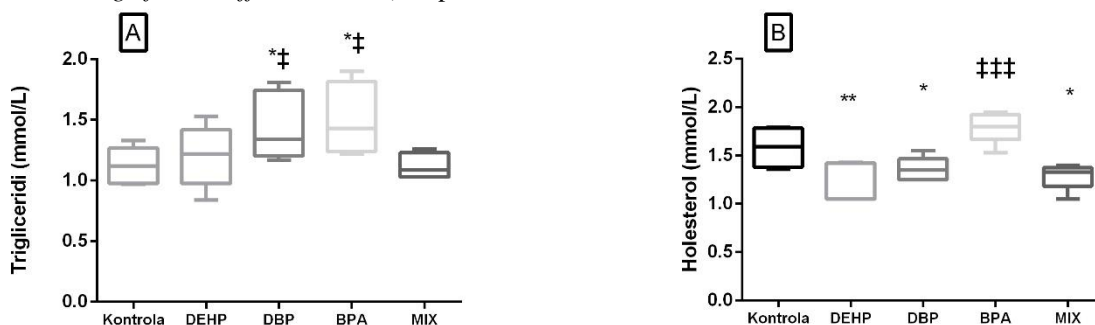
HDL (mmol/L)	Srednja vrednost	0,9980	0,9600	0,9600	0,9400	0,8425
	SD	0,07225	0,1872	0,1581	0,1780	0,09605
	% u odnosu na kontrolu		-4	-4	-6	-16
LDL (mmol/L)	Srednja vrednost	0,2960	0,3040	0,3680*	0,3725*	0,3450
	SD	0,02608	0,05188	0,0497	0,05188	0,01243
	% u odnosu na kontrolu		3	24	26	16,5
Trigliceridi (mmol/L)	Srednja vrednost	1,122	1,202	1,448*‡	1,508*‡	1,115
	SD	0,1535	0,2545	0,2815	0,2973	0,1097
	% u odnosu na kontrolu		7	29	34	-1
Serumsko gvožđe (µmol/L)	Srednja vrednost	46,33	43,05	44,00	37,75*	41,13
	SD	3,963	6,717	2,993	3,148	5,086
	% u odnosu na kontrolu		-7	-5	-19	-11
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	Srednja vrednost	157,0	155,8	153,8	160,3	159,0
	SD	4,393	2,683	1,304	6,602	3,521
	% u odnosu na kontrolu		-1	-2	1	1
K <sup>+</sup> (mmol/L)	Srednja vrednost	8,920	9,300	9,100	8,450	8,365
	SD	1,066	1,703	0,6782	1,507	0,3061
	% u odnosu na kontrolu		4	2	-5	-6
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	Srednja vrednost	102,6	100,6	100,4	101,3	101,8
	SD	2,191	1,817	1,140	2,754	2,041
	% u odnosu na kontrolu		-2	-2	-1	-1
Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	Srednja vrednost	3,762	3,843	3,988	3,890	3,927
	SD	0,2095	0,2451	0,2895	0,1158	0,1782
	% u odnosu na kontrolu		2	6	3	4
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mmol/L)	Srednja vrednost	4,910	5,520	4,954	5,410	5,227
	SD	0,3955	0,9345	0,4149	0,4859	0,4700
	% u odnosu na kontrolu		12	1	10	6
Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	Srednja vrednost	2,198	2,380	2,478	2,195	2,277
	SD	0,2869	0,2616	0,3268	0,2272	0,2045
	% u odnosu na kontrolu		8	13	0	4

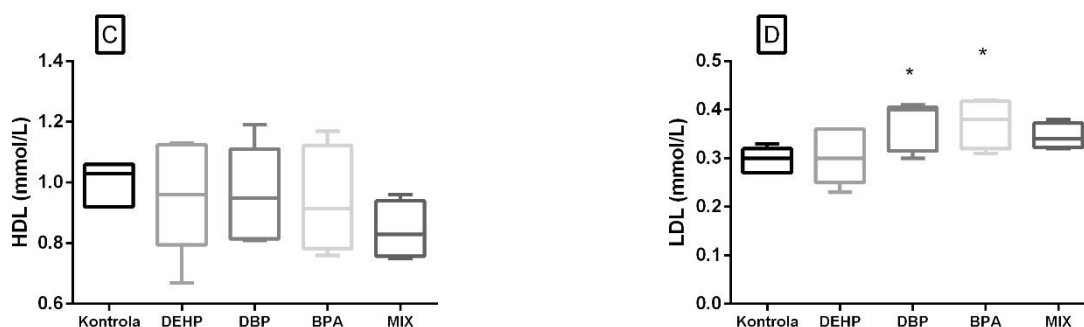
\*p<0.05, \*\* p< 0.01 (compared to the control); ‡p<0.05, †† p< 0.01, ††† p<0.001 (compared to the MIX group); Jednofaktorska ANOVA sa LSD post-hoc testom / Kruskal–Volisov test sa Danovim post-hoc testom. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti i standardne devijacije. DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat (50 mg/kg t.m/dan); DBP: dibutil ftalat (50 mg/kg t.m/dan); BPA: Bisfenol A (25 mg/kg t.m/dan); MIX: Smeša (50 mg/kg t.m/dan DEHP + 50 mg/kg t.m/dan DBP + 25 mg/kg t.m/dan BPA); CRP: C-reaktivni protein; AST: aspartat aminotransferaza, ALT: alanin aminotransferaza, ALP: alkalna fosfataza, HDL: lipoprotein visoke gustine, LDL: lipoprotein niske gustine.



Slika 7. Biohemijski parametri u serumu povezani sa funkcijom jetre nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

Svaki dijagram predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), linija unutar okvira predstavlja srednju vrednost, a ivice minimalne i maksimalne vrednosti unutar grupe. A. aktivnost ALT (U/L); B. aktivnost AST (U/L); C. De Ritis odnos (AST/ALT); D. Direktna koncentracija bilirubina (mmol/L); E. Koncentracija ukupnog bilirubina (mmol/L); F. aktivnost ALP (U/L) ((DEHP, DBP i BPA)\* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (u poređenju sa kontrolom); † $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$  (u poređenju sa MIX grupom). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*)/Neparametarski *Kruskal–Wallis* test + *Dunn* test.





Slika 8. Lipidni profil nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

Svaki dijagram predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), linija unutar okvira predstavlja srednju vrednost, a ivice predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti unutar grupe. A. Trigliceridi (mmol/L); B. holesterol (mmol/L); C. HDL (mmol/L); D. LDL (mmol/L); \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (u poređenju sa kontrolom); † $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$ , †††  $p < 0,001$  (u poređenju sa MIX grupom). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*)/Neparametarski *Kruskal–Wallis* test + *Dunn* test

#### 4.1.1.6. Nivoi hormona

Nivoi hormona izmereni u ovom istraživanju predstavljeni su u Tabeli 10. Ni u jednoj eksperimentalnoj grupi nije bilo značajne razlike u nivou T3 u poređenju sa kontrolnom. Međutim, zabeleženo je značajno smanjenje nivoa T4 u serumu grupa DBP i BPA, -30 i -24% u poređenju sa kontrolom. Suprotno zapažanje zabeleženo je u grupi MIX, u kojoj je nivo T4 u serumu bio povišen (28,5% u poređenju sa kontrolom). Značajno smanjenje odnosa T3 / T4 primećeno je samo u MIX grupi (-32% u poređenju sa kontrolom). U poređenju sa MIX grupom, u sve tri grupe koje su primale pojedinačne supstance T4 je bio znatno niži, i, shodno tome, odnos T3/T4 bio je značajno povišen u ovim grupama. Nije bilo značajne razlike u nivou T3 ni u jednoj grupi koja je primala pojedinačne supstance u poređenju sa MIX grupom.

U grupama koje su primale pojedinačne supstance nivo testosterona je bio niži nego u kontrolnoj, ali ne statistički značajno. Ipak, u MIX grupi primećeno je značajno sniženje ovog parametra u poređenju sa kontrolom. Međutim, nije bilo značajne razlike u nivou testosterona između grupa koje su primale pojedinačne supstance i MIX grupe.

Tabela 10. Nivoi hormona u serumu nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

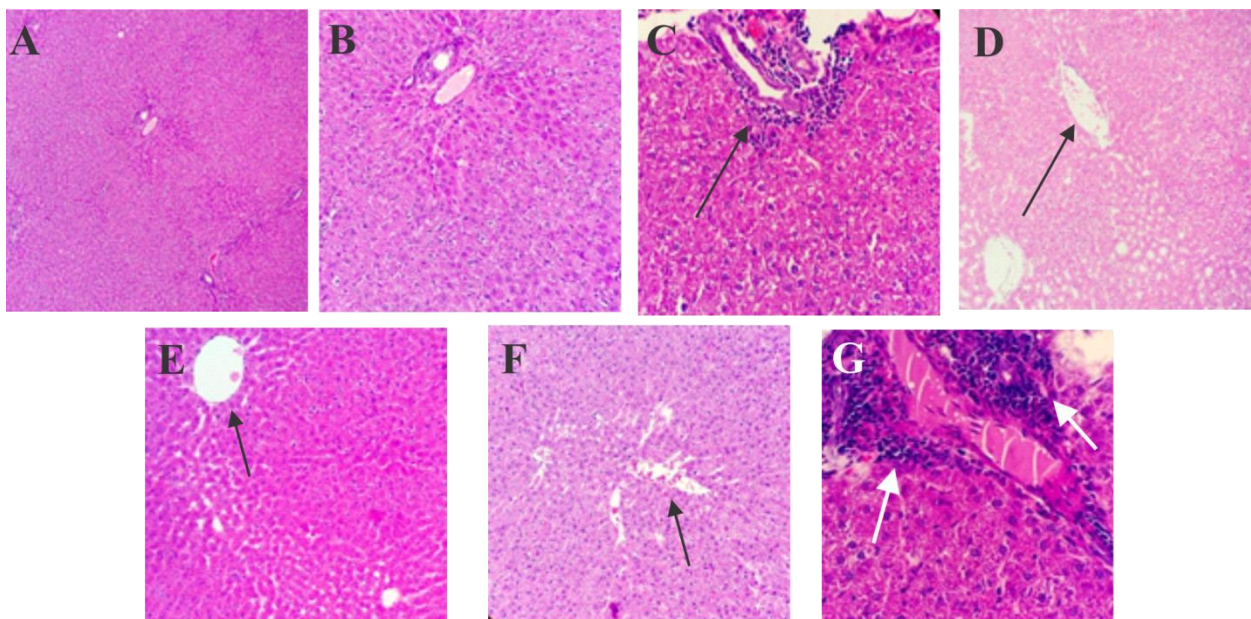
		T3 (nmol/L)	T4 (nmol/L)	T3/T4 odnos	Testosteron (ng/mL)
Kontrola		1,980 ± 0,3114	70,58 ± 12,85	0,02831 ± 0,003273	3,958 ± 0,6442
DEHP		1,940 ± 0,2793	71,70 ± 13,46 <sup>‡</sup>	0,02820 ± 0,008791 <sup>‡</sup>	3,488 ± 1,001
	% u odnosu na kontrolu	-2	1	0	-12
DBP		1,780 ± 0,1304	49,68 ± 3,975 <sup>***</sup>	0,03608 ± 0,004508 <sup>***</sup>	2,990 ± 0,6719
	% u odnosu na kontrolu	-10	-30	27	-24
BPA		1,925 ± 0,2217	53,70 ± 15,09 <sup>***</sup>	0,03585 ± 0,01310 <sup>**</sup>	3,113 ± 0,6540
	% u odnosu na kontrolu	-3	-24	27	-21
MIX		1,740 ± 0,3209	90,73 ± 10,56 <sup>**</sup>	0,01927 ± 0,001498 <sup>*</sup>	2,680 ± 0,3492 <sup>**</sup>
	% u odnosu na kontrolu	-12	28,5	-32	-32

\* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (u poređenju sa kontrolom); † $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$ , †††  $p < 0,001$  (u poređenju sa MIX grupom); Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*)/Neparametarski *Kruskal–Wallis* test + *Dunn* test. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti i standardne devijacije. (n = 6). DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat (50 mg/kg t.m/dan); DBP: dibutil ftalat (50 mg/kg t.m/dan); BPA: bisfenol A (25 mg/kg t.m/dan); MIX: 50 mg/kg t.m/dan DEHP + 50 mg/kg t.m/dan DBP + 25 mg/kg t.m/dan BPA; T3: trijodtironin; T4: tiroksin.

#### 4.1.1.7. Patohistološki nalazi

##### 4.1.1.7.1. Jetra

Mikroskopskom analizom utvrđeno je da je tkivo jetre kontrolne grupe bilo pravilne morfologije. Sve tri ispitivane supstance i njihova smeša izazvale su degenerativne promene u tkivu jetre (Slika 9). U svim tretiranim grupama primećeni su lobulusi sa blagom sinusoidnom dilatacijom, najviše oko centralne vene. Dodatne promene prisutne u DEHP (Slika 9C) i MIX grupi (Slika 9G) uključivale su blago proširenje portnih prostora usled povećanog broja inflamatornih ćelija (većina njih bili su limfociti, sa manjim brojem eozinofila), što ukazuje na portni hepatitis. Ove promene bile su prisutne u svim uzorcima MIX grupe (6/6) i u sporadičnim uzorcima DEHP (2/6) grupe.



Slika 9. Patohistološki nalazi u jetri nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

A. Kontrola: jetra, uveličanje x 4 (normalna građa – portni prostor, lobulusi, centralna vena); B. Kontrola: Jetra, uveličanje x 10 (portni prostor normalne morfologije, širine i celularnosti; lobulus normalne morfologije i celularnosti); C. DEHP: Lobulusi sa blagom sinusoidnom dilatacijom, najviše oko centralne vene. Veoma retki portni prostori su lako prošireni, usled portnog hepatitisa i povećanja količine inflamatornih ćelija (uglavnom limfocita, u manjem broju eozinofilnih granulocita) – crna strelica; D. DBP: jetra, uveličanje x10 (Lakostepena dilatacija sinusoida u lobulusima, pretežno oko centralne vene) – crna strelica; E. BPA: Jetra, uveličanje x10 (Lakostepena dilatacija sinusoida u lobulusima, pretežno oko centralne vene) – crna strelica; F. MIX: Jetra, uveličanje x10 (Lakostepena dilatacija sinusoida u lobulusima, pretežno oko centralne vene) – crna strelica; G. MIX: Jetra, uveličanje x40 (proširenje portnog prostora kao rezultat portnog hepatitisa i porast količine inflamatornih ćelija (uglavnom limfocita, u manjem broju eozinofilnih granulocita) – crna strelica

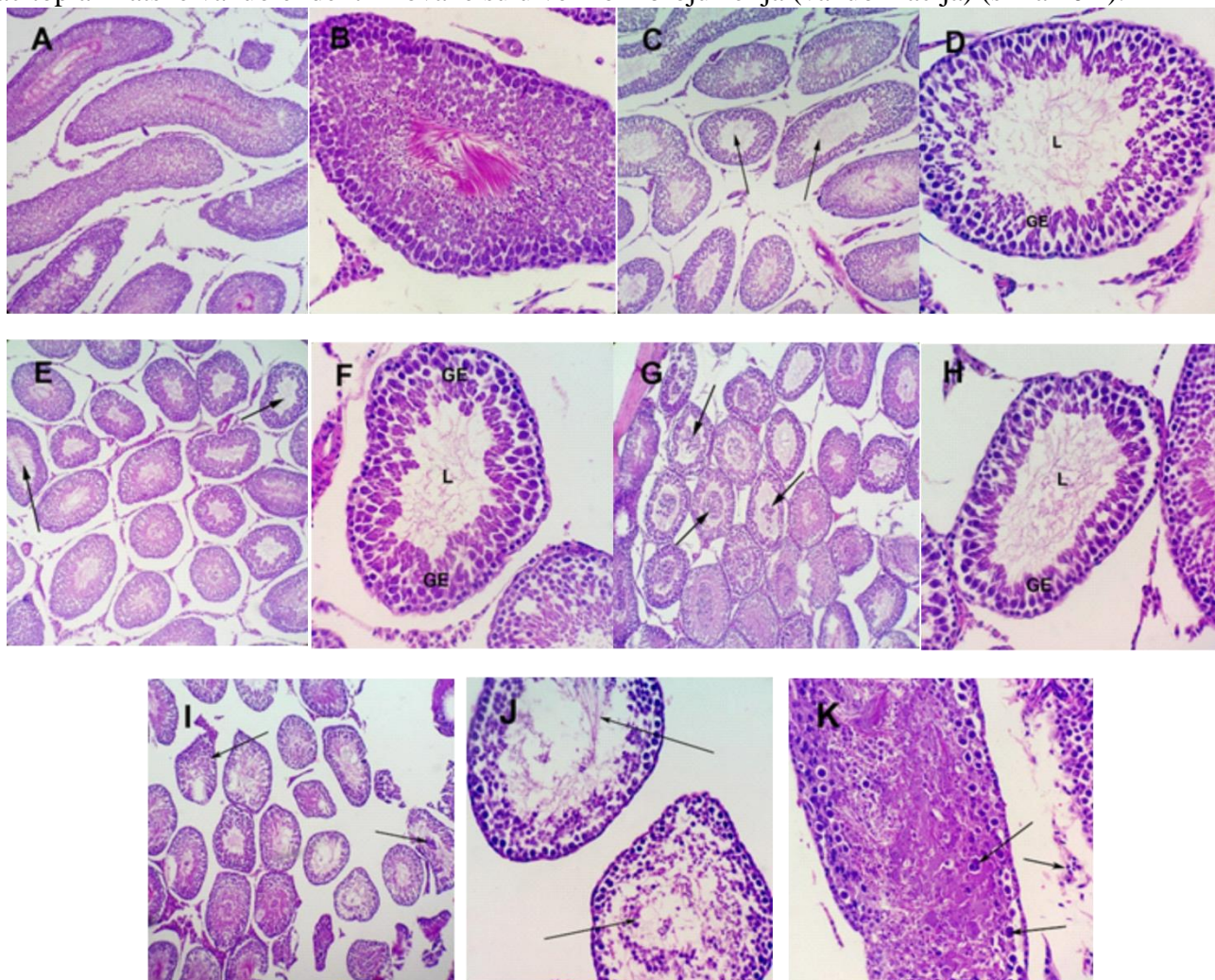
DBP: dibutil ftalat (50 mg/kg t.m); DEHP: bis (2-etilheksil) ftalat (50 mg/kg t.m); BPA: bisfenol A (25 mg/kg t.m); MIX: Smeša (50 mg/kg t.m. DEHP + 50 mg/kg t.t. DBP + 25 mg/kg t.m. BPA).

##### 4.1.1.7.2. Testisi

Mikroskopskom analizom utvrđeno je da je tkivo testisa kontrolne grupe bilo pravilne morfologije. Semeni tubuli bili su uobičajene veličine i oblika. Očuvan je kontinuitet spermatogeneze i grupe Lajdigovih ćelija različitih oblika (okrugle, ovalne, itd) bile su prisutne u intersticijskom prostoru zajedno sa krvnim sudovima (Slika 10A i 10B). U nekim, ali ne svim uzorcima DBP grupe (33,33%), u pojedinim fokusima tkiva testisa, seminiferi tubuli su bili lako atrofični i uočava se smanjena debljina germinativnog epitela, odnosno narušen kontinuitet spermatogeneze, kao i gubitak spermatida, uz blagu dilataciju tubularnog lumena (Slika 10C i 10D). Ove promene su uočene u nekim, ali ne i svim uzorcima BPA (Slika 10E i 10F) (33,33%) i DEHP

grupe (Slika 10G i 10H) (50%). U nekim uzorcima DEHP grupe, deskvamirane ćelije germinativnog epitela (eksfolijacije) su uočene u lumenu malog broja tubula (Slika 10G) (33,33% uzoraka).

U svim uzorcima MIX grupe, u tkivu testisa primećena je blaga atrofija seminiferanih tubula. Debljina germinativnog epitela (tj. poremećen kontinuitet spermatogeneze) u smislu redukcije do potpunog gubitka spermataida zabeležen je u svim uzorcima, uz dilataciju tubularnog lumena (Slika 10I). Deskvamirane ćelije germinativnog epitela (eksfolijacija) takođe su se mogle videti u lumenu tubula (Slika 10I i 10J). U pojedinim uzorcima konstatovan je veći broj uvećanih ćelija (66,66%), u kojima su se mogla uočiti hiperhromatska jezgra, kao i sporadični multinuklearni oblici ćelija; intracitoplazmatske vakuole identifikovane su u velikom broju ćelija (vakuolizacija) (slika 10K).



Slika 10. Patohistološki nalazi u testisima nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

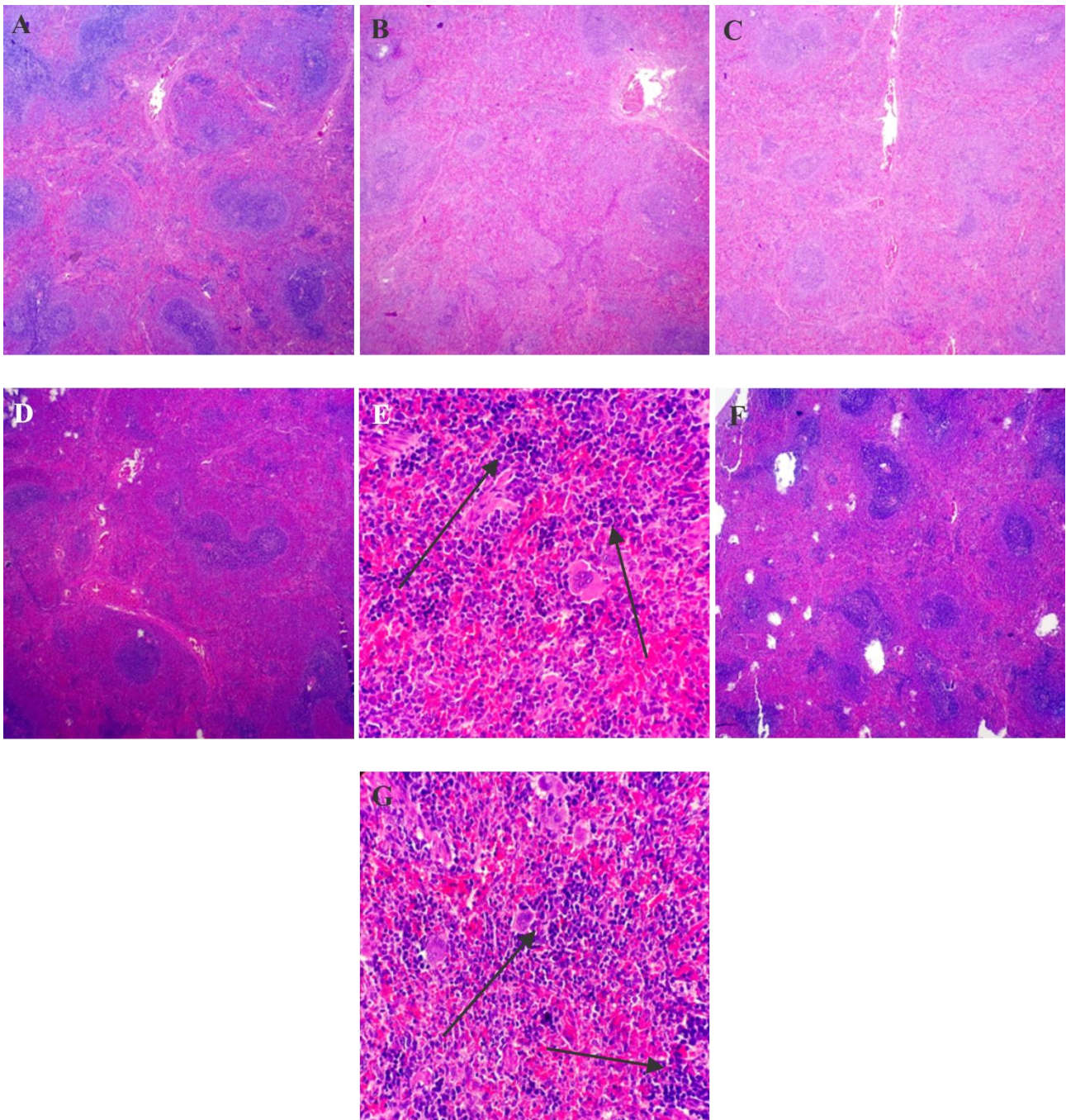
A. Kontrolna grupa: testisi, uveličanje x10: uzdužno i poprečno presečene seminiferani tubuli, uobičajene veličine i oblika, obloženi germinativnim epitelom; B. Kontrolna grupa: testisi, uveličanje x40: seminiferani tubul, uobičajene veličine i oblika, obložen germinativnim epitelom i očuvan kontinuitet spermatogeneze; Grupe Lajdigovih ćelija i pojedinačnih kapilara u intersticijumu; C. DBP grupa: testis, uveličanje x10: seminiferani tubuli pokazuju znake blage atrofije, smanjenje debljine germinativnog epitela i blago proširenje lumena; D. DBP grupa: testis, uveličanje x40: lako atrofični seminiferani tubul, prošireni lumen i smanjena debljina germinativnog epitela (gubitak spermataida); E. BPA grupa: testis, uveličanje x10: pojedinačni seminiferalni tubuli pokazuju znake blage atrofije, smanjenje debljine germinativnog epitela i blago proširenje lumena; F. BPA grupa: testis, uveličanje x40: blago atrofični seminiferani tubul (centar slike), prošireni lumen i smanjena debljina germinativnog epitela (značajno smanjen broj spermatozoida); G. DEHP grupa: testis, uveličanje x10: pojedinačni seminiferani tubuli pokazuju znake blage atrofije, smanjenje debljine germinativnog epitela i blago proširenje lumena; u lumenu pojedinačnih tubula nalaze se deskvamirane ćelije germinativnog epitela (ljuštenje); H. DEHP grupa: testis, uveličanje x40: blago atrofični seminiferani tubul (centar slike), prošireni lumen i smanjena debljina germinativnog epitela (gubitak spermataida); I. MIX grupa: testis, uveličanje x10:



pojedinačni seminiferi tubuli pokazuju znake blage atrofije, smanjenje debljine germinativnog epitela i blago proširenje lumena; u lumenu pojedinačnih tubula nalaze se deskvamirane ćelije germinativnog epitela; J. MIX grupa: testis, uveličanje x40: atrofični seminiferi tubuli, prošireni lumen i smanjena debljina germinativnog epitela (gubitak spermatida); primećuje se deskvacija epitelnih germinativnih ćelija; K. MIX grupa: testis, uveličanje x40: uzdužno presečen seminiferi tubul, u kome se uočava eksfolijacija ćelija zametnog epitela u tubularni lumen; vidi se veliki broj ćelija velikog, hiperhromatskog jezgra, kao i jedan višejedarni ćelijski oblik; intracitoplazmatske vakuole se primećuju u velikom broju ćelija (vakuolizacija); L. lumen; GE - germinalni epitel; DBP: dibutil ftalat (50 mg/kg t.m); DEHP: bis (2-etilheksil) ftalat (50 mg/kg t.m); BPA: bisfenol A (25 mg/kg t.m); MEŠA: Smeša (50 mg/kg t.m. DEHP + 50 mg/kg t.t. DBP + 25 mg/kg t.m. BPA).

#### 4.1.1.7.3. Slezina

U uzorcima tkiva slezine, u kontrolnoj grupi nisu uočene patohistološke promene (Slika 11A), dok su se promene u beloju pulpi javile u svim tretiranim grupama (Slika 11B, C, D, F). Promene u crvenoj pulpi javile su se u DEHP (Slika 11E), ali ne i u DBP i BPA grupi. Uočena je lako povišena ekstramedularna hematopoeza (prvenstveno eritroidne i mijeloidne linija) u crvenoj pulpi DEHP i MIX grupe (Slika 11E i 11G). Takođe, u beloju pulpi primećeno je smanjenje veličine periarterijskog limfnog omotača (PALS). U kontrolnoj, kao i u svim tretiranim grupama folikuli sa germinativnim centrima bili su uglavnom uobičajenog broja.



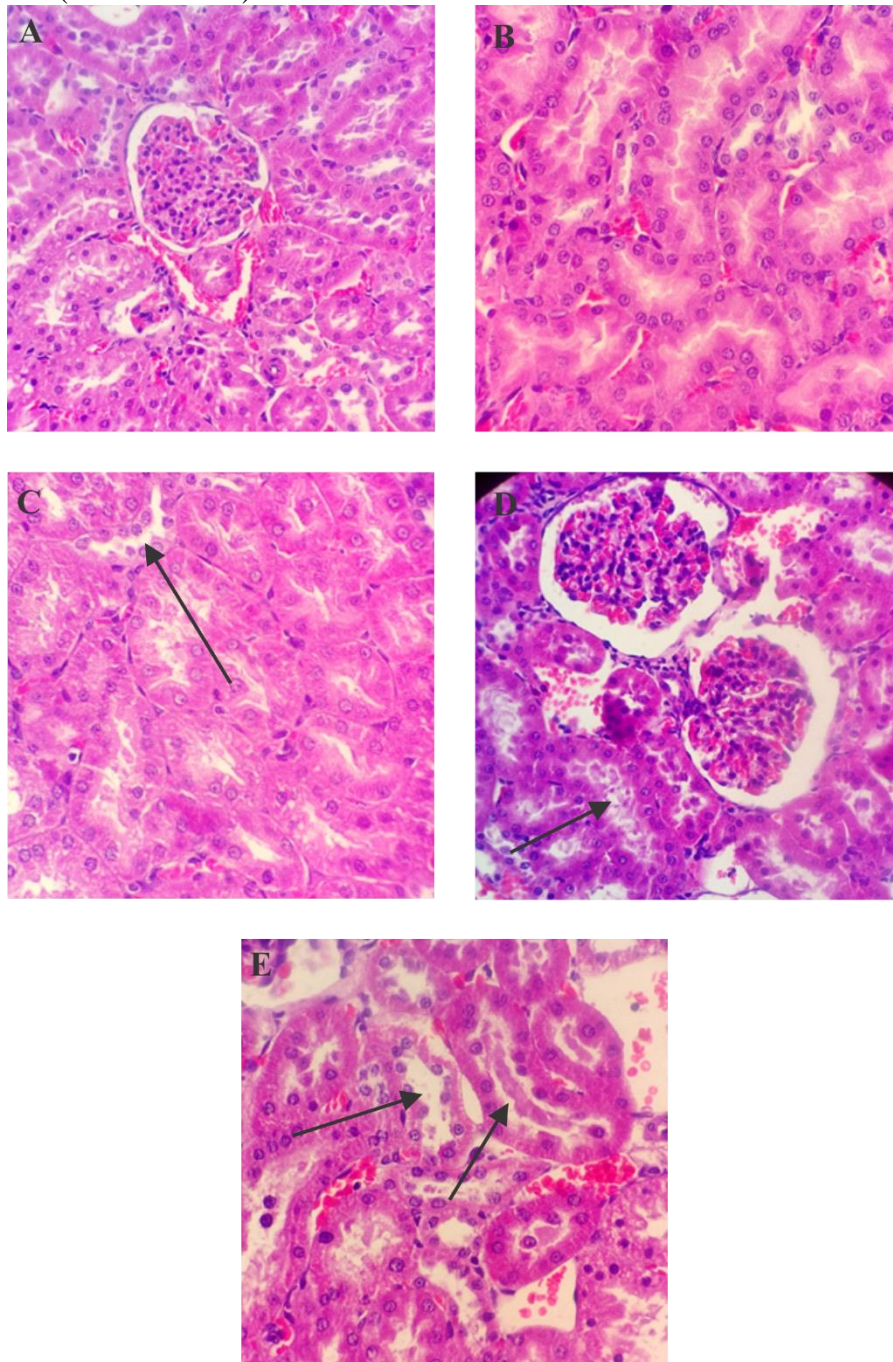
Slika 11. Patohistološki nalazi u slezini nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

A. Kontrolna grupa slezina, uveličanje x4; B. DBP slezina, uveličanje x4: redukcija elemenata bele pulpe; C. BPA slezina, uveličanje x4: redukcija elemenata bele pulpe; D. DEHP slezina, uveličanje x4: vrlo laka redukcija elemenata bele pulpe; E. DEHP slezina, uveličanje x40: crvena pulpa – povećan broj ćelija eritroidne i mijeloidne loze ekstramedularne hematopoeze; F. MIX slezina, uveličanje x4: vrlo laka redukcija elemenata bele pulpe; G. MIX slezina, uveličanje x40: crvena pulpa – povećan broj ćelija eritroidne i mijeloidne loze ekstramedularne hematopoeze.

#### 4.1.1.7.4. Bubrezi

Značajne morfološke promene u sabirnim kanalićima medule i njenom intersticijumu nisu uočene ni u kontrolnoj, niti u tretiranim grupama. U DBP i BPA grupama nisu uočena bitna morfološka odstupanja u građi korteksa u odnosu na kontrolnu grupu. U DEHP grupi, pak, u korteksu je uočen fokalni gubitak četkastog pokrova tubulocita (pokrovnog epitela bubrežnih

tubula) (Slika 12C), dok je u grupi koja je primala smešu toksičnih supstanci dodatno primećena i laka dilatacija tubula (Slika 12D i E).



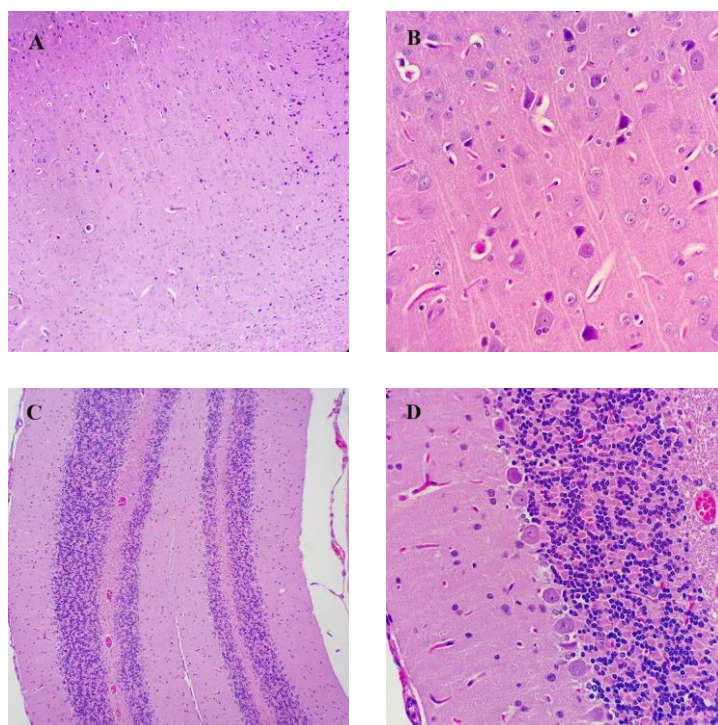
Slika 12. Patohistološki nalazi u bubrezima nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

A: kontrola bubreg, uveličanje x20: korteks: glomerul, sa aferentnom arteriolom i bubrežni tubuli; B: kontrola bubreg, uveličanje x60: korteks: tubuli i intersticijum; C: DEHP bubreg, uveličanje x60: korteks – fokalni gubitak četkastog pokrova tubulocita; D: MIX bubreg, uveličanje x20: korteks: glomeruli i intersticijum su regularne morfologije, dok su pojedini tubuli lako dilatirani; E: MIX bubreg, uveličanje x60: korteks – fokalni gubitak četkastog pokrova tubulocita, sa lakostepenom dilatacijom tubula.

#### 4.1.1.7.5. Mozak

Ispitivanje svetlosnim mikroskopom je pokazalo da ni u jednom uzorku svih tretiranih grupa nisu uočene značajne morfološke razlike u strukturi moždane kore i malog mozga u poređenju sa kontrolom. Mozak životinja u svim grupama imao je karakterističan izgled normalnog cerebralnog korteksa (Slika 13A), neurona moždane kore (Slika 13B), malog korteksa (Slika 13C) i laminarne

arhitekture malog mozga, uključujući molekularni sloj, sloj Purkinjeovih ćelija, zrnasti sloj i bela materija (Slika 13D).



Slika 13. Patohistološki nalazi u mozgu nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

Nema značajnih morfoloških razlika u uzorcima svih tretiranih grupa. A. Cerebralni korteks: laminarna arhitektura; Magnification x10; B. Kora velikog mozga: neuroni moždane kore; Uveličanje: x40; C. Mali mozak: laminarna arhitektura malog korteksa; Uveličanje x10; D. Mali mozak: laminarna arhitektura malog korteksa - molekularni sloj, sloj Purkinjeove ćelije, granularni sloj; bela materija; Uveličanje x40.

#### 4.1.1.8. Parametri oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite

Parametri oksidativnog stresa izmereni u plazmi i homogenatima tkiva testisa, jetre, bubrega, pankreasa, slezine, mozga, srca, pluća i timusa pacova nakon subakutne izloženosti DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši predstavljeni su u Tabeli 11.

Od parametara izmerenih u plazmi, značajne promene uočene su u slučaju TOS, SOD i MDA. Značajno sniženje aktivnosti SOD zapaženo je u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom, DBP i BPA grupom. Povećanje MDA uočeno je kako u DEHP, tako i u MIX grupi. Međutim, ova promena je bila izraženija u MIX grupi ( $p < 0,01$ ) u poređenju sa DEHP ( $p < 0,05$ ). Značajan porast nivoa TOS mogao se primetiti samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom, dok, u slučaju SH grupa i  $O_2^{\cdot-}$  nije uočena razlika između tretiranih i kontrolne grupe, kao i između tretiranih grupa.

U homogenatu tkiva testisa zabeleženo je značajno sniženje aktivnosti SOD u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, kao i u poređenju sa svim grupama tretiranim pojedinačnim supstancama. U skladu sa tim, značajno povećanje  $O_2^{\cdot-}$  uočeno je u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom ( $p < 0,001$ ), kao i sa svim grupama tretiranim pojedinačnim supstancama. Takođe, aktivnost SOD bila je blago snižena u DEHP grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,05$ ), iako uočena promena nije bila toliko izražena kao u MIX grupi ( $p < 0,001$ ). Slično tome, primećen je značajan porast TOS u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom grupom i grupama tretiranim pojedinačnim supstancama. Takođe, ovaj parametar bio blago povišen u BPA i DEHP grupama u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,05$ ), ali ne u istoj meri kao u MIX grupi ( $p < 0,001$ ). Do smanjenja TAS došlo je u MIX grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,001$ ) i grupama tretiranim pojedinačnim supstancama, dok je blago sniženje u poređenju sa kontrolom zabeleženo samo u DEHP grupi ( $p <$

0,05), a ne i kod BPA i DBP grupe. Stepenn oksidativnog stresa u homogenatima tkiva testisa izračunat je kao odnos između TOS i TAS (OSI), koji je u MIX grupi pokazao trend rasta nakon subakutne izloženosti smeši toksičnih supstanci u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,01$ ), ali i u poređenju sa DBP grupom ( $p < 0,05$ ). U slučaju SH grupa, značajno sniženje primećeno je samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,01$ ), što je bio slučaj i sa MDA, značajno povišenim samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolom ( $p > 0,01$ ). U slučaju AOPP nisu zabeležene statistički značajne promene ni u jednoj od tretiranih grupa u poređenju sa kontrolom.

U homogenatu tkiva jetre statistički značajne promene zabeležene su samo u slučaju TOS i koncentracije MDA. Uočen je porast TOS u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom grupom, kao i u poređenju sa BPA grupom. Takođe, uočen je porast MDA u MIX grupi u poređenju kako sa kontrolnom, tako i sa DBP i BPA grupama. Porast MDA uočen je i u DEHP grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,01$ ), ali nije bio podjednako izražen kao u MIX grupi ( $p < 0,001$ ).

U homogenatu tkiva bubrega, uočene su promene jedino u nivou MDA. Slično kao u slučaju jetre, promene ovog parametra uočene su u DEHP i MIX grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Međutim, porast MDA bio je izraženiji u MIX grupi ( $p < 0,001$ ) u poređenju sa DEHP grupom ( $p < 0,01$ ). Takođe, iako ne statistički značajne, određene promene uočene su u slučaju TOS,  $O_2^-$ , SOD i AOPP parametara. TOS i  $O_2^-$  su bili viši u MIX grupi u poređenju sa ostalim tretiranim grupama i kontrolom. S druge strane, iako je AOPP bio viši u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolom, ovaj parametar je bio najviši u DEHP grupi.

Značajan porast TOS mogao je da se primeti u samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,01$ ) u homogenatu tkiva pankreasa, kao i smanjenje nivoa SOD i SH grupa. Značajan porast nivoa MDA primećen je u DBP, BPA i MIX grupama u poređenju sa kontrolom. Navedena promena bila je izraženija u DBP ( $p < 0,01$ ) i MIX grupama ( $p < 0,01$ ) nego u BPA grupi ( $p < 0,05$ ) u poređenju sa kontrolom. Nije bilo značajnih promena u  $O_2^-$  ni u jednoj od tretiranih grupa u poređenju sa kontrolom. Takođe, nije bilo značajnih promena ni u jednom od ispitivanih parametara između grupe MIX i grupa pojedinačnih supstanci.

U homogenatima tkiva slezine zabeležen je porast MDA i SH grupa jedino u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom. Iako ne statistički značajan, takođe je uočen i porast SOD u MIX grupi u poređenju sa ostalim tretiranim grupama i kontrolnom.

U homogenatima tkiva mozga i srca nije zabeležena statistički značajna razlika ni u jednom od ispitivanih parametara.

U homogenatima tkiva pluća uočeno je značajno sniženje aktivnosti SOD u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom, kao i u poređenju sa DBP i BPA grupama. Takođe, sniženje aktivnosti SOD javilo se i u DEHP grupi ( $p < 0,05$ ), ali nije bilo toliko izraženo kao u MIX grupi ( $p < 0,01$ ). Slična promena je zabeležena i u koncentraciji AOPP, gde je značajan rast koncentracije primećen u MIX ( $p < 0,01$ ) grupi i u DEHP grupi ( $p < 0,05$ ).

Povišenje TOS zabeleženo je samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolom, kao i sa DEHP grupom u homogenatu tkiva timusa nakon subakutne izloženosti ispitivanim toksičnim supstancama. Sniženje TAS primećeno je kako kod grupa tretiranim DBP i BPA ( $p < 0,05$ ), tako i kod grupe tretiranom smešom toksičnih supstanci ( $p < 0,01$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom. U slučaju OSI, povišena vrednost uočena je u slučaju DBP i MIX grupe u poređenju sa kontrolom, prilikom čega je ova promena bila izraženija u grupi koja je primala ispitivanu smešu toksičnih supstanci. Povišenje koncentracije  $O_2^-$  primećeno je samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolom.

Tabela 11. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi i tkivima nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

Uzorak	Parametar		Kontrola	DEHP	DBP	BPA	MIX	
Plazma <sup>a</sup>	TOS (μmol/L)	Srednja vrednost	20,31	21,99	19,74 <sup>†</sup>	21,84	24,58*	
		SD	2,289	3,515	4,825	2,577	3,676	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μg/min/L)	Srednja vrednost	114,3	116,6	114,8	119,5	126,8	
		SD	10,67	12,24	6,979	9,147	13,33	
	SOD (U/L)	Srednja vrednost	143,4	139,5	144,2 <sup>†</sup>	144,6 <sup>†</sup>	130,8*	
		SD	3,209	6,921	4,021	4,980	16,01	
	MDA (μmol/L)	Medijana	2,519	3,370*	2,741	3,093	3,889**	
		Opseg	2,259 - 2,519	2,870 - 3,370	2,611 - 2,741	2,194 - 3,093	3,370 - 3,889	
	SH grupe (mmol/L)	Srednja vrednost	0,1842	0,1582	0,1749	0,1539	0,1441	
		SD	0,04895	0,02681	0,04125	0,01142	0,02646	
Testis	TAS (μmol/g proteina)	Srednja vrednost	159,3	137,0* <sup>††</sup>	155,0 <sup>†††</sup>	156,2 <sup>†††</sup>	99,85***	
		SD	20,84	12,72	18,32	20,18	11,68	
	TOS (μmol/g proteina)	Srednja vrednost	0,8973	1,321* <sup>†</sup>	1,128 <sup>††</sup>	1,275* <sup>†</sup>	1,746***	
		SD	0,1448	0,1933	0,4113	0,4242	0,1714	
	OSI indeks	Medijana	0,005782	0,009864	0,007593 <sup>†</sup>	0,009397	0,01925**	
		Opseg	0,004609 - 0,005782	0,005045 - 0,009864	0,004607 - 0,007593	0,008079 - 0,009397	0,01421 - 0,01925	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μg/min/g proteina)	Srednja vrednost	36,98	41,09 <sup>†</sup>	41,87 <sup>†</sup>	38,86 <sup>†</sup>	49,09***	
		SD	3,849	5,925	3,451	3,751	6,994	
	SOD (U/g proteina)	Srednja vrednost	24,64	22,15* <sup>†</sup>	22,58 <sup>†</sup>	22,57 <sup>††</sup>	19,38***	
		SD	1,212	1,253	1,839	2,493	2,271	
	AOPP (μmol/g proteina)	Srednja vrednost	12,20	12,44	12,91	13,24	12,97	
		SD	1,303	1,508	1,356	1,003	1,520	
	MDA (μmol/g proteina)	Medijana	0,2053	0,2593	0,2182	0,2479 <sup>†</sup>	0,3787**	
		Opseg	0,1948 - 0,2707	0,2105 - 0,2915	0,1901 - 0,3031	0,1996 - 0,2748	0,3601 - 0,3933	
	SH grupe (mmol/g proteina)	Srednja vrednost	0,08603	0,07841	0,08149	0,08136 <sup>†</sup>	0,06991**	
		SD	0,008789	0,007479	0,01301	0,008887	0,005525	
	Jetra	TAS (μmol/g proteina)	Srednja vrednost	46,68	57,49	43,24	52,84	40,39
			SD	16,02	20,13	14,10	11,38	12,95
		TOS (μmol/g proteina)	Srednja vrednost	2,488	3,267	2,728	2,411 <sup>†</sup>	3,939*
			SD	0,2893	1,252	0,7511	0,8490	1,179
OSI indeks		Medijana	0,034	0,063	0,066	0,045	0,097	
		Opseg	0,037 - 0,056	0,032 - 0,101	0,046 - 0,084	0,032 - 0,061	0,064 - 0,180	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μg/min/g proteina)		Srednja vrednost	34,88	37,79	35,20	34,28	34,91	
		SD	3,025	3,601	5,279	2,460	3,496	
SOD (U/g proteina)		Medijana	10,85	12,35	10,41	10,55	10,01	
		Opseg	9,807 - 11,83	3,874 - 12,67	9,758 - 11,43	6,150 - 11,02	7,691 - 10,77	
MDA (μmol/g proteina)		Srednja vrednost	0,1916	0,2450**	0,2054 <sup>††</sup>	0,1788 <sup>†††</sup>	0,2608***	
		SD	0,02350	0,03025	0,04269	0,01547	0,02933	
SH grupe (mmol/g proteina)		Medijana	0,07132	0,08418	0,06818	0,07229	0,06573	
		Opseg	0,06476 - 0,1025	0,07394 - 0,08687	0,06697 - 0,07199	0,05759 - 0,08220	0,04491 - 0,07032	
Bubreg <sup>a</sup>	TOS (μmol/g proteina)	Medijana	3,65	3,90	4,05	3,77	4,65	
		Opseg	3,39 - 4,40	2,58 - 5,55	3,43 - 5,47	3,19 - 6,51	3,09 - 5,59	
	SOD (U/g proteina)	Medijana	22,47	18,85	18,91	21,13	18,42	
		Opseg	5,72	2,35	2,82	6,13	3,29	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μg/min/g proteina)	Medijana	28,48	27,75	29,38	29,85	30,28	
		Opseg	24,45 -	22,61 -	26,68 -	29,14 -	25,98 -	

	MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	32,59 0,64	35,47 1,24*	32,29 1,05 <sup>†</sup>	30,26 0,84	37,17 1,37**	
		SD	0,19	0,68	0,28	0,30	0,24	
	SH grupe (mmol/g proteina)	Srednja vrednost	0,19	0,20	0,18	0,22	0,17	
		SD	0,06	0,11	0,04	0,07	0,06	
	AOPP ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Medijana	5,25	8,03	5,70	5,82	6,36	
		Opseg	4,20 - 5,82	5,72 - 8,55	4,65 - 8,18	5,43 - 8,22	6,19 - 7,75	
	Pankreas <sup>a</sup>	TOS ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	1,436	2,170	1,906	2,261	3,004***
			SD	0,6239	0,5079	0,5779	0,6097	0,7061
SOD (U/g proteina)		Medijana	14,18	13,63	12,42	12,54	11,64**	
		Opseg	12,72 - 14,87	13,43 - 14,08	10,66 - 12,59	11,43 - 13,88	11,15 - 12,17	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/min/g}$ proteina)		Srednja vrednost	31,89	29,41	37,40	32,29	37,74	
		SD	10,38	9,553	7,125	4,354	9,542	
MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)		Srednja vrednost	0,1657	0,2020	0,2356**	0,2082*	0,2373**	
		SD	0,02453	0,03479	0,04888	0,03086	0,03453	
SH grupe (mmol/g proteina)		Srednja vrednost	0,06488	0,04962	0,05313	0,05322	0,04305*	
	SD	0,02060	0,01737	0,008146	0,01015	0,01479		
Slezina <sup>a</sup>	TOS ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	8,161	8,260	8,444	7,897	8,083	
		SD	0,8327	1,269	0,4569	0,6982	0,8924	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/min/g}$ proteina)	Medijana	20,50	20,21	19,98	20,26	24,71	
		Opseg	4,770	3,956	0,9139	2,829	3,875	
	SOD (U/g proteina)	Medijana	17,41	16,83	13,83	13,13	18,31	
		Opseg	14,48 - 17,91	12,03 - 18,58	11,59 - 14,78	11,69 - 15,27	15,85 - 25,06	
	MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Medijana	0,7702	0,8341	0,9105	1,023	1,305*	
		Srednja vrednost	0,1673	0,1664	0,05938	0,1302	0,3663	
	SH grupe (mmol/g proteina)	Medijana	1,117	1,209	1,320	1,483	1,893*	
Opseg		0,2426	0,2413	0,08611	0,1887	0,5312		
AOPP ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	5,450	5,440	5,930	5,756	5,603		
	SD	1,754	0,9872	2,313	2,864	0,5393		
Mozak <sup>a</sup>	TOS ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	2,279	2,625	2,687	2,406	2,343	
		SD	0,5511	0,2858	0,4708	0,4596	0,3005	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/min/g}$ proteina)	Srednja vrednost	41,09	36,61	40,62	38,57	38,12	
		SD	7,232	1,118	2,066	2,551	1,782	
	SOD (U/g proteina)	Srednja vrednost	22,36	24,84	22,83	24,59	24,54	
		SD	3,264	2,373	2,493	2,491	2,052	
	MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	2,165	2,178	2,262	2,085	2,324	
		SD	0,4455	0,2621	0,5928	0,7025	0,5315	
	SH grupe (mmol/g proteina)	Srednja vrednost	0,2088	0,1952	0,2314	0,2117	0,1932	
SD		0,05200	0,03836	0,02454	0,04100	0,03616		
AOPP ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	12,20	13,29	14,10	13,39	13,94		
	SD	1,392	3,397	1,939	2,732	1,940		
Srce <sup>a</sup>	TOS ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	3,863	3,834	3,794	3,962	3,623	
		SD	0,4118	0,7512	0,4990	0,2269	0,5207	
	SOD (U/g proteina)	Srednja vrednost	9,667	9,512	8,618	9,140	8,934	
		SD	1,668	0,4768	1,116	0,8271	0,9344	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/min/g}$ proteina)	Srednja vrednost	13,57	13,00	13,21	13,97	13,46	
		SD	0,9924	0,7925	0,8675	1,521	1,133	
MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	0,2196	0,2146	0,2190	0,2154	0,2152		
	SD	0,02367	0,02903	0,04584	0,02141	0,03572		

	<b>SH grupe (mmol/g proteina)</b>	Srednja vrednost	0,04999	0,05392	0,05646	0,06040	0,05905	
		SD	0,008988	0,01024	0,006752	0,006268	0,01316	
	<b>AOPP (μmol/g proteina)</b>	Srednja vrednost	5,968	6,178	6,396	6,044	7,336	
		SD	1,061	0,8917	1,029	1,392	1,600	
<b>Pluća<sup>a</sup></b>	<b>TOS (μmol/g proteina)</b>	Srednja vrednost	4,89	5,03	5,25	5,24	5,35	
		SD	0,80	0,73	0,35	0,73	0,85	
	<b>SOD (U/g proteina)</b>	Srednja vrednost	21,04	17,65*	19,15 <sup>†</sup>	19,69 <sup>†</sup>	15,21**	
		SD	2,20	1,42	2,71	3,67	2,04	
	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup> (μg/min/g proteina)</b>	Srednja vrednost	22,92	23,13	25,23	24,68	25,61	
		SD	3,08	5,60	3,14	3,23	2,66	
	<b>MDA (μmol/g proteina)</b>	Srednja vrednost	0,84	0,84	1,01	1,03	1,02	
		SD	0,12	0,18	0,14	0,27	0,26	
	<b>SH grupe (mmol/g proteina)</b>	Srednja vrednost	0,18	0,21	0,17	0,21	0,18	
		SD	0,07	0,03	0,05	0,05	0,06	
	<b>AOPP (μmol/g proteina)</b>	Srednja vrednost	9,338	11,50*	10,63	9,842	11,69**	
		SD	1,58	1,26	1,55	2,10	0,81	
	<b>Timus</b>	<b>TOS (μmol/g proteina)</b>	Srednja vrednost	2,94	2,91 <sup>†</sup>	3,51	3,35	4,00*
			SD	0,76	0,78	0,45	0,51	0,76
<b>TAS (μmol/g proteina)</b>		Srednja vrednost	170,1	153,4	145,7*	143,6*	135,5**	
		SD	16,85	21,72	9,445	10,74	14,32	
<b>OSI indeks</b>		Srednja vrednost	0,016	0,020 <sup>†</sup>	0,024*	0,024	0,030**	
		SD	0,006	0,008	0,004	0,005	0,005	
<b>SOD (U/g proteina)</b>		Srednja vrednost	19,18	18,62	20,05	17,68	16,25	
		SD	0,92	2,88	1,68	5,35	3,73	
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup> (μg/min/g proteina)</b>		Srednja vrednost	21,55	23,56	23,14	24,65	25,98*	
		SD	4,34	2,15	1,95	2,98	3,71	
<b>MDA (μmol/g proteina)</b>		Medijana	0,59	0,72	0,53	0,69	0,82	
		Opseg	0,52 - 0,78	0,69 - 0,86	0,41 - 0,75	0,48 - 1,04	0,68 - 1,02	
<b>SH grupe (mmol/g proteina)</b>		Medijana	0,086	0,076	0,069	0,060	0,052	
		Opseg	0,066 - 0,095	0,060 - 0,082	0,057 - 0,078	0,056 - 0,076	0,043 - 0,057	
<b>AOPP (μmol/g proteina)</b>	Srednja vrednost	16,44	15,74	15,98	17,23	18,13		
	SD	1,95	1,61	2,12	3,06	3,34		

TAS: totalni antioksidativni status, TOS: totalni oksidativni status, O<sub>2</sub><sup>-</sup>: superoksidni anjon radikal, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutase, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *Advanced oxidation protein products*), MDA: malondialdehid, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe. DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat (50 mg/kg t.m/dan); DBP: dibutil ftalat (50 mg/kg t.m/dan); BPA: bisfenol A (25 mg/kg t.m/dan); MIX: smeša (50 mg/kg t.m/dan DEHP + 50 mg/kg t.m/dan DBP + 25 mg/kg t.m/dan BPA). <sup>a</sup>U označenim uzorcima nije bilo moguće određivanje TAS i izračunavanje OSI indeksa.

#### 4.1.1.9. Bioelementi

Bioelementi (Cu, Zn i Fe) mereni u homogenatima tkiva jetre, bubrega, srca, pluća i timusa posle oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA i njihovoj smeši tokom 28 dana prikazani su u Tabeli 12.

Od izmerenih bioelemenata u tkivu jetre, značajna razlika je uočena u slučaju Zn i Fe. Dok je Zn bio smanjen i u DEHP i u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom, ova promena je bila izraženija u MIX grupi. U slučaju nivoa Fe, ovaj parametar je bio značajno povišen samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom.

Nije bilo značajnih promena u tkivu bubrega ni za jedan od ispitivanih bioelemenata. Međutim, može se primetiti da je koncentracija Cu bila nešto niža u MIX grupi u poređenju sa svim ostalim grupama. Pored toga, koncentracija Cu je takođe bila niža u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolom. Slično, koncentracija Fe je bila viša u svim tretiranim grupama u poređenju



sa kontrolom. Međutim, ovaj parametar je bio nešto viši u DEHP grupi u poređenju sa MIX grupom.

U homogenatima tkiva srca nije primećena nijedna statistički značajna promena u tretiranim grupama u odnosu na kontrolnu. Iako ne statistički značajno, primećeno je da je Cu niži u tretiranim grupama u odnosu na kontrolnu. Takođe, Zn je bio nešto viši u svim tretiranim grupama u odnosu na kontrolnu. Koncentracija Fe bila je nešto viša u DEHP i DBP grupi u odnosu na kontrolnu i niža u BPA i MIX grupi u odnosu na kontrolnu.

Cu i Fe izmereni u tkivu pluća bili su u nivou kontrolnih vrednosti, kao i Cu u tkivu timusa. Koncentracija Zn u plućima bila je značajno snižena samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom, dok je najizraženije povišenje Zn u tkivu timusa zabeleženo u MIX grupi (u poređenju sa kontrolnom, DBP i BPA grupom). U tkivu timusa, povećanje Zn je takođe bilo prisutno u DEHP grupi, ali ne tako izraženo kao u MIX. Nakon tretmana smešom, takođe su se javile promene u nivou Fe ( $p < 0,05$ ), mada ne tako primetne kao u slučaju Zn ( $p < 0,01$ ). Međutim, promena nivoa Fe mogla se primetiti samo u MIX grupi.

Tabela 12. Bioelementi (Cu, Zn i Fe) u različitim tkivima nakon oralne izloženosti pacova DEHP, DBP, BPA ili njihovoj smeši tokom 28 dana

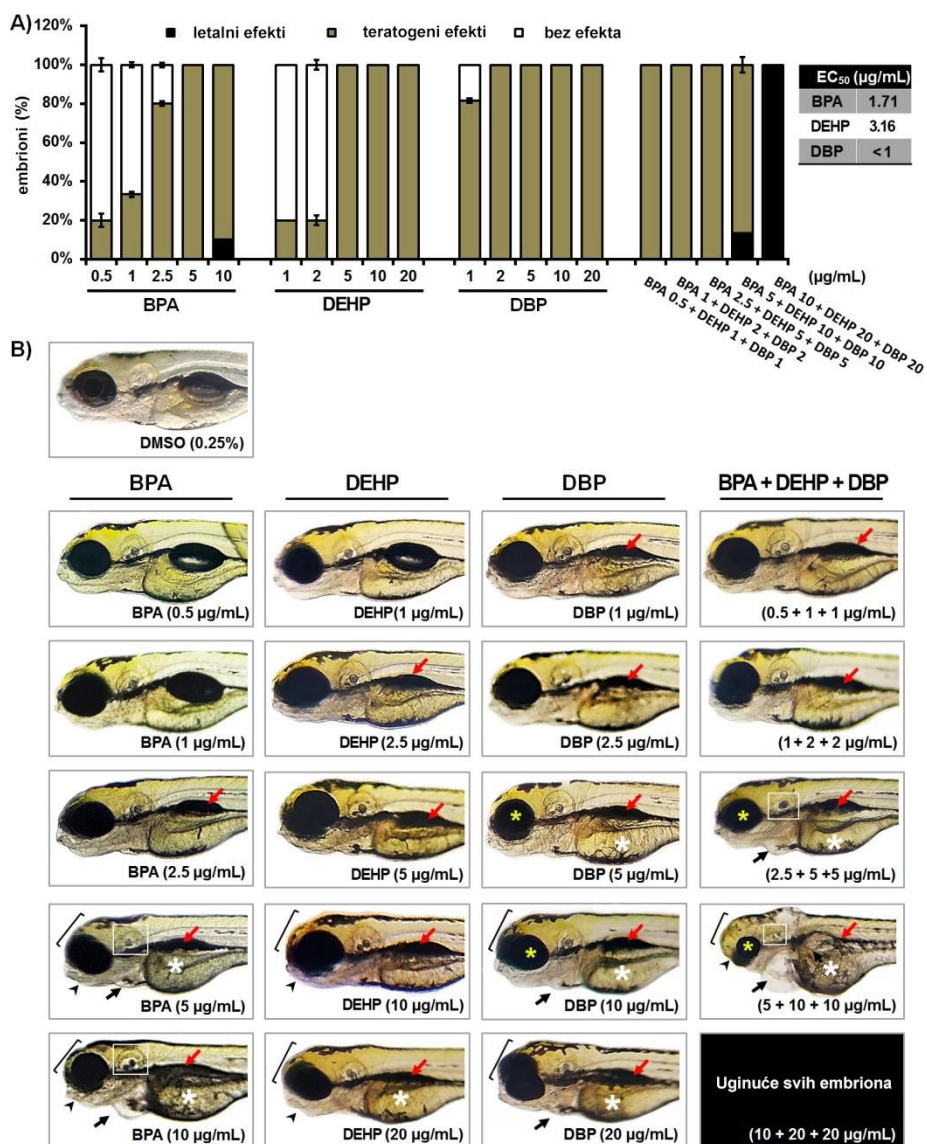
Organ	Parametar ( $\mu\text{mol/kg}$ )		Kontrola	DEHP	DBP	BPA	MIX
Jetra	Cu	Srednja vrednost	3,23	3,23	3,22	3,25	3,21
		SD	0,134	0,231	0,199	0,214	0,238
	Zn	Srednja vrednost	26,13	23,77**	25,36 <sup>†</sup>	25,27 <sup>†</sup>	23,29***
		SD	1,62	1,35	1,77	0,576	1,570
	Fe	Srednja vrednost	60,91	66,17	65,91	64,31	67,84*
		SD	6,176	9,290	4,783	2,665	5,798
Bubreg	Cu	Medijana	5,23	5,09	5,00	4,80	4,55
		Opseg	4,98 - 5,68	4,75 - 5,81	4,69 - 5,54	4,45 - 4,95	4,34 - 5,86
	Zn	Srednja vrednost	20,63	20,79	19,71	19,69	19,71
		SD	0,93	1,29	0,42	0,90	0,98
	Fe	Srednja vrednost	58,70	59,66	66,72	60,83	61,37
		SD	5,79	10,10	10,44	6,78	6,52
Srce	Cu	Srednja vrednost	4,812	4,151	4,716	4,162	4,704
		SD	0,7997	0,6303	0,4395	0,6633	0,6848
	Zn	Srednja vrednost	13,98	14,05	15,07	14,24	14,97
		SD	1,291	1,912	0,6889	0,4772	1,292
	Fe	Srednja vrednost	60,22	61,16	63,86	55,63	55,39
		SD	9,920	6,829	2,985	4,301	6,467
Pluća	Cu	Srednja vrednost	0,74	1,02	1,01	0,93	1,00
		SD	0,28	0,10	0,13	0,29	0,26
	Zn	Srednja vrednost	16,60	16,69	16,47	16,73	15,44*
		SD	1,10	1,34	1,26	0,88	0,94
	Fe	Srednja vrednost	79,33	77,60	75,35	86,25	75,63
		SD	12,20	8,34	18,02	6,35	11,41
Timus	Cu	Srednja vrednost	0,71	0,96	0,65	0,86	1,09
		SD	0,44	0,48	0,53	0,48	0,60
	Zn	Srednja vrednost	14,98	17,00*	15,55 <sup>†</sup>	15,62 <sup>†</sup>	17,45**
		SD	1,81	1,20	1,35	0,55	1,22
	Fe	Srednja vrednost	14,15	18,41	16,70	19,02	20,07*
		SD	3,76	3,83	6,82	3,86	2,86

Cu: bakar, Zn: cink, Fe: gvožđe, DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat (50 mg/kg t.m/dan); DBP: dibutil ftalat (50 mg/kg t.m/dan); BPA: bisfenol A (25 mg/kg t.m/dan); MIX: smeša (50 mg/kg t.m/dan DEHP + 50 mg/kg t.m/dan DBP + 25 mg/kg t.m/dan BPA)

#### 4.1.2. *In vivo* rezultati na modelu zebrice

##### 4.1.2.1. Letalni i efekti na rast i razvoj

Kao što je prikazano na Slici 14, sve testirane supstance ispoljile su toksičan efekat na embrionima zebrice pri svakoj primenjenoj koncentraciji. Prema utvrđenom EC<sub>50</sub>, toksični efekat DBP bio je najizraženiji, zatim BPA i DEHP. Čak i pri niskoj testiranoj koncentraciji od 1 µg/mL, DBP je ispoljio štetne efekte, sprečavajući naduvavanje plivaće bešike kod 80% tretiranih embriona, dok su BPA i DEHP izazvali isti toksični efekat pri koncentraciji od 2,5 µg/mL. Međutim, sve ispitivane supstance pri primeni u koncentracijama ≥ 5 µg/mL izazvale su teratogene malformacije (deformisana glava, oči i otoliti) i pojavu znakova kardiotoksičnosti i hepatotoksičnosti, gde je BPA bio toksičniji od DEHP i DBP, što je izazvalo nekrozu žumanceta i smanjenu resorpcija pri 5 µg/mL (što ukazuje na hepatotoksičnost) i veliki perikardijalni edem pri 10 µg/mL (ukazuje na kardiotoksičnost).



Slika 14. Akutna toksičnost nakon 5-dnevnog izlaganja embriona zebrice različitim koncentracijama BPA, DEHP, DBP i njihovoj smeši (n = 90 po dozi)

A. Dozno-zavisno preživljavanje i teratogenost i B. morfologija embriona zebrice. Toksičnost svake supstance je izražena kao EC<sub>50</sub> vrednost (efikasna koncentracija koja izaziva toksični efekat kod 50% embriona). Primene supstance i njihove smeše izazvale su dozno-zavisne toksične efekte, uključujući nedostatak naduvavanja plivačke bešike (crvena strelica), perikardijalni edem (crna strelica), malformacije glave (zagrada), vilice (vrh strelice), očiju (bela zvezdica) i otoliti (kutije), kao i znaci hepatotoksičnosti (neresorbovano žumance – sa zvezdicom). Smeša

toksičnih supstanci je izazvala smrt svih embriona pri koncentracijama BPA + DEHP + DBP od 10 + 20 + 20 µg/mL. DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP: dibutil ftalat; BPA: bisfenol A; MIX: DEHP + DBP + BPA.

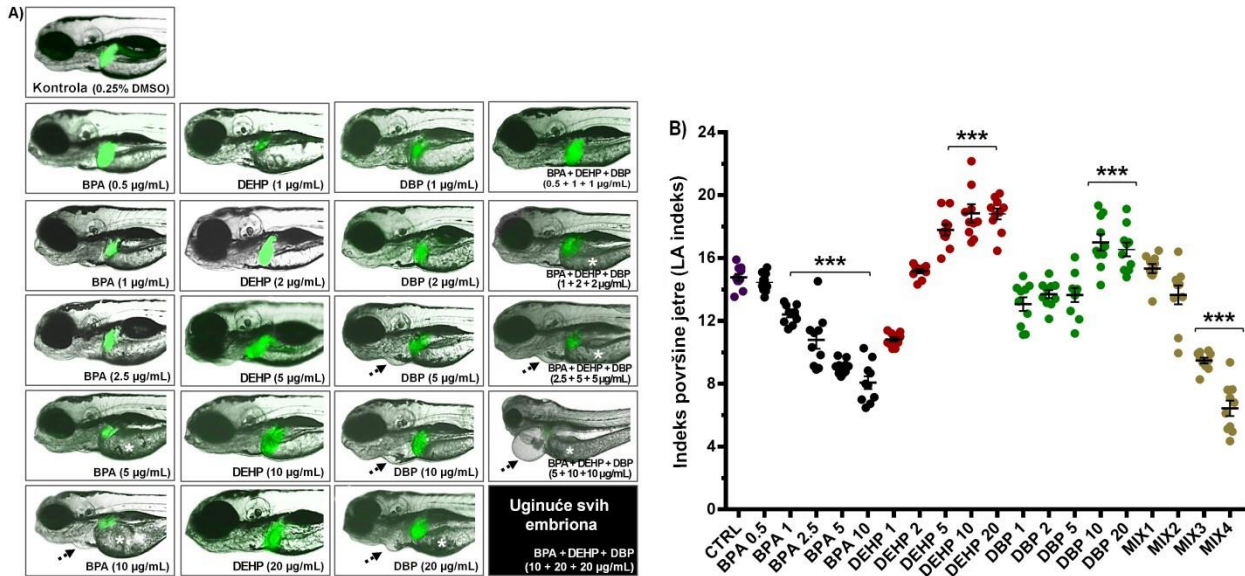
Za razliku od toksičnog dejstva DEHP, DBP i BPA pri samostalnoj primeni, smeša ove tri supstance bila je znatno toksičnija. Smeša DEHP+DBP+BPA je izazvala ozbiljnu hepatotoksičnost (neresorbovano i nekrotično žumance), kardiotoksičnost (perikardni edem, malformacija srca i usporen rad srca) i ozbiljni deformiteti tela (smanjena dužina, skolioza i deformisana glava, vilica, oči i otoliti) u kombinaciji koncentracija od 5 + 10 + 10 µg/mL. Štaviše, svi embrioni su uginuli nakon trodnevnog izlaganja smeši DEHP, DBP i BPA pri koncentracijama od 10, 20 i 20 µg/mL, redom, dok su embrioni izloženi pojedinačnim supstancama u datim koncentracijama bili živi čak i nakon pet dana tretmana (Slika 14B).

#### 4.1.2.2. Hepatotoksičnost

Transgeni Tg(-2,8fabp10a:EGFP) embrioni zebrića sa ćelijama jetre koje ekspimiraju GFP bili su izloženi različitim koncentracijama testiranih supstanci i njihovim kombinacijama. Embrioni su bili izloženi na 72 hpf pa nadalje, kada se jetra formira, vaskularizuje i počinje sa metaboličkim transformacijama apsorbiranih jedinjenja. Nakon 2-dnevnog izlaganja, embrioni su analizirani na veličinu jetre, fluorescenciju i znake nekroze, kao i indeks površine jetre (engl. *Liver area index*, LA) koji predstavljaju krajnje ishode hepatotoksičnosti.

Prema analiziranim parametrima, pogotovo LA indeksu, ustanovljeno je da BPA ima suprotan efekat od DEHP i DBP. Dok je BPA značajno smanjio veličinu i fluorescenciju jetre u zavisnosti od koncentracije u poređenju sa onim u kontrolnoj grupi, ftalati su povećali veličinu jetre, dovodeći do hepatomegalije, posebno DEHP (Slika 15). U poređenju sa kontrolnom grupom, LA indeks zebrića tretiranih BPA bio je smanjen za 16% pri niskoj koncentraciji od 1 µg/mL i za 45% pri 10 µg/mL (Tabela 13,  $p < 0,0001$  za obe). Sa druge strane, DEHP i DBP su izazvali dvostruki efekat na veličinu jetre u zavisnosti od njihove koncentracije. Nakon 2-dnevnog izlaganja, otkriveno je da DEHP i DBP smanjuju LA indekse kod embriona pri koncentracijama od 1 µg/mL (za 27%,  $p < 0,0001$ ) i 1 - 5 µg/mL (8-12%,  $p < 0,006$ ), redom. Međutim, LA indeks bio je značajno povišen pri koncentracijama DEHP  $\geq 5$  µg/mL (do 27%,  $p < 0,0001$ ) i DBP  $\geq 10$  µg/mL (12-15%,  $p < 0,0001$ ). Pored štetnog uticaja na veličinu i fluorescenciju jetre, važno je napomenuti da su BPA i DBP izazvali nekrozu žumanceta (Slika 15) i pojavu perikardijalnog edema.

S druge strane, masa hepatotoksičnog efekta kod embriona izloženih smeši DEHP/DBP/BPA bila je mnogo veća nego kod bilo koje pojedinačne supstance. Dok tretmani sa sve tri supstance u kombinaciji koncentracija 0,5 + 1 + 1 µg/mL i 1 + 2 + 2 µg/mL nisu imali uticaja na LA indeks u poređenju sa onim u kontrolnoj grupi ( $p > 0,1$ ), izloženost ispitivanoj smeši toksičnih supstanci pri višim koncentracijama značajno je smanjila i LA indeks i veličinu jetre ( $p < 0,001$ , ANOVA) (Tabela 13). Štaviše, fluorescencija jetre bila je jedva vidljiva i LA indeks je smanjen za 43% kod zebrića tretiranih sa 5 + 10 + 10 µg/mL BPA + DEHP + DBP, dok su se javili teški perikardijalni (kardiotoksičnost) i telesni edem (nefrotoksičnost). Međutim, nijedan od embriona nije preživio izlaganje smeši u koncentracijama od 10 + 20 + 20 µg/mL tokom dva dana (slika 15A). Svi ovi podaci ukazuju na jasan obrazac delovanja BPA na razvoj jetre embriona zebrića, ali na dvostruku prirodu aktivnosti ftalata. Dok je povećanje koncentracije BPA, kao i DEHP i DEBP u koncentracijama  $< 2$  µg/mL ili  $\leq 5$  µg/mL značajno smanjilo LA indeks, izloženost višoj koncentraciji ftalata je rezultirala značajnim povećanjem vrednosti LA indeksa (hepatomegalija). Imajući u vidu ovako suprotnu aktivnost BPA i ftalata na razvoj jetre, ukazuje da je efekat njihove smeše u modelu zebriće vođen BPA.



Slika 15. Hepatotoksičnost nakon izlaganja embriona zebrike Tg(-2.8fabp10a:EGFP) sa fluorescentno obeleženom jetrom (n = 10) različitim koncentracijama BPA, DEHP, DBP i njihovoj smeši u različitim koncentracijama

Hepatotoksičnost se procenjuje prema A. fluorescenciji jetre i B. indeksu površine jetre u odnosu na kontrolnu grupu (tretiranu DMSO). Indikovani su razvoj perikardijalnog edema (isprekidana strelica) i neresorbovanog žumanceta (zvezdica) nakon primenjenih tretmana. Statistička značajna razlika u indeksu površine jetre (engl. *Liver area index*, LA) između tretiranih i netretiranih grupa označena je zvezdicama (\*\*\*) p < 0,001). DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP: dibutil ftalat; BPA: bisfenol A; MIX: DEHP + DBP + BPA.

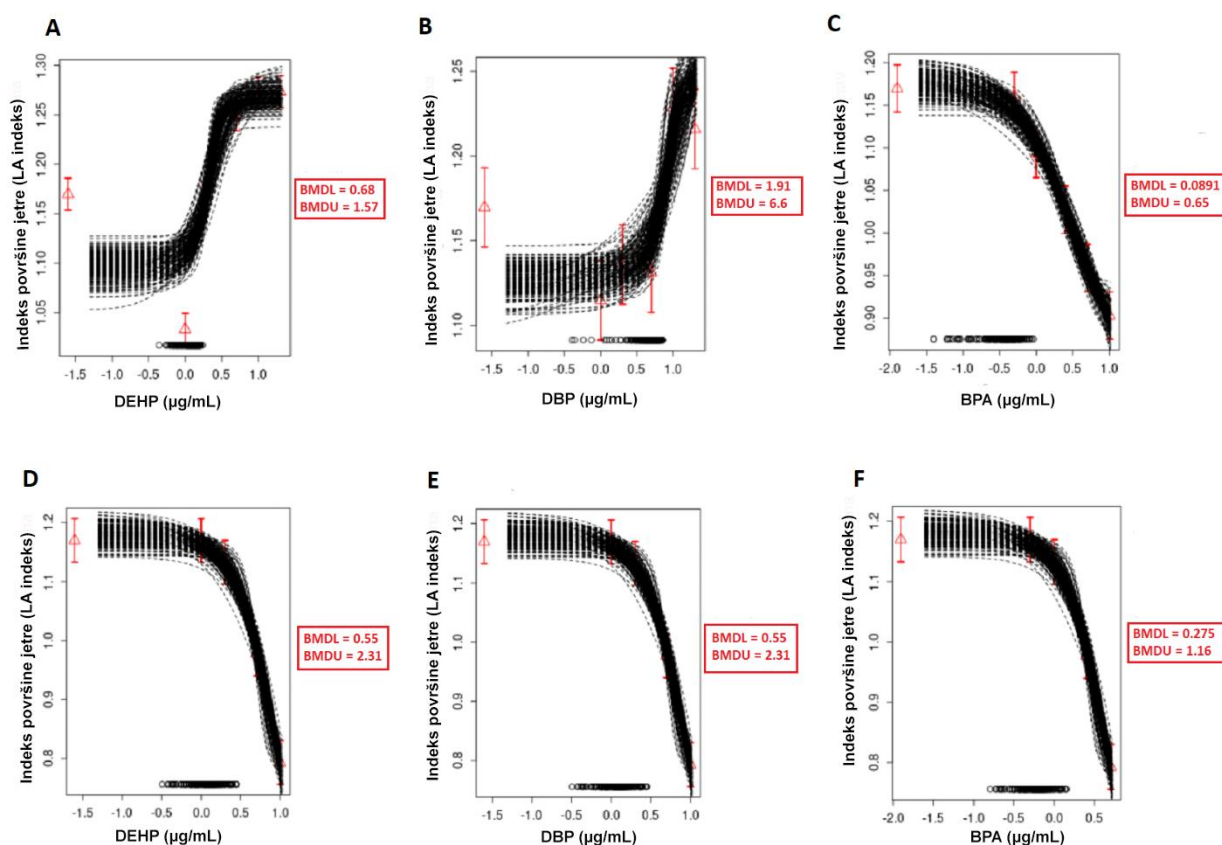
Tabela 13. Efekat DEHP, DBP i BPA i njihove smeše na razvoj jetre embriona zebrike nakon dvodnevno izlaganja procenjen prema indeksu površine jetre (engl. *Liver area index*, LA)

Tretman	LA indeks (srednja vrednost ± SD)	LA indeks (veličina i obim promene u odnosu na kontrolnu grupu)
<b>Kontrola</b>	14,8 ± 0,7	100% /
<b>DEHP 1 µg/mL</b>	10,8 ± 0,4	73% 0,7 (↓)***
<b>DEHP 2 µg/mL</b>	15,2 ± 0,4	102% 1
<b>DEHP 5 µg/mL</b>	17,8 ± 1,1	120% 1,2 (↑)***
<b>DEHP 10 µg/mL</b>	18,8 ± 1,8	127% 1,3 (↑)***
<b>DEHP 20 µg/mL</b>	18,8 ± 1,1	127% 1,3 (↑)***
<b>DBP 1 µg/mL</b>	13,1 ± 1,4	88% 0,9 (↓)***
<b>DBP 2 µg/mL</b>	13,7 ± 0,8	93% 0,9 (↓)***
<b>DBP 5 µg/mL</b>	13,6 ± 1,4	92% 0,9 (↓)***
<b>DBP 10 µg/mL</b>	17,0 ± 1,6	115% 1,2 (↑)***
<b>DBP 20 µg/mL</b>	16,5 ± 1,4	112% 1,1 (↑)***
<b>BPA 0,5 µg/mL</b>	14,5 ± 0,6	98% 1
<b>BPA 1 µg/mL</b>	12,4 ± 0,6	84% 0,8 (↓)***
<b>BPA 2,5 µg/mL</b>	10,8 ± 1,8	73% 0,7 (↓)***
<b>BPA 5 µg/mL</b>	9,1 ± 0,4	61% 0,6 (↓)***
<b>BPA 10 µg/mL</b>	8,1 ± 1,3	55% 0,5 (↓)***
<b>MIX1 (0,5 + 1 + 1 µg/mL)</b>	14,8 ± 0,9	100% 1
<b>MIX2 (1 + 2 + 2 µg/mL)</b>	13,7 ± 1,9	92% 0,9 (↓)***
<b>MIX3 (2,5 + 5 + 5 µg/mL)</b>	9,5 ± 0,6	64% 0,6 (↓)***
<b>MIX4 (5 + 10 + 10 µg/mL)</b>	6,4 ± 1,6	43% 0,4 (↓)***

DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP: dibutil ftalat; BPA: bisfenol A; MIX: DEHP + DBP + BPA.

#### 4.1.2.3. Benčmark analiza doza-odgovor

Da bi se dalje istražila hepatotoksičnost izazvana ispitivanim supstancama i njihovom smešom na embrionima zebriće u smislu odnosa doza-odgovor, BMD analiza je izvršena pomoću PROAST softvera. Ispitana je zavisnost hepatotoksičnosti (procenjena na osnovu LA indeksa) od koncentracija ispitivanih supstanci prisutnih pojedinačno ili u smeši. Dobijeni grafici (broj iteracija: 200) zasnovani na fitovanju najboljeg modela prikazani su na Slici 16. Rezultati su izraženi kao BMDL i BMDU i predstavljaju donju i gornju granicu intervala pouzdanosti od 95 procenata, redom. Trend krive je bio suprotan u slučaju oba ispitivana ftalata kada su prisutni sami u poređenju sa onim kada su prisutni u smeši sa BPA, što ukazuje na to da je BPA diktirao efekat smeše. Pored toga, BMDL za oba ftalata bio je niži u slučaju izloženosti smeši u poređenju sa pojedinačnom izloženošću, što ukazuje na to da koncentracije čak i više od 0,55  $\mu\text{g/mL}$  (i za DEHP i za DBP) mogu dovesti do 5% smanjenja LA indeksa kada su prisutni u smeši sa BPA. S druge strane, BMDL za BPA bio je veći kada je prisutan u smeši sa ftalatima (0,275  $\mu\text{g/mL}$  za razliku od 0,0891  $\mu\text{g/mL}$  kada je prisutan sam). Takođe je važno napomenuti da su svi intervali pouzdanosti bili uski (odnos BMDL i BMDU manji od 10), što ukazuje na visok nivo pouzdanosti [157], osim intervala pouzdanosti za BPA kada je prisutan sam, koji je bio nešto širi. Širina pomenutog BMDI intervala može se pripisati statističkim nesigurnostima predloženih modela [130].



Slika 16. Dozna zavisnost hepatotoksičnosti kod embriona zebriće procenjena na osnovu indeksu površine jetre u različitim scenarijima izloženosti

A. DEHP (0, 1, 2, 5, 10, 20  $\mu\text{g/mL}$ ); B. DBP (0, 1, 2, 5, 10, 20  $\mu\text{g/mL}$ ); C. BPA (0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ ); D. DEHP (0, 1, 2, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) kada je prisutan u smeši sa DBP (0, 1, 2, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) i BPA (0,5, 1, 2,5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ); E. DBP (0, 1, 2, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) kada je prisutan u smeši sa DEHP (0, 1, 2, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) i BPA (0,5, 1, 2,5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ); i F. BPA (0,5, 1, 2,5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ) kada je prisutan u smeši sa DEHP (0, 1, 2, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) i DBP (0, 1, 2, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) nakon dvodnevno izlaganja. Broj iteracija: 200. DBP: dibutil ftalat; DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; BPA: bisfenol A.

#### 4.1.3. *In silico* rezultati toksikogenomičke analize podataka

##### 4.1.3.1. Interakcije sa genima

Prvi korak *in silico* analize u okviru ove doktorske disertacije uključivao je identifikaciju gena i interakcija povezanih sa 14 ftalata prisutnih u CTD bazi podataka, kao sa i BPA (Tabela 14). Informacije predstavljene u Tabeli 14 dobijene su sa *Gene* kartica na CTD internet stranici za svaku od ispitivanih supstanci za sve vrste organizama uključene u CTD bazu podataka, imajući u vidu da su svi geni/proteini navedeni u CTD samo ako su takođe prisutni u ljudskom genomu [158]. Ekstrahovani podaci su pokazali da su DEHP i DBP, interagovali sa 4617 i 5929 gena, ispoljavajući 7674 i 7076 interakcija, redom. Zbir njihovih 14728 interakcija činio je 77,58% svih 19012 interakcija ftalata, dok je zbir gena sa kojima su stupili u interakciju bio 73,51% od svih 14345 gena sa kojima su ftalati interagovali na osnovu CTD baze podataka. Štaviše, pomoću „Comps“ kartica sa podacima u CTD bazi, otkriveno je da je DBP ftalat koji se najbolje može porediti sa DEHP, sa 1375 zajedničkih gena u interakciji. Dakle, kao najčešće pretraživani i uporedivi ftalati, DEHP i DBP, koji su obuhvaćeni istraživanjem ove doktorske disertacije, su dalje razmatrani za toksikogenomičku analizu, zajedno sa BPA, koji, sa 23528 gena i 54074 interakcija, spada u hemikalije koje u CTD imaju najviše unetih podataka. *VenViewer* CTD alat je dao podatak da postoji 1361 zajedničkih gena za DEHP, DBP i BPA, što sugeriše mogućnost da ove tri supstance pokazuju slične toksikogenomičke interakcije i štetne efekte na ljudsko zdravlje. Određeni skup podataka za tri ispitivane supstance dalje je analiziran da bi se ilustrovalo obim CTD i istakle njegove potencijalne primene za procenu toksičnosti smeša.

Tabela 14. Broj gena/proteina i interakcija za ftalate i bisfenol A (CTD (<http://CTD.mdibl.org>))

Hemikalija	Broj gena	Broj interakcija
Dibutil ftalat	5929	7076
Bis(2-etilheksil) ftalat	4617	7674
Diizobutil ftalat	1308	1331
Dicikloheksil ftalat	856	875
Dimetil ftalat	727	735
Butilbenzil ftalat	265	503
Diizononil ftalat	221	295
Dietil ftalat	183	208
Diizodecil ftalat	95	107
Di-n-pentil ftalat	56	83
Di-n-heksil ftalat	25	37
Diheptil ftalat	23	24
Ftalna kiselina	22	43
Di-n-oktil ftalat	18	21
Zbir	14345	19012
Bisfenol A	23528	54074

##### 4.1.3.2. Oštećenje jetre

Prema nalazima ovog istraživanja, bilo je 148, 136 i 338 gena povezanih sa oštećenjem jetre izazvanim hemikalijama, koji su istovremeno povezani sa izloženosti DEHP, DBP i BPA. Od toga, 75 gena bilo je povezano sa sve tri ispitivane supstance (Tabela 15).

Tabela 15. Geni uključeni u razvoj oštećenja jetre izazvanog hemikalijama DEHP, DBP, BPA i njihovom smešom (CTD (<http://CTD.mdibl.org>) + MyVenn CTD tool (<http://ctdbase.org/tools/myVenn.go>))

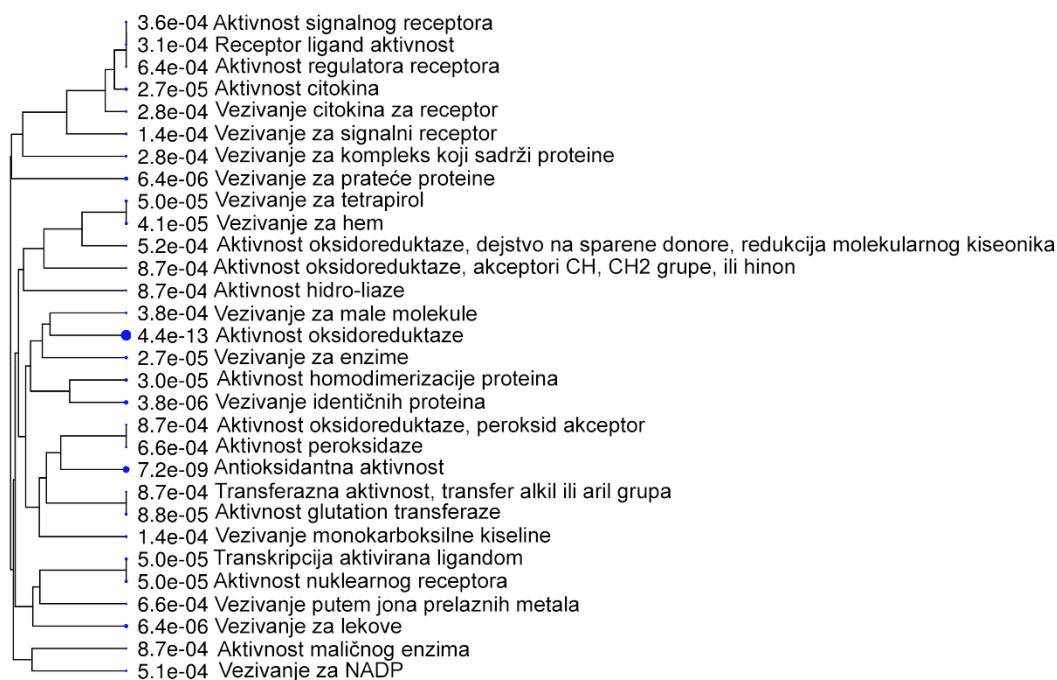
	Oštećenje jetre
DEHP (148)	AASS   ABCB1   ABCB1A   ABCB1B   ABCC2   ACSL1   ACTB   ACTR3   ADIPOQ   AGT   AHR   ALDH9A1   ANXA2   APOE   BAX   BLVRB   C3   CA3   CAT   CCL2   CCR2   CCT3   CELA1   CKB   CLU   CP   CRP   CTNNB1   CTSE   CXCL1   CYP1A2   CYP2B6   CYP2E1   CYP3A23-3A1   CYP3A4   CYP4A3   CYP8B1   DBT   DGAT2   DHFR   DLAT   DNAJB9   DNAJC12   EDEM1   ENO1   EPHX1   FADS2   FASN   FLT1   FMO3   GDA   GPT   GSN   GSR   GSTA4   GSTM1   GSTM2   GSTM3   GSTM4   GSTO1   GSTP1   GULO   HACL1   HADHA   HLA-DQB1   HMOX1   HSPA5   IDO2   IFNG   IGF1   IL1B   IL4   IL6   KITL   KRT18   KRT8   LCN2   LGALS3   LTF   MDH1   ME1   MIR107   MIR132   MIR141   MIR143   MIR150   MIR17   MIR188   MIR18A   MIR191   MIR200C   MIR221   MIR222   MIR30A   MIR320A   MIR345   MIR410   MIR423   MIR484   MIR574   MIR877   MIR879   MIR93   MIRLET7B   MIRLET7C   MMP2   MMP9   NFE2L2   NOTCH1   NR0B2   NR1H3   NR1H4   NR1I2   NR1I3   NR2F2   NR5A2   P4HB   PAN2   PDK4   PEX11A   PLAT   PLG   PNRC1   PPARA   PTGS2   PYGL   PZP   REEP5   RGN   S100A11   SELENBP1   SERPING1   SLC13A4   SLCO1B1   SOD1   SOD2   SPP1   SULT1E1   SUOX   TF   TMEM117   TNF   TTR   TUBA1A   TUBB4B   UGT1A9   VEGFA   VIM
DBP (136)	ACTB   ACTN4   ACTR3   AHR   ALDH9A1   ALDOB   APOE   ARG1   ARNT   ATG5   ATOH8   BAX   BDH1   BDKRB2   BLVRB   CAP1   CAT   CCL2   CCT3   CDC25B   CHRM3   CKB   CLU   COQ9   CP   CTNNB1   CXCL1   CXCL10   CYP1A2   CYP2C11   CYP2E1   CYP3A23-3A1   CYP3A4   DBT   DHFR   DNAJB9   DSC2   ECHS1   ENO1   EPHX1   F3   FADS1   FADS2   FASN   GADD45A   GCLC   GCLM   GOT1   GPD1   GPT   GSN   GSR   GSTA4   GSTM2   GSTO1   GSTP1   HADHA   HAO2   HMGB1   HMOX1   HSPA5   IDO2   IFNG   IGF1   IL17A   IL1B   IL1R2   IL4   IL6   IMMT   IRAK1   ITPR1   KRT18   KRT8   LCN2   MAP1LC3B   MCCC1   MDH1   ME1   MED1   MIR141   MIR200C   MIR30A   MIR30B   MMP2   MMP9   MTPN   NDUFS3   NFE2L2   NME2   NOTCH1   NR0B2   NR1I2   NR1I3   NR2F2   OGDH   PARK7   PDLIM5   PEX11A   PGM1   PLAT   PLG   PLS3   PNP   PNRC1   PPARA   PRKCD   PRKDC   PTGS2   PUM1   PYGL   PZP   RAS1   RBP1   SELENBP1   SEMA4A   SERPING1   SNX18   SOD1   SOD2   SOD3   SORD   SORL1   SPP1   SRP72   SULT1E1   TAGLN2   TBXA2R   TMEM164   TNF   TUBA1A   UNC93B1   VEGFA   VIM   VWF   WASL
BPA (338)	AASS   ABCB1   ABCB1A   ABCB1B   ABCC1   ABCC2   ABII   ACOX3   ACSL1   ACTB   ACTN4   ACTR3   ADAM8   ADIPOQ   AGT   AHR   AIFM1   AKR1A1   ALB   ALDH1L2   ALDH9A1   ALDOB   AMBP   ANXA2   ANXA6   APOA1   APOE   APOH   ARG1   ARNT   ATG5   ATOH8   ATP6V1D   BAX   BDH1   BDKRB2   BLVRB   BPNT1   BRD4   BTD   C3   CA3   CADPS2   CANX   CAP1   CAR3   CAT   CCDC80   CCL2   CCR2   CCT3   CCT5   CDC25B   CDS1   CELA1   CFAP20   CFH   CHRM3   CKB   CLU   COL14A1   COL3A1   COQ9   CP   CPS1   CRP   CSF3   CTNNB1   CTSE   CXCL1   CXCL10   CYP1A2   CYP2A6   CYP2B6   CYP2C19   CYP2C9   CYP2E1   CYP2K18   CYP3A23-3A1   CYP3A4   CYP4A3   CYP8B1   DBT   DDB1   DGAT2   DHFR   DHRS7   DLAT   DNAJB9   DNAJC12   DSC2   E2F1   ECHDC1   ECHS1   EDEM1   EIF2AK1   EIF4EBP2   ENO1   EPHX1   ERLEC1   ERN1   F3   FADS1   FADS2   FASN   FCMR   FGA   FLT1   GSK3   GSN   GSR   GSTA4   GSTM1   GSTM2   GSTM3   GSTM4   GSTO1   GSTP1   GSTT1   GSTT1B   GULO   H19   HACL1   HADHA   HAO2   HAVCR1   HBA-A1   HLA-B   HLA-DRB1   HMGB1   HMOX1   HPD   HPRT   HPX   HRH2   HSPA5   IDO2   IFNG   IGF1   IL11   IL17A   IL18   IL1A   IL1B   IL1R2   IL22   IL4   IL6   IMMT   IRAK1   ITPR1   JUND   KITL   KNG1   KRT18   KRT8   LAP3   LBP   LCN2   LGALS3   LRAT   LTF   MALAT1   MAP1LC3B   MAP3K5   MAT1A   MCCC1   MDH1   ME1   MED1   MIR100   MIR107   MIR10B   MIR122   MIR141   MIR143   MIR149   MIR150   MIR188   MIR192   MIR193B   MIR194-1   MIR19A   MIR200C   MIR203   MIR21   MIR218-1   MIR221   MIR222   MIR23B   MIR27B   MIR30B   MIR320A   MIR335   MIR337   MIR338   MIR342   MIR34A   MIR34C   MIR362   MIR423   MIR452   MIR455   MIR497   MIR499A   MIR505   MIR532   MIR885   MIR93   MIRLET7C   MIRLET7G   MMP2   MMP9   MST1   MST1R   MTHFR   MTPN   NAT2   NDUFS3   NFE2L2   NFXL1   NME2   NOTCH1   NOX4   NR0B2   NR1H3   NR1H4   NR1I2   NR1I3   NR2F2   NR5A2   NREP   OAS1A   OCIAD1   OGDH   P4HB   PAH   PAN2   PANX1   PARK7   PC   PCOLCE   PCYT1A   PDK4   PDLIM5   PEX11A   PGM1   PLAT   PLG   PLS3   PNP   PNRC1   POLG   POLR2G   PON1   PPARA   PPTC7   PRKCD   PRKDC   PTF1A   PTGS2   PUM1   PYGL   PZP   RBP1   RDH13   REEP5   RGN   RIPK3   S100A11   SELENBP1   SEMA3A   SEMA4A   SENP2   SERPINA6   SERPING1   SESN2   SGF29   SHC1   SLC10A7   SLC13A4   SLC22A8   SLC25A29   SLCO1B1   SLPI   SNX18   SOD1   SOD2   SOD3   SORD   SORL1   SPIN2A   SPP1   SRP72   SULT1C3   SULT1E1   SULT2B1   SUOX   TAGLN2   TALDO1   TBXA2R   TCTN1   TF   TGFB1   THPO   TLR5   TMED7   TMEM117   TMEM164   TMEM38B   TNF   TTR   TUBA1A   TUBB4B   UBA5   UGT1A9   UNC93B1   USP5   VEGFA   VIM   VWF   WASL   XYLB   ZDHHC23
DEHP/DBP/BPA (75)	ACTB   ACTR3   AHR   ALDH9A1   APOE   BAX   BLVRB   CAT   CCL2   CCT3   CKB   CLU   CP   CTNNB1   CXCL1   CYP1A2   CYP2E1   CYP3A23-3A1   CYP3A4   DBT   DHFR   DNAJB9   ENO1   EPHX1   FADS2   FASN   GPT   GSN   GSR   GSTA4   GSTM2   GSTO1   GSTP1   HADHA   HMOX1   HSPA5   IDO2   IFNG   IGF1   IL1B   IL4   IL6   KRT18   KRT8   LCN2   MDH1   ME1   MIR141   MIR200C   MMP2   MMP9   NFE2L2   NOTCH1   NR0B2   NR1I2   NR1I3   NR2F2   PEX11A   PLAT   PLG   PNRC1   PPARA   PTGS2   PYGL   PZP   SELENBP1   SERPING1   SOD1   SOD2   SPP1   SULT1E1   TNF   TUBA1A   VEGFA   VIM

Identifikovan skup zajedničkih gena (75) korišćen je za istraživanje najvažnijih bioloških procesa i molekularnih funkcija indirektno povezanih sa smešom DEHP, DBP i BPA (Slika 17).

## Bioški procesi



## Molekularne funkcije



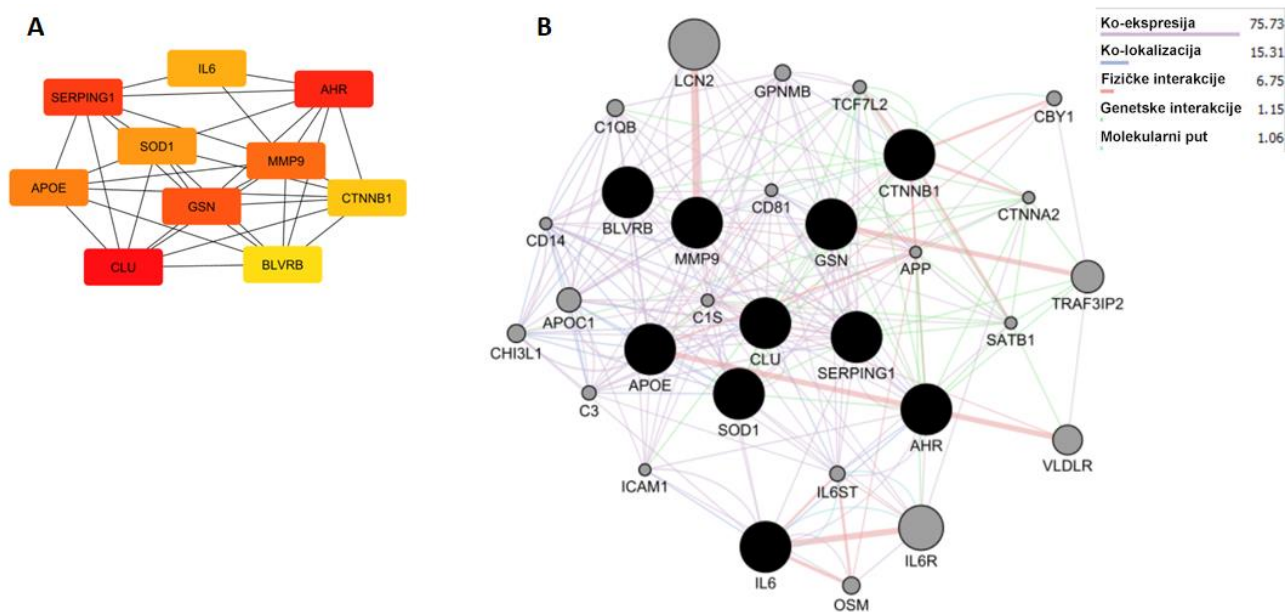
Slika 17. Ontologija gena - GO: bioški procesi i molekularne funkcije povezani sa genima uključenim u oštećenje jetre i smešom DEHP, DBP i BPA

Bioški procesi i molekularne funkcije koje dele veliki broj gena grupisane su zajedno. Značajnije p-vrednosti prikazane su većim tačkama (ShinyGO, <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>); p-vrednost (FDR) – 0.05.

Pomoću *CytoHubba Cytoscape* dodatka iz mreže konstruisane od 75 gena zajedničkih za sve tri ispitivane supstance izdvojeno je 10 najvažnijih (Slika 18A). Dodatna *GeneMania* analiza je sprovedena je da bi se ustanovio tip interakcija prisutnih između dobijenih najznačajnijih gena. Kao što na slici 18B može videti, veći deo ovih gena je bio u ko-ekspresiji (75,73%), 15,31% je bio u



ko-lokalizaciji, 6,75% gena je ispoljilo fizičke interakcije, 1,15% je bilo u genetskim interakcijama, dok je 1,06% pripadalo istom molekularnom putu. *ShinyGO* onlajn alatom prikazano je da su, od molekularnih funkcija, GSN, APOE, AHR, CLU i MMP9 bili uključeni u vezivanje kompleksa koji sadrži proteine, AHR, SERPING1, CTNNB1, APOE i IL6 u regulatornu molekularnu funkciju, GSN i APOE u vezivanje lipida, SOD1 i APOE u antioksidativnu aktivnost, dok su SOD1 i BLVRB bili uključeni u aktivnost oksidoreduktaze. Sa druge strane, od bioloških procesa, IL6, AHR, CLU, SERPING1, MMP9, APOE, SOD1, GSN i CTNNB1, uključeni su u reulaciju imunskog sistema, AHR, IL6, SERPING1, CLU, APOE, CTNNB1, GSN i SOD1 u regulaciju procesa imunskog sistema, SOD1, APOE, MMP9, CLU, IL6, SERPING1, GSN i CTNNB1 u odgovor na stres, APOE, IL6, SERPING1, CLU, SOD1, GSN, MMP9 i CTNNB1 u odgovor na spoljni stimulus i APOE, IL6, SERPING1, CLU, SOD1, CTNNB1, MMP9 i GSN u regulaciju odgovora na stimulus.



Slika 18. Konstruisane mreže gena uključenih u oštećenje jetre i povezanih sa smešom DEHP/DBP/BPA

A. 10 najvažnijih gena (zasnovano na MCC metodi za klasifikovanje) uključenih u oštećenje jetre i povezanih sa DEHP, DBP i BPA smešom (*CytoHubba Cytoscape* dodatak). Stepenn korelacije je predstavljen bojom, pri čemu je žuta najslabija, a crvena najjača; B. DEHP/DBP/BPA recipročne interakcije između zajedničkih gena, kao i 20 identifikovanih funkcionalno povezanih gena koji se mogu dovesti u vezu sa oštećenjem jetre (*GeneMANIA*, <http://geneMANIA.org/plugin/>).

Skup od najvažnijih identifikovanih 10 gena ručno je istražen u CTD bazi podataka, prilikom čega su pregledane interakcije sa svakom od tri ispitivane supstance (DEHP, DBP i BPA) (Tabela 16). U obzir su uzete samo binarne interakcije (jedan gen – jedna hemikalija), dok su višekomponentne isključene iz daljeg razmatranja. Tri vrste interakcija su se izdvojile kao najprisutnije (aktivnost proteina, ekspresija mRNK i ekspresija proteina). Strelice nadole označavaju potiskivanje pomenute interakcije, dok strelice nagore označavaju stimulaciju. Obe tendencije mogle su se uočiti u slučaju pojedinih interakcija.

Tabela 16. Interakcije između svake od pojedinačnih supstanci (DEHP, DBP i BPA) i 10 izdvojenih najznačajnijih gena povezanih sa oštećenjem jetre (CTD (<http://CTD.mdibl.org>))

Supstanca	DEHP			DBP			BPA		
	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina
CLU		↓			↑	↑		↑↓	
AHR		↑	↑	↑	↓				↑
SERPING1		↓			↑			↑	
GSN		↑			↑			↑↓	
MMP9		↑	↑↓			↑	↑	↑↓	↑
APOE		↑			↓			↑↓	
SOD1	↓	↓	↑	↓	↓	↓		↑↓	↑
IL6		↑	↑			↑		↑↓	↑↓
CTNNB1		↑	↑		↑	↑		↑↓	↑↓
BLVRB		↑			↑↓			↑	

DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP: dibutil ftalat; BPA: bisfenol A; ↑ - povećava; ↓ - smanjuje; ↑↓ - može i da poveća i da smanji (interakcije dvojne prirode).

#### 4.1.3.3. Poremećaj muškog reproduktivnog sistema

Prvi korak ove *in silico* toksikogenomske analize bio je usmeren ka identifikaciji gena uključenih u razvoj muške neplodnosti i povezanih sa poremećajima muškog reproduktivnog sistema označenim kao „sindrom ftalata“, odnosno „sindrom disgeneze testisa“ (kriptorhidizam, hipospadija, neoplazme testisa i tumor germinativnih ćelija testisa). Pokazano je da DEHP, DBP i BPA interaguju sa 19, 22 i 48 gena povezanih sa muškom neplodnošću, redom, dok je 14 gena bilo zajedničko za sve tri supstance (AHR, AR, BAKS, BCL2, CYP17A1, CYP1A1, ENO1, ESR1, FSHB, LHB, LHCGR, NR5A1, SELENOP, SOD2). Dodatna dva gena su bila zajednička za kriptorhidizam (CASP3, INSL3), jedan je bio zajednički za hipospadiju (ATF3) i neoplazme testisa (DMRT1), dok su dva dodatna gena bila zajednička za tumor germinativnih ćelija testisa (FGFR3, MMP2) (Tabela 17).

Tabela 17. Geni uključeni u razvoj poremećaja muškog reproduktivnog sistema izazvanih DEHP, DBP, BPA i njihovom smešom (CTD (<http://CTD.mdibl.org>) i *MyVenn CTD alat* (<http://ctdbase.org/tools/myVenn.go>))

	Muška neplodnost	Kriptorhidizam	Hipospadija	Neoplazme testisa	Tumor germinativnih ćelija testisa
DEHP	AHR, AR, BAX, BCL2, CYP17A1, CYP1A1, ENO1, ESR1, FSHB, GNRH1, LHB, LHCGR, MDM2, NOS3, NR1H4, NR5A1, SELENOP, SOD2, TP53	CASP3, HSD3B2, INSL3	ATF3, HSD3B2, MAMLD1	BAP1, DMRT1	FGFR3, MMP2
DBP	AHR, ALDH2, AR, BAX, BCL2, CDC14A, CST8, CYP17A1, CYP1A1, DROSHA, ELOVL2, ENO1, ESR1, FSHB, GPX4, LHB, LHCGR, NR5A1, SELENOP, SOD2, TDRD7, TSC22D3	CASP3, CHRM3, GPX4, INSL3	ATF3, HHIP	DMRT1	BCL10, FGFR3, KIT, MAD1L1, MMP2, STK11
BPA	ACE, AHR, ALDH2, AR, AURKC, BAX, BCL2, CBL, CDC14A, CFTR, CST8, CYP17A1, CYP1A1, DNAAF4, DROSHA, ELOVL2, ENO1, ENO4, ESR1, FSHB, GNAT3, GNRH1, GPX4, HOXD11, KMT2D, LDHC, LHB, LHCGR, MDM2, MTHFR, MTR, MTRR, NANOS2, NOS3, NR1H4, NR5A1, NSUN7, OGG1, POLG, PON1, RAD23B, SELENOP, SOD2, STX2, TAS1R3, TDRD7, TP53, TSC22D3	ATRX, BCL2L1, CASP3, CBL, CHRM3, GPX4, HSD3B2, INSL3	ATF3, DGKK, HHIP, HSD3B2, MAMLD1	ATF7IP, BAP1, DMRT1, ERCC1, ERCC4, KITLG	ALOX12B, ALOX5, BCL10, DAZL, FGFR3, HPGDS, KIT, MAD1L1, MMP2, PITX1, PRDM14, RFWD3, STK11
DEHP/DBP/BPA	AHR, AR, BAX, BCL2, CYP17A1, CYP1A1, ENO1, ESR1, FSHB, LHB, LHCGR, NR5A1, SELENOP, SOD2	CASP3, INSL3	ATF3	DMRT1	FGFR3, MMP2

DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP - dibutil ftalat; BPA – bisfenol A

Izdvojeno je 83 različita gena povezanih sa poremećajima muškog reproduktivnog sistema (muška neplodnost, kriptorhidizam, hipospadija, neoplazme testisa i tumor zametnih ćelija testisa), na koje je delovala neka od tri ispitivane supstance, dok je 20 ovih gena bilo zajedničko za sve tri (Tabela 18). Utvrđeno je da ovih 20 gena pripada sledećim porodicama gena: osnovni proteini heliks-petlje (AHR), osnovni proteini leucinskog zatvarača (ATF3), BCL2 porodica (BAKS, BCL2), kaspaze (CASP3), citohrom P450 porodica 1 ( CIP1A1), citohrom P450 porodica 17 (CIP17A1), DMRT porodica (DMRT1), endogeni ligandi (LHB, FSHB, INS3), familija enolaza (ENO1), receptori glikoproteinskih hormona (LHCGR), gvožđe/mangan superoksid dismutaza 2 porodica (SOD Matrične metalopeptidaze (MMP2), receptori nuklearnih hormona (AR, ESR1, NR5A1), receptorske tirozin kinaze/regulatorne podjedinice proteinske fosfataze 1 (FGFR3), selenoproteini (SELENOP).

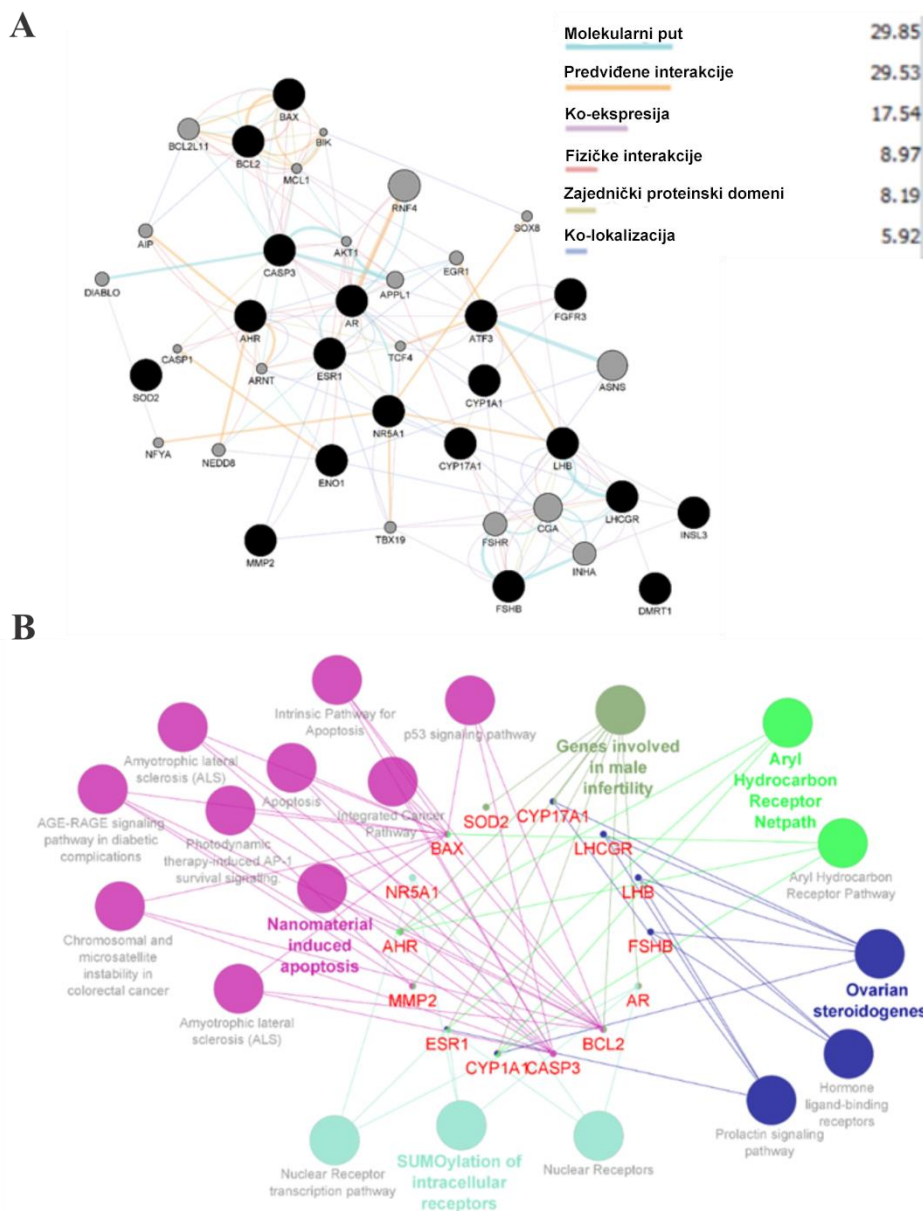
Tačan način interakcije između ispitivanih supstanci i skupa koji sadrži 20 zajedničkih gena, uključujući aktivnost proteina, ekspresiju iRNK, ekspresiju proteina i vezivanje za proteine, prikazan je u Tabeli 18. Od uočenih interakcija, za sve tri supstance i sve zajedničke gene, najbrojnije su se odnosile na ekspresiju iRNK. Utvrđeno je da su neke od interakcija dvostruke prirode (povećanje u odnosu na smanjenje aktivacije gena, npr), u zavisnosti od dizajna studije, uključujući različite faktore (doza, put, dužina ekspozicije, razvojni faza itd).

Tabela 18. Interakcije između svake od ispitivanih supstanci (DEHP, DBP i BPA) i 20 zajedničkih gena povezanih sa poremećajima muškog reproduktivnog sistema - neplodnošću, kriptorhidizmom, hipospadijom, neoplazmama testisa i tumorom germinativnih ćelija testisa (CTD (<http://CTD.mdibl.org>))

Supstanca	DEHP				DBP				BPA			
	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina	Vezivanje	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina	Vezivanje	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina	Vezivanje
AHR	↑	↑			↑	↓			↑↓		↑	
AR	↑	↓	↑↓		↑	↑↓	↑↓	+	↓	↑↓	↑↓	+
ATF3		↑				↑				↑↓		
BAX		↑↓	↑↓			↓	↑			↑↓	↑↓	
BCL2		↑↓	↑↓			↑↓	↓			↑↓	↑↓	
CASP3	↑	↑↓	↑		↑	↓	↑		↑↓	↑↓	↑↓	
CYP7A1		↓	↑↓			↑↓	↓		↓	↑↓	↑↓	
CYP1A1		↑↓	↑		↓		↑			↑↓		
DMRT1		↓	↓			↓				↑↓	↑↓	
ENO1		↑				↑↓				↑↓		
ESR1	↑↓	↓	↓	+	↑	↑	↑	+	↑↓	↑	↑	+
FGFR3		↑				↓				↑↓		
FSHB		↑	↑↓			↑↓	↑			↑↓	↑↓	
INSL3		↓	↓			↓	↓			↓	↑↓	
LHB			↓			↓	↑		↓	↑↓	↑↓	
LHCGR	↓	↓				↓	↓			↑↓	↑↓	
MMP2	↑	↑	↑			↑				↑	↑	
NR5A1		↓	↓			↓				↑↓		
SELENOP		↓				↑↓				↑↓		
SOD2			↓		↓	↓				↑↓	↑↓	

↑ - povećava; ↓ - smanjuje; ↑↓ - može i da poveća i da smanji; DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP – dibutil ftalat; BPA – bisfenol A.

Da bi se istražile interakcije u okviru dobijenog seta gena, konstruisana je molekularna mreža na koju potencijalno utiče ispitivana smeša, zajedno sa 20 srodnih gena. Rezultati su pokazali da većina ovih gena pripada istom putu (29,85%), server je predvideo 29,53% interakcija, dok je 17,54% gena bilo u ko-ekspresiji, 8,97% u fizičkim interakcijama, 8,19% je delilo proteinske domene, dok je 5,92% bilo u ko-lokalizaciji (Slika 19A). Da bi se utvrdili molekularni mehanizmi i povezanost između odabranog skupa gena i molekularnih puteva, konstruisana je mreža puteva gena. Funkcionalno povezani geni su grupisani oko puteva dobijenih iz baza podataka KEGG, *Reactome* i *WikiPathways*. Rezultati su pokazali da su ispitivani geni grupisani oko pet glavnih puteva: neplodnost, SUMOilacija intracelularnih receptora, molekularni put receptora za aromatične ugljovodonike, steroidogeneza jajnika i apoptoza izazvana nanomaterijalom (Slika 19).



Slika 19. Konstruisane mreže gena uključenih u poremećaje muškog reproduktivnog sistema i povezanih sa smešom DEHP/DBP/BPA

A. mreža 20 gena sa kojima intereaguju ispitivane supstance (DEHP, DBP i BPA), zajedno sa 20 srodnih gena, povezanih sa poremećajima muškog reproduktivnog sistema - muškom neplodnošću, kriptorhidizmom, hipospadijom, neoplazmom testisa i tumorom germinativnih ćelija testisa (*GeneMania* prediktivni server - <https://genemania.org>). B. Mreža molekularnih puteva u koje je uključeno 20 gena na koje utiču ispitivane supstance (DEHP, DBP i BPA), povezani sa odabranim poremećajima muškog reproduktivnog sistema – muškom neplodnošću, kriptorhidizmom, hipospadijom, neoplazmama testisa i tumorom germinativnih ćelija testisa (Cytoscape plug-in ClueGO+CluePedia

verzija 2.5.6 i 1.5.6 dvostrani hipergeometrijski test + Bonferonijeva korekcija na niže i k rezultat = 0,3). Geni su raspoređeni u sredini i povezani sa putevima koje regulišu (putevi su predstavljeni kao čvorovi). Putevi su grupisani u 5 klastera: geni uključeni u mušku neplodnost (maslinasto zelena), molekularni put receptora za aromatične ugljovodonike (svetlo zelena), steroidogeneza jajnika (tamno plava), SUMOilacija intracelularnih receptora (svetlo plava), apoptoza izazvana nanomaterijalom (ružičasta).

Da bi se razjasnili biološki procesi i molekularne funkcije najrelevantnije za uticaj ispitivane smeše supstanci na poremećaje muške reproduktivne funkcije, izvršena je analiza ontologije gena (GO). 10 najvažnijih bioloških procesa i molekularnih funkcija za 20 zajedničkih gena prikazano je u Tabeli 19, sortirano prema statističkoj značajnosti.

Tabela 19. Ontologija gena - GO: biološki procesi i molekularne funkcije povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na poremećaje muškog reproduktivnog sistema - mušku neplodnost, kriptorhidizam, hipospadiju, neoplazme testisa i tumor germinativnih ćelija testisa (*ToppGene ToppFun* funkcija)

GO	ID	Ime	p-Vrednost	Broj gena	Geni
<b>Biološki procesi</b>	GO:0007548	diferencijacija pola	1,903E-21	14	DMRT1, AHR, CASP3, LHB, BAX, LHCGR, AR, CYP17A1, ESR1, BCL2, NR5A1, FSHB, INSL3, MMP2
	GO:0008406	razvoj gonada	1,697E-20	13	DMRT1, AHR, CASP3, LHB, BAX, LHCGR, AR, ESR1, BCL2, NR5A1, FSHB, INSL3, MMP2,
	GO:0045137	razvoj primarnih polnih karakteristika	2,286E-20	13	DMRT1, AHR, CASP3, LHB, BAX, LHCGR, AR, ESR1, BCL2, NR5A1, FSHB, INSL3, MMP2
	GO:0008585	razvoj ženskih polnih žlezda	1,027E-17	10	AHR, CASP3, LHB, BAX, LHCGR, ESR1, BCL2, NR5A1, FSHB, MMP2
	GO:0046545	razvoj primarnih ženskih polnih karakteristika	1,539E-17	10	AHR, CASP3, LHB, BAX, LHCGR, ESR1, BCL2, NR5A1, FSHB, MMP2
	GO:0046660	diferencijacija ženskog pola	4,729E-17	10	AHR, CASP3, LHB, BAX, LHCGR, ESR1, BCL2, NR5A1, FSHB, MMP2
	GO:0008584	razvoj muških polnih žlezda	1,068E-16	10	DMRT1, LHB, BAX, LHCGR, AR, ESR1, BCL2, NR5A1, FSHB, INSL3
	GO:0046546	razvoj primarnih muških polnih karakteristika	1,139E-16	10	DMRT1, LHB, BAX, LHCGR, AR, ESR1, BCL2, NR5A1, FSHB, INSL3
	GO:0048608	razvoj reproduktivne strukture	1,186E-16	13	DMRT1, AHR, CASP3, LHB, BAX, LHCGR, AR, ESR1, BCL2, NR5A1, FSHB, INSL3, MMP2
	GO:0061458	razvoj reproduktivnog sistema	1,311E-16	13	DMRT1, AHR, CASP3, LHB, BAX, LHCGR, AR, ESR1, BCL2, NR5A1, FSHB, INSL3, MMP2
<b>Molekularne funkcije</b>	GO:0004879	aktivnost nuklearnih receptora	2,054E-7	4	AHR, AR, ESR1, NR5A1
	GO:0098531	aktivnost transkripcionog faktora aktiviranog ligandom	2,054E-7	4	AHR, AR, ESR1, NR5A1,
	GO:0001091	RNK polimeraza II vezivanje opštog faktora inicijacije transkripcije	1,261E-6	3	AHR, AR, ESR1
	GO:0019825	Vezivanje kiseonika	8,565E-6	3	CYP1A1, CYP17A1, SOD2
	GO:0042802	Vezivanje identičnih proteina	9,726E-6	10	DMRT1, AHR, BAX, LHCGR, ENO1, ATF3, ESR1, BCL2, FGFR3, SOD2
	GO:0051434	Vezivanje za BH3	1,024E-5	2	BAX, BCL3
	GO:0031072	Vezivanje heat shock proteina	1,327E-5	4	AHR, BAX, CYP1A1, ENO1
	GO:0043565	Sekvenca-specifično DNK vezivanje	1,422E-5	8	DMRT1, AHR, ENO1, AR, ATF3, ESR1, BCL2, NR5A1
	GO:0140296	Vezivanje opštog faktora inicijacije transkripcije	1,512E-5	3	AHR, AR, ESR1
	GO:0000977	Vezivanje DNK regulacionog regiona transkripcije RNK polimeraze II specifično za sekvencu	1,531E-5	7	DMRT1, AHR, ENO1, AR, ATF3, ESR1, BCL2, NR5A1

#### 4.1.3.4. Dijabetes

Geni relevantni za razvoj dijabetes melitusa tipa 2 (T2DM) i povezani sa ispitivanim supstancama (DEHP, DBP i BPA) i njihovom smešom (DEHP/DBP/BPA) prikazani su u Tabeli 20. Kao što se može videti u CTD bazi podataka, DEHP, DBP i BPA stupaju u interakciju sa 85, 73 i 180 gena uključenih u razvoj T2DM, redom, sa 44 gena zajednička za sve tri ispitivane supstance.

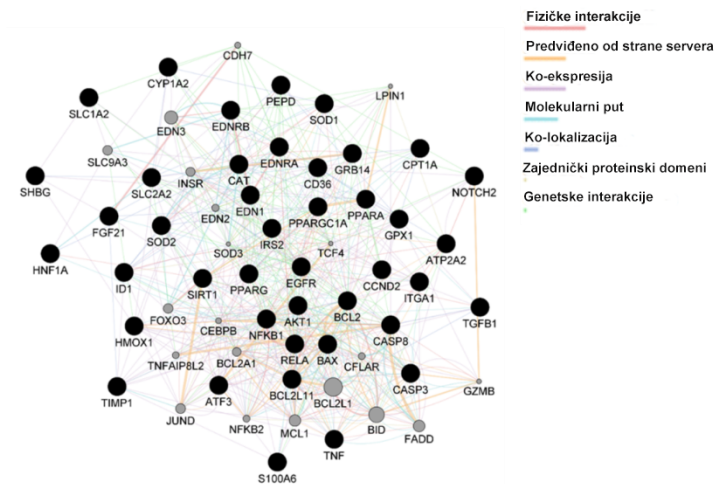
Tabela 20. Geni uključeni u razvoj T2DM izazvanog DEHP, DBP, BPA i njihovom smešom (CTD (<http://CTD.mdibl.org>) i MyVenn CTD alat (<http://ctdbase.org/tools/myVenn.go>))

	Dijabetes melitus, tip 2
DEHP	ABCC8, ADIPOQ, AKT1, AKT2, ATF3, ATP2A2, BAX, BCL2, BCL2L11, BHMT, C3, CASP3, CASP8, CAT, CBS, CCND2, CD36, CDO1, CPT1A, CYP1A2, CYP3A2, CYP3A23-3A1, EDN1, EDNRA, EDNRB, EGFR, FAS, FGF21, GCG, GPD2, GPX1, GRB14, GSTM1, HMOX1, HNF1A, HNF4A, HP, ID1, IGF2BP2, INS, INS1, IRS1, IRS2, ITGA1, KCNQ1, KSR2, LEP, LIPC, MIR141, MIR144, MIR195, MIR200A, MIR204, MIR221, MIR222, MIR30A, MIR375, MIR423, NFATC2, NFKB1, NOS2, NOS3, NOTCH2, PAX4, PAX6, PDX1, PEPD, PPARA, PPARG, PPARGC1A, PPP1R3A, RELA, S100A6, SHBG, SIRT1, SLC1A2, SLC2A1, SLC2A2, SLC2A4, SOD1, SOD2, TGFB1, TIMP1, TNF, UCP2
DBP	ADCY5, AKT1, ATF3, ATP2A2, ATP2A3, BAX, BCL2, BCL2L11, CAPN10, CASP3, CASP8, CAT, CCND2, CD36, CISD2, CPT1A, CYP1A2, CYP3A23-3A1, EDN1, EDNRA, EDNRB, EGFR, ENPP1, ETS1, FAM234A, FGF21, GCG, GCLC, GCLM, GPX1, GRB14, HK1, HMOX1, HNF1A, ICAM1, ID1, IL13RA1, IRS2, ITGA1, JAZF1, LEPR, MAPK8IP1, MIR141, MIR30A, MRAS, NFKB1, NOTCH2, NUS1, PAM, PCX, PEPD, PPARA, PPARG, PPARGC1A, PSMD6, PTPN1, RELA, RNF6, S100A6, SCTR, SHBG, SIRT1, SLC1A2, SLC2A2, SOD1, SOD2, TGFB1, TIMP1, TNF, TNFRSF1A, WFS1, ZC3HC1, ZFAND3
BPA	A, ABCC8, ADAMTS9, ADCY5, ADIPOQ, AKT1, AKT2, AP3S2, ATF3, ATP2A2, ATP2A3, AUTS2, BAX, BCL2, BCL2L1, BCL2L11, BHMT, BRAF, C2CD4A, C2CD4B, C3, CAPN10, CASP3, CASP8, CAT, CBS, CCDC92, CCND2, CD36, CDKAL1, CDO1, CISD2, CMIP, CNKSR2, CPT1A, CYBA, CYP1A2, CYP3A2, CYP3A23-3A1, DGKD, ECE1, EDN1, EDNRA, EDNRB, EGFR, ENPP1, EPC2, ETS1, FAM234A, FAS, FGF21, FTO, GCG, GCK, GCKR, GCLC, GCLM, GLP1R, GNB3, GP2, GPD2, GPX1, GRB14, GSTM1, HBA1, HHEX, HK1, HMG20A, HMGA1, HMOX1, HNF1A, HNF1B, HNF4A, HP, HPX, IAPP, ICAM1, ID1, IGF2BP2, IL13RA1, INPPL1, INS, INS1, IRS1, IRS2, ITGA1, ITLN1, JADE2, JAZF1, KCNJ11, KCNK16, KCNQ1, KL, KLF14, KSR2, LEP, LEPR, LIPC, MAEA, MAPK8IP1, MAT1A, MIR127, MIR140, MIR141, MIR144, MIR17HG, MIR192, MIR195, MIR200A, MIR205, MIR214, MIR215, MIR221, MIR222, MIR335, MIR423, MIR532, MIR885, MIR92B, MOK, MRAS, NEUROD1, NFATC2, NFKB1, NKX6-1, NOS2, NOS3, NOTCH2, NUS1, OGG1, PAM, PAX4, PAX6, PCSK2, PDX1, PEPD, PIK3CG, PLEKHA1, PPARA, PPARG, PPARGC1A, PPP1R3A, PRKCB, PROX1, PSMD6, PTPN1, RELA, RETN, RNF6, S100A6, SCTR, SFRP4, SHBG, SIRT1, SLC1A2, SLC22A3, SLC2A1, SLC2A2, SLC2A4, SLC30A8, SMAD5, SNAP25, SOD1, SOD2, ST6GAL1, TCF7L2, TGFB1, THADA, TIMP1, TMEM18, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, UBE2E2, UCP2, USP48, VPS26A, WFS1, ZC3HC1, ZFAND3
DEHP/DBP/BPA	AKT1, ATF3, ATP2A2, BAX, BCL2, BCL2L11, CASP3, CASP8, CAT, CCND2, CD36, CPT1A, CYP1A2, CYP3A23-3A1, EDN1, EDNRA, EDNRB, EGFR, FGF21, GPX1, GRB14, HMOX1, HNF1A, ID1, IRS2, ITGA1, MIR141, NFKB1, NOTCH2, PEPD, PPARA, PPARG, PPARGC1A, RELA, S100A6, SHBG, SIRT1, SLC1A2, SLC2A2, SOD1, SOD2, TGFB1, TIMP1, TNF

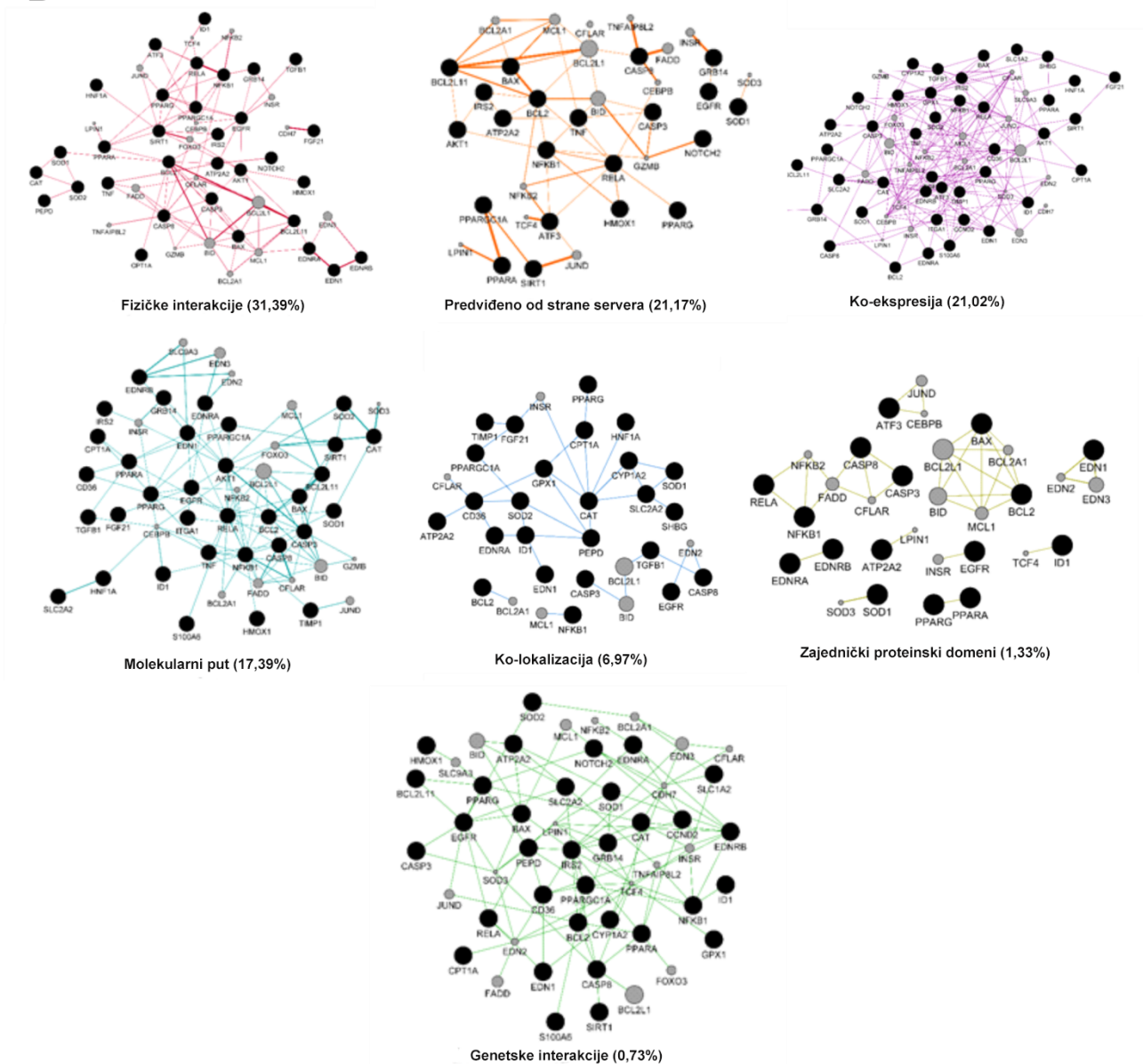
DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP – dibutil ftalat; BPA – bisfenol A; T2DM: tip 2 dijabetes melitus.

Istraživanje interakcija gen-gen između 44 zajednička DEHP/DBP/BPA gena sprovedena su pomoću *GeneMANIA Cytoscape* dodatka. Kao rezultat ove analize, konstruisana je mreža gena, zajedno sa dodatkom 20 funkcionalno srodnih gena (Slika 20A). Najveći procenat ovih gena bio je u fizičkoj interakciji (31,39%), 21,17% interakcija predvideo je *GeneMANIA* server, dok je 21,02% bilo u ko-ekspresiji. 17,39% gena pripada istom molekularnom putu, 6,97% je kolokalizovano, 1,33% deli proteinski domen, dok je samo 0,73% interakcija bilo genetskog tipa. Mreže gena konstruisane za svaki tip interakcija odvojeno i predstavljene su na Slici 20B.

A



B



Slika 20. Konstruisane mreže gena uključenih u razvoj T2DM i povezanih sa smešom DEHP/DBP/BPA

A. mreža interakcija zajedničkih gena DEHP/DBP/BPA, zajedno sa 20 predviđenih funkcionalno povezanih gena relevantnih za razvoj T2DM; B. Mreža za svaki tip interakcije (fizička interakcija, interakcija predviđena od strane servera, ko-ekspresija, zajednički molekularni put, ko-lokalizacija, zajednički domeni proteina i genetske interakcije)

(GeneMANIA, <http://geneMANIA.org/plugin/>); DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP - dibutil ftalat; BPA – bisfenol A; T2DM: tip 2 dijabetes melitus.

CTD baza podataka pretražena je kako bi se utvrdio način interakcije između DEHP, DBP, BPA i konstruisanog skupa od 44 DEHP/DBP/BPA zajednička gena. Dok su nebinarne interakcije izostavljene iz daljeg istraživanja, tri različita tipa interakcije prikazana su kao najistaknutija: aktivnost proteina, ekspresija iRNK i ekspresija proteina (Tabela 21). Takođe su primećene interakcije dvostruke prirode (npr. ako je utvrđeno da supstanca povećava i smanjuje ekspresiju iRNK), dok je ova vrsta interakcija uglavnom bila prisutna u slučaju BPA.

Tabela 21. Interakcije između svake od pojedinačnih supstanci (DEHP, DBP i BPA) i 44 zajednička gena povezana sa razvojem T2DM (CTD (<http://CTD.mdibl.org>))

Supstanca	DEHP			DBP			BPA		
	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina
ATF3		↓			↑			↑↓	
ATP2A2		↑			↓			↓	↑
BAX		↑↓	↓		↓	↑		↑↓	↑↓
BCL2		↑↓	↑↓		↑↓	↓		↑↓	↑↓
BCL2L11		↑			↓			↑↓	↑
CASP3	↑	↑↓	↑	↑	↓	↑	↑↓	↑↓	↑↓
CASP8	↑	↑↓			↓	↑	↑	↑↓	↑↓
CAT	↑↓		↑↓		↑↓	↑	↑↓	↑↓	↑↓
CCND2		↑↓			↑			↓	↑↓
CD36		↑			↓			↓	
CPT1A		↑			↓			↑↓	
CYP1A2		↓		↓				↑↓	
CYP3A23-3A1		↓			↑	↑		↑	
EDN1		↓			↑↓			↑↓	
EDNRA		↑↓			↑			↑	
EDNRB		↓			↑			↑↓	
EGFR		↑↓	↓		↓			↑↓	↑
FGF21		↑	↑		↑			↑↓	
GPX1	↓	↓	↑	↑	↑↓	↓	↓	↑↓	↓
GRB14		↑		↑	↑			↓	
HMOX1		↑↓	↓		↓	↑		↑↓	↑
HNF1A		↓	↓		↓			↑↓	
ID1		↓	↑		↓			↑↓	
IRS2		↓	↓		↑			↑↓	↓
ITGA1		↓	↓		↑			↓	
MIR141		↑				↑		↑	
NFKB1		↑			↑			↑↓	↑
NOTCH2					↑↓			↓	
PEPD								↑↓	
PPARA	↑	↑	↑↓	↑	↓		↓	↑↓	↑
PPARG	↑	↑↓	↑↓	↑		↑	↑	↑	↑
PPARGC1A		↑			↑	↓		↑↓	↑
RELA		↑				↑		↑	↑
S100A6		↑			↑			↑	↓



SHBG		↓				↑		↑↓	
SIRT1		↓	↓			↓		↑	↑
SLC1A2		↓			↓			↑↓	↑
SLC2A2		↓	↓			↓		↑↓	↓
SOD1	↓	↓	↑	↓	↓	↓		↑↓	↑
SOD2		↓	↓	↓	↓			↑↓	↑↓
TGFB1		↑↓			↑↓			↑↓	↑↓
TIMP1		↑			↑↓			↑	
TNF		↑↓	↑		↑	↑		↑	↑

↑ - povećava; ↓ - smanjuje; ↑↓ - može i da poveća i da smanji (interakcije dvojne prirode); DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP – dibutil ftalat; BPA – bisfenol A; T2DM: tip 2 dijabetes melitus.

Dalje je urađena analiza GO i KEGG molekularnih puteva pomoću *ToppGene Suite* alata, sa konačnim ciljem da se izdvoji 15 najvažnijih bioloških procesa (Tabela 22) i molekularnih puteva (Tabela 23) uključenih u razvoj T2DM pod uticajem DEHP, DBP i BPA ( $p < 0,05$  korišćen je kao granični kriterijum). Molekularni putevi koji nisu povezani sa dijabetesom su izostavljeni iz konačnih rezultata.

Tabela 22. Ontologija gena - GO: biološki procesi povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na T2DM (*TopGenne's ToppFun* funkcija - <https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>)

ID	Biološki proces	p-vrednost	Geni
GO:1901700	odgovor na jedinjenje koje sadrži kiseonik	8,423E-28	TGFB1, CASP3, ID1, CYP1A2, GRB14, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, HMOX1, PPARG, CPT1A, BCL2L11, EGFR, TIMP1, ATP2A2, SLC1A2, EDN1, SLC2A2, FGF21, SIRT1, CD36, EDNRA, EDNRB, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1
GO:0010941	regulisanje ćelijske smrti	7,461E-24	TGFB1, CASP3, BAX, ID1, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, ATF3, BCL2, IRS2, TNF, ITGA1, PPARA, HMOX1, PPARG, BCL2L11, EGFR, TIMP1, EDN1, FGF21, SIRT1, CD36, EDNRA, NOTCH2, EDNRB, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, CCND2
GO:0042981	regulacija apoptotičkog procesa	2,229E-22	TGFB1, CASP3, BAX, ID1, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, ATF3, BCL2, IRS2, TNF, ITGA1, HMOX1, PPARG, BCL2L11, EGFR, TIMP1, EDN1, FGF21, SIRT1, EDNRA, NOTCH2, EDNRB, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, CCND2
GO:0043067	regulisanje programirane ćelijske smrti	3,739E-22	TGFB1, CASP3, BAX, ID1, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, ATF3, BCL2, IRS2, TNF, ITGA1, HMOX1, PPARG, BCL2L11, EGFR, TIMP1, EDN1, FGF21, SIRT1, EDNRA, NOTCH2, EDNRB, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, CCND2
GO:0060548	negativna regulacija ćelijske smrti	1,451E-21	CASP3, BAX, ID1, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, HMOX1, EGFR, TIMP1, EDN1, FGF21, SIRT1, EDNRA, NOTCH2, EDNRB, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, CCND2
GO:0043066	negativna regulacija apoptotičkog procesa	1,503E-21	CASP3, BAX, ID1, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, BCL2, IRS2, TNF, HMOX1, EGFR, TIMP1, EDN1, FGF21, SIRT1, EDNRA, NOTCH2, EDNRB, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, CCND2
GO:0043069	negativna regulacija programirane ćelijske smrti	2,548E-21	CASP3, BAX, ID1, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, BCL2, IRS2, TNF, HMOX1, EGFR, TIMP1, EDN1, FGF21, SIRT1, EDNRA, NOTCH2, EDNRB, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, CCND2
GO:0010243	odgovor na organsko azotno jedinjenje	9,992E-21	TGFB1, CASP3, ID1, GRB14, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, IRS2, TNF, PPARA, PPARG, BCL2L11, EGFR, TIMP1, ATP2A2, SLC1A2, EDN1, FGF21, SIRT1, CD36, EDNRA, EDNRB, NFKB1, SOD1
GO:1901698	odgovor na azotno jedinjenje	5,865E-20	TGFB1, CASP3, ID1, GRB14, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, IRS2, TNF, PPARA, PPARG, BCL2L11, EGFR, TIMP1, ATP2A2, SLC1A2, EDN1, FGF21, SIRT1, CD36, EDNRA, EDNRB, NFKB1, SOD1
GO:0009628	odgovor na abiotski stimulans	1,062E-18	TGFB1, CASP3, BAX, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, BCL2, TNF, PPARA, HMOX1, PPARG, EGFR, ATP2A2, SLC1A2, EDN1, SIRT1, CD36, EDNRA, NFKB1,

			SOD1, SOD2, GPX1, CCND2
GO:0009725	odgovor na hormon	1,114E-18	TGFB1, CASP3, CYP1A2, GRB14, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, PPARG, BCL2L11, EGFR, TIMP1, ATP2A2, EDN1, FGF21, SIRT1, EDNRB, NFKB1
GO:0014070	odgovor na organsko ciklično jedinjenje	1,262E-18	TGFB1, CASP3, ID1, CYP1A2, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, BCL2, TNF, PPARA, PPARG, CPT1A, BCL2L11, EGFR, EDN1, SIRT1, CD36, EDNRA, EDNRB, NFKB1, SOD1
GO:0009719	odgovor na endogeni stimulus	4,131E-18	TGFB1, CASP3, ID1, CYP1A2, GRB14, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, PPARG, BCL2L11, EGFR, TIMP1, ATP2A2, EDN1, FGF21, SIRT1, CD36, NOTCH2, EDNRB, NFKB1, SOD1
GO:0006979	odgovor na oksidativni stres	4,131E-18	CASP3, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, BCL2, TNF, HMOX1, EGFR, ATP2A2, EDN1, SIRT1, CD36, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1
GO:0000302	odgovor na reaktivne vrste kiseonika	5,006E-18	CASP3, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, BCL2, TNF, HMOX1, EGFR, EDN1, SIRT1, CD36, SOD1, SOD2, GPX1

Biološki procesi su navedeni po statističkoj značajnosti, dok je  $p < 0,05$  korišćen kao kriterijum; DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP – dibutil ftalat; BPA – bisfenol A; T2DM: tip 2 dijabetes melitus; GO – ontologija gena.

Tabela 23. Molekularni putevi povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na razvoj T2DM (*TopGene's ToppFun* funkcija - <https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>)

ID	Molekularni put	p-value	Geni
1319989	Put regulacije dugovečnosti	8,970E-12	BAX, PPARGC1A, CAT, RELA, IRS2, PPARG, SIRT1, NFKB1, SOD2
P00006	Signalni put apoptoze	3,136E-11	CASP3, BAX, CASP8, RELA, ATF3, BCL2, TNF, BCL2L11, NFKB1
M10462	Signalni put adipocitokina	3,652E-11	PPARGC1A, RELA, IRS2, TNF, PPARA, CPT1A, CD36, NFKB1
1272486	Insulinska rezistencija	4,853E-11	PPARGC1A, RELA, IRS2, TNF, PPARA, CPT1A, SLC2A2, CD36, NFKB1
M96	Apoptoza izazvana slobodnim radikalima	7,311E-11	RELA, TNF, NFKB1, SOD1, GPX1
1270345	Transkripciona regulacija diferencijacije belih adipocita	3,425E-10	TGFB1, PPARGC1A, RELA, TNF, PPARA, PPARG, CD36, NFKB1
1319988	AGE-RAGE signalni put kod dijabetičkih komplikacija	8,890E-10	TGFB1, CASP3, BAX, RELA, BCL2, TNF, EDN1, NFKB1
M144	Ceramidni signalni put	5,446E-9	BAX, CASP8, RELA, BCL2, TNF, NFKB1
921162	FokO signalni put	8,845E-9	TGFB1, CAT, IRS2, BCL2L11, EGFR, SIRT1, SOD2, CCND2
M162	RKSR i RAR heterodimerizacija sa drugim nuklearnim receptorom	1,836E-8	TGFB1, BCL2, TNF, PPARA, PPARG
1108784	degradacija reaktivnih vrsta kiseonika	2,055E-8	CAT, SOD1, SOD2, GPX1
695200	HIF-1 signalni put	3,251E-8	RELA, BCL2, HMOX1, EGFR, TIMP1, EDN1, NFKB1
M14971	Indukcija apoptoze kroz DR3 i DR4/5 receptore smrti	3,292E-8	CASP3, CASP8, RELA, BCL2, NFKB1
PW:0000009	programirana ćelijska smrt	1,320E-7	CASP3, BAX, CASP8, BCL2
1270268	Unutrašnji put za apoptozu	2,904E-7	CASP3, BAX, CASP8, BCL2, BCL2L11

Molekularni putevi su navedeni po statističkoj značajnosti, dok je  $p < 0,05$  korišćen kao kriterijum DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP – dibutil ftalat; BPA – bisfenol A; T2DM: dijabetes melitus tip 2.

U poslednjem koraku analize, set od 44 DEHP/DBP/BPA gena unet je u *TopGene ToppFun* funkciju sa ciljem da se identifikuju i analiziraju bolesti povezane sa T2DM i pomenutim genima (Tabela 24). Broj prikazanih bolesti je 15, dok su bolesti sa  $p < 0,05$  smatrane statistički značajnim.

Tabela 24. Najvažnijih 15 bolesti povezanih sa T2DM u kojima su uključena 44 gena zajednička za DEHP, DBP, BPA (*TopGene's ToppFun* funkcija - <https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>)

ID	Disease	p-value	Genes
C2711227	Steatohepatitis	3,446E-30	TGFB1, CASP3, BAX, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, ATF3, MIR141, BCL2, IRS2, TNF, ITGA1, PPARA, HMOX1, PPARG, CPT1A, EGFR, TIMP1, SLC1A2, EDN1, SLC2A2, FGF21, SIRT1, CD36, EDNRA, SOD1, SOD2, SHBG
C4529962	Masna bolest jetre	1,097E-29	TGFB1, CASP3, BAX, CYP1A2, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, MIR141, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, HMOX1, PPARG, CPT1A, EGFR, TIMP1, SLC2A2, FGF21, SIRT1, CD36, SOD1, SOD2, GPX1, SHBG
C0020456	Hiperglikemija	1,431E-28	TGFB1, CASP3, BAX, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, ATF3, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, HMOX1, PPARG, CPT1A, EGFR, TIMP1, EDN1, SLC2A2, FGF21, SIRT1, CD36, EDNRA, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, SHBG
C0011881	Dijabetička	6,848E-28	TGFB1, CASP3, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, MIR141, BCL2, IRS2, TNF,

	nefropatija		ITGA1, PPARA, HMOX1, PPARG, CPT1A, EGFR, TIMP1, ATP2A2, EDN1, SLC2A2, FGF21, SIRT1, CD36, NOTCH2, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, SHBG
C0022658	Bolesti bubrega	6,827E-27	TGFB1, CASP3, ID1, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, MIR141, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, HMOX1, PPARG, EGFR, TIMP1, EDN1, SLC2A2, FGF21, SIRT1, CD36, EDNRA, NOTCH2, EDNRB, NFKB1, SOD1, SOD2, SHBG
C0239946	Fibroza, jetra	1,020E-26	TGFB1, CASP3, BAX, S100A6, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, BCL2, IRS2, TNF, ITGA1, PPARA, HMOX1, PPARG, EGFR, TIMP1, EDN1, FGF21, SIRT1, CD36, NOTCH2, EDNRB, NFKB1, SOD2, GPX1, CCND2, SHBG
C1561643	Hronične bolesti bubrega	5,549E-26	TGFB1, CASP3, S100A6, CYP1A2, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, ATF3, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, HMOX1, PPARG, EGFR, TIMP1, EDN1, FGF21, SIRT1, CD36, EDNRA, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, SHBG
C0029456	Osteoporoz	8,150E-26	TGFB1, CASP3, BAX, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, BCL2, IRS2, TNF, ITGA1, PPARA, HMOX1, PPARG, CPT1A, EGFR, TIMP1, FGF21, SIRT1, EDNRA, NOTCH2, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, SHBG
C0011884	Dijabetična retinopatija	2,943E-25	TGFB1, CASP3, BAX, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, BCL2, TNF, PPARA, PPARG, EGFR, TIMP1, EDN1, FGF21, SIRT1, CD36, NOTCH2, NFKB1, SOD1, SOD2, SHBG
C0856169	Endotelna disfunkcija	3,465E-25	TGFB1, CASP3, BAX, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, ATF3, BCL2, TNF, HMOX1, PPARG, EGFR, EDN1, FGF21, SIRT1, CD36, EDNRA, EDNRB, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, SHBG
C0524620	Metabolički sindrom X	4,231E-25	TGFB1, CASP3, BAX, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, ATF3, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, HMOX1, PPARG, CPT1A, EGFR, TIMP1, EDN1, SLC2A2, FGF21, SIRT1, CD36, SOD1, SOD2, GPX1, CCND2, SHBG
C0015695	Masna jetra	1,373E-24	TGFB1, CASP3, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, ATF3, MIR141, IRS2, TNF, ITGA1, PPARA, HMOX1, PPARG, CPT1A, EGFR, SLC1A2, SLC2A2, FGF21, SIRT1, CD36, EDNRA, SOD1, SHBG
C0400966	Bezalkoholna masna bolest jetre	2,370E-24	TGFB1, CASP3, BAX, CASP8, PPARGC1A, AKT1, CAT, RELA, ATF3, MIR141, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, HMOX1, PPARG, CPT1A, EGFR, TIMP1, SLC2A2, FGF21, SIRT1, CD36, SOD1, SOD2, GPX1, SHBG
C0032460	Sindrom policističnih ovarijuma	7,513E-24	TGFB1, CASP3, BAX, S100A6, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, MIR141, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, HMOX1, PPARG, CPT1A, EGFR, EDN1, FGF21, SIRT1, CD36, SOD2, GPX1, CCND2, SHBG
C0010054	Koronarna arterioskleroza	2,797E-23	TGFB1, CASP3, BAX, S100A6, PPARGC1A, AKT1, CAT, HNF1A, RELA, BCL2, IRS2, TNF, PPARA, HMOX1, PPARG, EGFR, TIMP1, EDN1, FGF21, SIRT1, CD36, EDNRA, EDNRB, NFKB1, SOD1, SOD2, GPX1, SHBG

Bolesti su definisane i prikazane po opadajućoj p-vrednosti; DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP – dibutil ftalat; BPA – bisfenol A; T2DM: dijabetes melitus tip 2.

#### 4.1.3.5. Astma

Rezultati *in silico* istraživanja su pokazali da postoji 39, 35 i 80 gena povezanih sa razvojem astme sa kojima DEHP, DBP i BPA stupaju u interakciju, redom. Od toga, 24 gena su istovremeno bila povezana i sa sve tri ispitivane supstance i sa razvojem astme (Tabela 25).

Tabela 25. Geni uključeni u razvoj astme izazvane DEHP, DBP, BPA i njihovom smešom (CTD (<http://CTD.mdibl.org>) + MyVenn CTD alat (<http://ctdbase.org/tools/myVenn.go>))

	Astma
DEHP (39)	ADCYAP1R1   ADRB2   BCL2   CAT   CCL2   CYP2E1   DNMT1   EDN1   GSTM1   GSTP1   HLA-DQB1   HMOX1   HNMT   HSD11B2   IKZF3   IL10   IL1B   IL1RL1   IL4   IL6   KRT19   MMP9   MYB   NOS2   NPY   NQO1   ORMDL3   OVAL   PARP1   PLAU   PTEN   PYHIN1   SCGB3A2   SOD1   TGFB1   TIMP3   TNC   TNF   VEGFA
DBP (35)	ADCYAP1R1   ALDH2   AREG   ARG1   ARG2   BCL2   CAT   CCL2   CTLA4   CYP2E1   DNMT1   EDN1   GSTP1   HMOX1   HSD11B2   ICAM1   IL1B   IL4   IL6   KRT19   MMP9   NQO1   ORMDL3   PARP1   PDE4B   PPP2CA   PTEN   RAD50   SOD1   TGFB1   TIMP3   TNF   TRPA1   TSLP   VEGFA
BPA (80)	ADCY2   ADCYAP1R1   ADRB2   ALDH2   ALOX5   AREG   ARG1   ARG2   BCL2   BGLAP   CAT   CCL11   CCL2   CCL5   CD14   CTLA4   CTNNA3   CXCL14   CYP2E1   DNAH5   DNMT1   EDN1   FOXP3   GSTM1   GSTP1   HLA-DQA1   HLA-DRB1   HLA-G   HMOX1   HNMT   HSD11B2   ICAM1   IFNL3   IKZF3   IL10   IL13   IL1B   IL1RL1   IL1RN   IL33   IL4   IL5   IL6   IL6R   KIF3A   KRT19   MMP1   MMP10   MMP9   MYB   NOS2   NPSR1   NPY   NQO1   ORMDL3   OVAL   PARP1   PDE4B   PDE4D   PLA2G7   PLAU   PPP2CA   PTEN   PTGDR2   RAD50   RNASE3   SCGB3A2   SOD1   SPRR2B   STAT4   TBX21   TGFB1   TIMP3   TNC   TNF   TNIP1   TRPA1   TSLP   VEGFA   WDR36
DEHP/DBP/BPA (24)	ADCYAP1R1   BCL2   CAT   CCL2   CYP2E1   DNMT1   EDN1   GSTP1   HMOX1   HSD11B2   IL1B   IL4   IL6   KRT19   MMP9   NQO1   ORMDL3   PARP1   PTEN   SOD1   TGFB1   TIMP3   TNF   VEGFA

DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP: dibutil ftalat; BPA: bisfenol A

Svi geni iz zajedničkog skupa su kasnije analizirani da bi se utvrdio tip interakcija sa ispitivanim supstancama. Najčešće interakcije su navedene u Tabeli 26 (aktivnost proteina, ekspresija iRNK i ekspresija proteina). U tabeli je način interakcije prikazan strelicama. Dok strelice nadole predstavljaju inhibiciju pomenute interakcije, strelice nagore predstavljaju stimulaciju. U slučaju nekih interakcija, mogu se uočiti oba trenda.

Tabela 26. Interakcije između svake od pojedinačnih supstanci (DEHP, DBP i BPA) i 24 zajednička gena povezana sa razvojem astme (CTD (<http://CTD.mdibl.org>)).

Substance	DEHP			DBP			BPA		
	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina	Aktivnost proteina	Ekspresija iRNK	Ekspresija proteina
ADCYAP1R1		↓			↓			↑↓	
BCL2		↑↓	↓		↑↓	↓		↑↓	↑↓
CAT	↑↓		↑↓		↑↓	↑	↑↓	↑↓	↑↓
CCL2		↑			↑			↑↓	↑↓
CYP2E1		↓		↓				↑↓	
DNMT1		↑↓	↑		↓			↑↓	↑↓
EDN1		↑			↑			↑↓	
GSTP1		↑↓			↑			↑↓	↓
HMOX1		↑↓	↑↓		↓	↑		↑↓	↑
HSD11B2	↓	↓		↓	↓		↓	↑↓	↑
IL1B		↑	↑		↓	↑		↑↓	↑
IL4		↓						↑↓	↑↓
IL6		↑↓	↓			↑		↑↓	↑
KRT19		↑			↑			↑↓	
MMP9		↑	↑↓		↑	↑		↑↓	↑
NQO1		↑	↑↓			↑		↑	
ORMDL3		↑			↑↓			↑	
PARP1					↑↓			↑↓	↓
PTEN		↓	↑↓		↑			↑↓	↑↓
SOD1	↑↓	↓		↓	↓	↓		↑↓	↑
TGFB1		↑↓			↑↓			↑↓	↑↓
TIMP3		↑			↑			↑↓	
TNF		↑↓	↑		↑	↑		↑↓	↑↓
VEGFA		↓			↑↓			↑↓	↑↓

DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP: dibutil ftalat; BPA: bisfenol A; ↑ - povećava; ↓ - smanjuje; ↑↓ - može i da poveća i da smanji (interakcije dvojne prirode).

Zajednički skup gena je dalje korišćen za istraživanje najrelevantnije ontologije gena (biološki procesi i molekularne funkcije), kao i molekularnih putevi indirektno povezanih sa smešom ispitivanih supstanci (Tabela 27). Kao što se može videti u tabeli, većina izdvojenih funkcija bilo je povezano sa apoptozom, inflamacijom i oksidativnim stresom.

Tabela 27. Ontologija gena (GO: biološki procesi i molekularne funkcije) i molekularni putevi povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na razvoj astme (*TopGenne's ToppFun* funkcija – <https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>).

	ID	Ime	p-vrednost	Broj gena
Biološki procesi	GO:0042493	odgovor na lek	6,886E-18	18
	GO:0010941	regulisanje ćelijske smrti	4,175E-17	20
	GO:0000302	odgovor na reaktivne vrste kiseonika	5,378E-17	12
	GO:0042981	regulacija apoptotičkog procesa	2,371E-16	19
	GO:0060548	negativna regulacija ćelijske smrti	2,785E-16	17
	GO:0043067	regulisanje programirane ćelijske smrti	3,305E-16	19
	GO:1901700	odgovor na jedinjenje koje sadrži kiseonik	4,398E-16	19
	GO:0043066	negativna regulacija apoptotičkog procesa	1,275E-15	16
	GO:0043069	negativna regulacija programirane ćelijske smrti	1,793E-15	16

	GO:0072593	metabolički proces reaktivnih vrsta kiseonika	2,839E-14	11
Molekularne funkcije	GO:0005125	aktivnost citokina	1,927E-10	8
	GO:0005102	vezivanje za signalni receptor	4,121E-8	13
	GO:0005126	vezivanje za receptor citokina	7,510E-8	7
	GO:0048018	aktivnost receptorskog liganda	9,547E-8	8
	GO:0030546	aktivnost aktivatora signalnih receptora	1,031E-7	8
	GO:0016209	antioksidativna aktivnost	1,154E-7	5
	GO:0016491	aktivnost oksidoreduktaze	1,174E-7	10
	GO:0004672	aktivnost protein kinaze	1,581E-7	11
	GO:0030545	aktivnost regulatora receptora	1,990E-7	8
GO:0004784	aktivnost superoksid dismutaze	2,792E-7	3	
Molekularni putevi	1470923	Interleukin-4 i 13 signalizacija	4,652E-15	10
	1474302	Stres smicanja tečnosti i ateroskleroza	4,412E-14	10
	1319988	AGE-RAGE signalni put kod dijabetičkih komplikacija	7,641E-12	8
	M167	AP-1 mreža faktora transkripcije	4,050E-11	7
	200309	Reumatoidni artritis	1,420E-8	6
	1474301	IL-17 signalni put	1,732E-8	6
	1269318	Signalizacija od strane Interleukina	1,998E-8	10
	1470924	Interleukin-10 signalizacija	3,003E-8	5
	152665	Malaria	3,003E-8	5
	812256	TNF signalni put	4,267E-8	6

\*sortirani po statističkoj značajnosti ( $p < 0.05$ ); DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP: dibutil ftalat; BPA: bisfenol A

#### 4.1.3.6. Gojaznost

Na osnovu CTD analize, otkriveno je da DEHP, DBP i BPA interaguju sa 84, 90 i 186 gena povezanih sa gojaznošću. Među njima, 53 su bila zajednička za sve tri ispitivane supstance: ACADM, ACLI, AHR, AKT1, ALDH6A1, ANGPTL4, CCL2, CD40, CEBPA, CNR1, CICS, CIP1B1, CIP2E1, DPID, ESR1, FASN, GASG7, GPKS1, HADH, HK2, HMOKS1, HSD11B1, HSPA5, IGF2, IL6, KCNMA1, LDLR, LPL, ME1, MIR184, MMP9, NAMPT, NPI1R, NKO1, NR0B2, NR1I2, NR0B2, NR1I2, NR0B2, NR1I2, NRRKPARP, PPARP1, PPARP1, PARP1, PPARP SAT1, SCD1, SERPINE1, SOD1, SOD2, SREBF1, STS, TFRC i TNF. CTD je korišćen za dalju analizu ovih gena, otkrivajući 31 gen sa podudarajućim interakcijama za sve tri supstance (Tabela 28). Ovo ukazuje na to da ispitivane supstance dele zajedničku molekularnu aktivnost i sugeriše da bi mogle imati sposobnost da deluju zajedno na aditivni način.

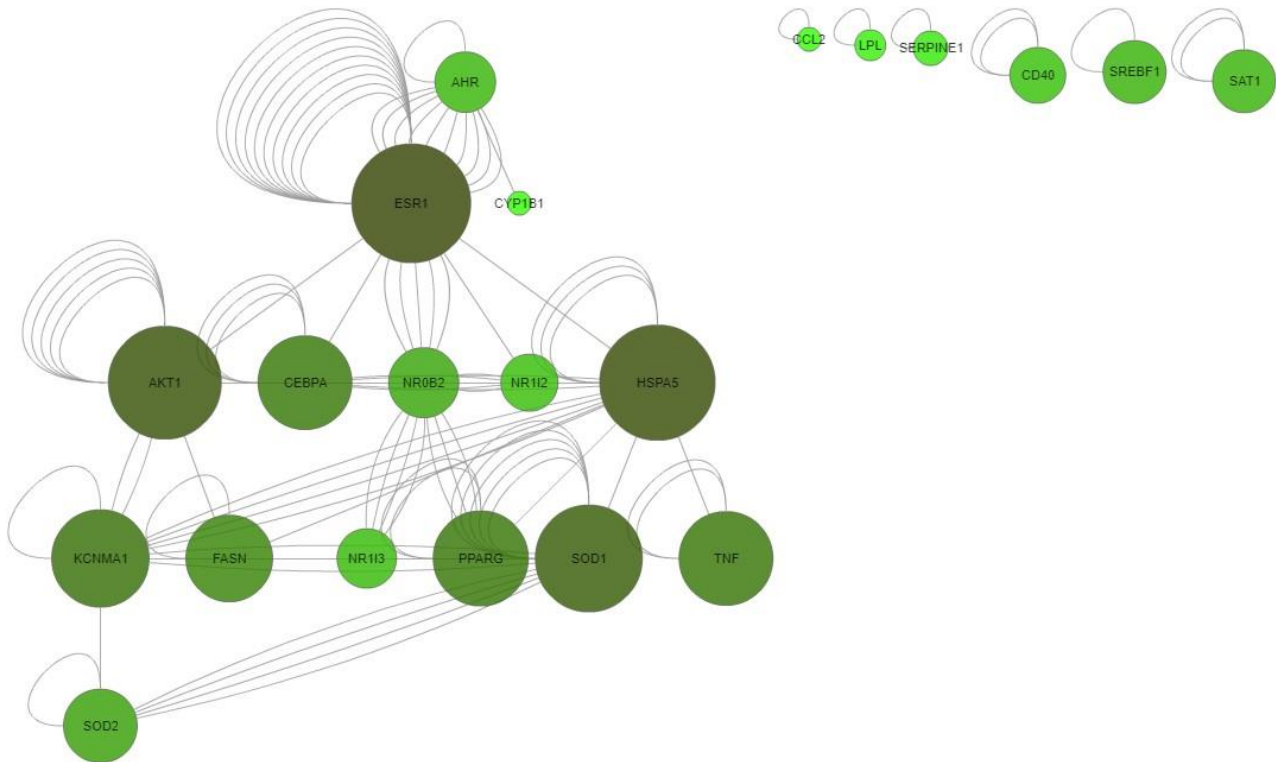
Tabela 28. 31 DEHP/DBP/BPA gen povezan sa razvojem gojaznosti na koji sve tri supstance deluju na isti način (CTD (<http://CTD.mdibl.org>))

Gen	Interakcije zajedničke za sve tri ispitivane supstance	
ACADM	Povećana ekspresija ACADM iRNK	
AHR	Povećana aktivnost AHR proteina *	
AKT1	Povećana fosforilacija AKT1 proteina	
CEBPA	Povećana ekspresija CEBPA iRNK*	
CCL2	Povećana ekspresija CCL2 iRNK	
CD40	Povećana ekspresija CD40 iRNK	
CNR1	Smanjena ekspresija CNR1 iRNK*	
CYCS	Povećana ekspresija CYCS iRNK*	
CYP1B1	Povećana ekspresija koja rezultuje povećanom aktivnošću CYP1B1 proteina	
DPYD	Smanjena ekspresija DPYD iRNK*	
ESR1	Vezuje se za ESR1 što rezultuje povećanom aktivnošću proteina	Povećana ekspresija ESR1 iRNK
FASN	Smanjena ekspresija FASN iRNK*	
HSD11B1	Smanjena ekspresija HSD11B1 iRNK*	
HSPA5	Smanjena ekspresija HSPA5 pr6tein*	
IL6	Povećana ekspresija IL6 protein*	
KCNMA1	Smanjena ekspresija KCNMA1 iRNK	
LPL	Povećana ekspresija LPL iRNK*	
ME1	Povećana ekspresija ME1 iRNK*	

MMP9	Povećana ekspresija MMP9 protein		Povećana ekspresija MMP9 iRNK	
NR0B2	Povećana ekspresija NR0B2 iRNK*			
NR1I2	Povećana aktivnost NR1I2 protein			
NR1I3	Vezuje se za NR1I3		Povećana aktivnost NR1I3 protein	
PPARA	Vezuje se za PPARA protein	Povećana aktivnost PPARA proteina		Smanjena ekspresija PPARA iRNK
PPARG	Vezuje se za PPARG protein		Povećana aktivnost PPARG proteina	
SAT1	Povećana ekspresija SAT1 iRNK			
SCD1	Povećana ekspresija SCD1 iRNK			
SERPINE1	Povećana ekspresija SERPINE1 iRNK			
SOD1	Smanjena ekspresija SOD1 iRNK*			
SOD2	Smanjena ekspresija SOD2 proteina*			
SREBF1	Smanjena ekspresija SREBF1 iRNK*			
TNF	Povećana ekspresija TNF iRNK*		Povećana ekspresija TNF proteina*	

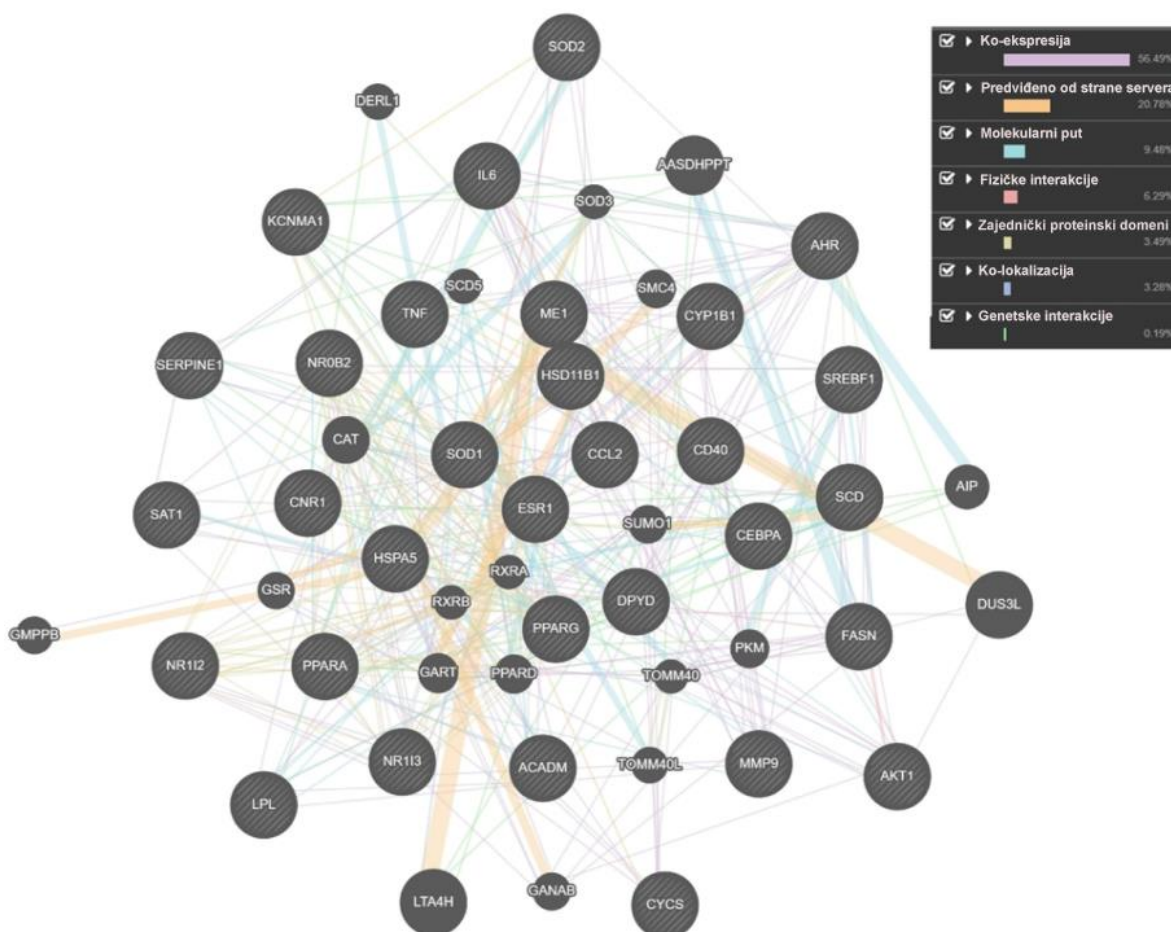
Interakcije označene sa „\*” znače da neka od tri ispitivanih supstanci stupa u interakciju sa određenim genom na više načina, dok je za neke od interakcija utvrđeno da su suprotne (povećava i smanjuje aktivaciju gena, npr), u zavisnosti od različitih faktora povezanih sa izloženošću hemikalijama, kao što su doza, put i trajanje izloženosti, metabolizam, razvojna faza izloženosti, itd.

CTD *SetAnalyser* alat je iskorišćen da bi se izdvojila lista od 97 interakcija za dobijeni skup od 31 gena. U 72 od ovih interakcija *Homo sapiens* je bio označen i kao izvorni i kao ciljani organizam, što ukazuje na značajnost ovih interakcija za ljude. Mapa molekularnih puteva ovih gena (Slika 21) preuzeta je korišćenjem alata CTD *SetAnalyzer*, pri čemu su prikazane interakcije gen-gen izvedene iz BioGRID baze podataka (baza podataka posvećena arhiviranju proteinskih, genetskih i hemijskih interakcija) [159,160]. Mapa interakcija je ručno konfigurisana (spojene ivice i izgled stabla). Na osnovu rezultata CTD analize, sve ove interakcije su bile fizičke, osim jedne (SOD1 sa SOD2), koja je bila genetska.



Slika 21. Mreža interakcija između 31 gena povezanih sa razvojem gojaznosti na koji deluju DEHP, DBP i BPA dobijena pomoću *SetAnalyzer* alata (*SetAnalyzer* CTD tool - <http://ctdbase.org/tools/analyzer.go>; integrisano iz *BioGRID* baze podataka)

Da bi se pružio detaljniji prikaz molekularnih mreža na koje potencijalno utiču ispitivane supstance, *GeneMANIA* server je iskorišćen za analizu interakcija između dobijenog skupa gena. Identifikovana je mreža interakcija koja se sastoji od 31 zajedničkog gena, zajedno sa 20 srodnih gena. Ukupan broj veza između ovih 51 gena bio je 471 (Slika 22). Rezultati su pokazali da je 59,49% našeg skupa gena bilo u ko-ekspresiji, što znači da su njihovi nivoi ekspresije slični u različitim uslovima u studiji o ekspresiji gena. Server je predvideo 20,78% interakcija, 9,48% je pripadalo istom putu, 6,29% je bilo u fizičkim interakcijama, 3,49% je bilo sa zajedničkim proteinskim domenima, 3,28% je bilo u kolokalizaciji, dok su 0,19% bile genetske interakcije.



Slika 22. Konstruisana mreža gena uključenih u razvoj gojaznosti i povezanih sa smešom DEHP/DBP/BPA (*GeneMANIA* prediktivni server - <https://genemania.org>)

Da bi se razjasnio biološki značaj izdvojenog skupa gena, izvršena je analiza molekularnih puteva i ontologije gena (GO). Alat CTD *SetAnalyser* je otkrio da su geni/proteini sa kojima DEHP, DBP i BPA interaguju uključeni u 67, 66 i 117 molekularnih puteva, redom, dok je 42 od njih bilo zajedničko za sve tri supstance. Navedeni prema statističkoj značajnosti ( $p < 0,01$ ), 42 zajednička molekularna puta prikazana su u Tabeli 29. *TopGenne ToppFun* funkcija iskorišćena je za izdvajanje 10 najvažnijih GO: bioloških procesa uključenih u razvoj gojaznosti na koje utiču sve tri ispitivane supstance ( $p < 0,05$ ) (Tabela 30).

Tabela 29. Molekularni putevi povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na razvoj gojaznosti (CTD (<http://CTD.mdibl.org>) – *MyVenn* (<http://ctdbase.org/tools/myVenn.go>) i *SetAnalyser* CTD alati (<http://ctdbase.org/tools/analyzer.go>))

Molekularni putevi*	Identifikacioni broj
Metabolizam	REACT:R-HSA-1430728
Metabolizam lipida i lipoproteina	REACT:R-HSA-556833
Nealkoholna masna bolest jetre	KEGG:hsa04932
Metabolički putevi	KEGG:hsa01100
Metabolizam masnih kiselina, triacilglicerola i ketonskih tela	REACT:R-HSA-535734
PPARA aktivira ekspresiju gena	REACT:R-HSA-1989781
Regulacija metabolizma lipida pomoću receptora alfa aktiviranog proliferatorom peroksizoma (PPAR $\alpha$ )	REACT:R-HSA-400206
Transkripciona regulacija diferencijacije belih adipocita	REACT:R-HSA-381340
Put transkripcije nuklearnih receptora	REACT:R-HSA-383280



Insulinska rezistencija	KEGG:hsa04931
Interleukin-4 i 13 signalizacija	REACT:R-HSA-6785807
PPAR signalni put	KEGG:hsa03320
Detoksikacija reaktivnih kiseoničnih vrsta	REACT:R-HSA-3299685
Stres smicanja tečnosti i ateroskleroza	KEGG:hsa05418
Signalna transdukcija	REACT:R-HSA-162582
Malarija	KEGG:hsa05144
AGE-RAGE signalni put kod dijabetičkih komplikacija	KEGG:hsa04933
HIF-1 signalni put	KEGG:hsa04066
Amiotrofična lateralna skleroza (ALS)	KEGG:hsa05014
Čakasova bolest (američka tripanosomijaza)	KEGG:hsa05142
Metabolizam vitamina i kofaktora	REACT:R-HSA-196854
TNF signalni put	KEGG:hsa04668
Integracija energetskog metabolizma	REACT:R-HSA-163685
Molekularni putevi povezani sa kancerom	KEGG:hsa05200
Metabolizam ugljenika	KEGG:hsa01200
Varenje lipida, mobilizacija i transport	REACT:R-HSA-73923
AMPK signalni put	KEGG:hsa04152
Generički put transkripcije	REACT:R-HSA-212436
Transport lipida posredovan hilomikronom	REACT:R-HSA-174800
Cirkadijalni ritam	REACT:R-HSA-400253
Insulinski signalni put	KEGG:hsa04910
Metabolizam lipoproteina	REACT:R-HSA-174824
Metabolizam masnih kiselina	KEGG:hsa01212
Interleukin-10 signalizacija	REACT:R-HSA-6783783
Steroidogeneza jajnika	KEGG:hsa04913
Signalizacija citokina u imunom sistemu	REACT:R-HSA-1280215
Regulacija lipolize u adipocitima	KEGG:hsa04923
Biosinteza steroidnih hormona	KEGG:hsa00140
Hemostaza	REACT:R-HSA-109582
Put regulacije dugovečnosti - više vrsta	KEGG:hsa04213
Signalni put adipocitokina	KEGG:hsa04920
Signalizacija od strane Interleukina	REACT:R-HSA-449147

\*Navedeni po statističkoj značajnosti ( $p < 0,01$ )

Tabela 30. Ontologija gena – GO: biološki procesi i molekularne funkcije povezani sa uticajem ispitivane smeše (DEHP, DBP i BPA) na razvoj gojaznosti (*TopGenne's ToppFun* funkcija - <https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>)

	Name	ID	p-value	
Biološki procesi	odgovor na organsko ciklično jedinjenje	GO:0014070	3,813E-17	SREBF1, KCNMA1, AHR, CYP1B1, CCL2, DPYD, AKT1, TNF, NR1I2, PPARA, CEBPA, PPARG, HSPA5, NR0B2, IL6, NR1I3, ESR1, CNR1, SOD1
	odgovor na jedinjenje koje sadrži kiseonik	GO:1901700	2,386E-15	SREBF1, KCNMA1, AHR, CYP1B1, CCL2, AKT1, TNF, PPARA, PPARG, MMP9, ME1, HSPA5, NR0B2, SCD, IL6, ESR1, CNR1, LPL, SOD1, SOD2, SERPINE1
	odgovor na lipide	GO:0033993	8,096E-15	SREBF1, KCNMA1, AHR, CCL2, AKT1, TNF, NR1I2, PPARA, PPARG, NR0B2, SCD, IL6, NR1I3, ESR1, CNR1, LPL, SERPINE1,
	lipidni metabolički proces	GO:0006629	1,371E-14	SREBF1, KCNMA1, CYP1B1, AKT1, FASN, TNF, NR1I2, PPARA, CEBPA, HSD11B1, PPARG, ACADM, ME1, NR0B2, SCD, ESR1, CNR1, LPL, SOD1
	regulacija metabolizma lipida	GO:0019216	4,913E-14	, SREBF1, KCNMA1, AKT1, FASN, TNF, PPARA, PPARG, ACADM, ME1, SCD, ESR1, CNR1, SOD1
	metabolizam steroidnih hormona	GO:0008202	1,117E-13	SREBF1, KCNMA1, AHR, CYP1B1, DPYD, TNF,

				NR1I2, PPARA, PPARG, MMP9, HSPA5, IL6, CNR1, LPL, SOD1, SOD2, SERPINE1,
	odgovor na lek	GO:0042493	1,475E-13	SREBF1, KCNMA1, AHR, CYP1B1, DPYD, TNF, NR1I2, PPARA, PPARG, MMP9, HSPA5, IL6, CNR1, LPL, SOD1, SOD2, SERPINE1,
	ćelijski odgovor na lipide	GO:0071396	2,001E-13	SREBF1, KCNMA1, AHR, CYP1B1, DPYD, TNF, NR1I2, PPARA, PPARG, MMP9, HSPA5, IL6, CNR1, LPL, SOD1, SOD2, SERPINE1,
	ćelijski odgovor na organsko ciklično jedinjenje	GO:0071407	2,266E-13	AHR, CYP1B1, CCL2, AKT1, TNF, NR1I2, PPARA, CEBPA, PPARG, HSPA5, NR0B2, NR1I3, ESR1, SOD1
	zapaljenski odgovor	GO:0006954	3,331E-12	CCL2, AKT1, TNF, PPARA, CEBPA, PPARG, MMP9, IL6, ESR1, CNR1, LPL, SOD1, CD40, SERPINE1
Molekularne funkcije	aktivnost nuklearnih receptora	GO:0004879	1,496E-12	SREBF1, AHR, NR1I2, PPARA, PPARG, NR1I3, ESR1
	aktivnost transkripcionog faktora aktiviranog ligandom	GO:0098531	1,496E-12	SREBF1, AHR, NR1I2, PPARA, PPARG, NR1I3, ESR1
	aktivnost oksidoreduktaze	GO:0016491	5,257E-12	CYP1B1, DPYD, AKT1, FASN, TNF, PPARA, HSD11B1, ACADM, ME1, SCD, ESR1, CNR1, SOD1, SOD2, CYCS,
	aktivnost receptora steroidnih hormona	GO:0003707	3,204E-10	NR1I2, PPARA, PPARG, NR0B2, NR1I3, ESR1
	identično vezivanje za proteine	GO:0042802	1,117E-9	KCNMA1, AHR, DPYD, AKT1, FASN, TNF, CEBPA, PPARG, MMP9, SAT1, ACADM, HSPA5, NR0B2, ESR1, LPL, SOD1, SOD2
	vezivanje jona prelaznog metala	GO:0046914	7,500E-8	CYP1B1, DPYD, NR1I2, PPARA, PPARG, MMP9, ME1, SCD, NR1I3, ESR1, SOD1, SOD2
	aktivnost dimerizacije proteina	GO:0046983	3,116E-7	SREBF1, KCNMA1, AHR, DPYD, AKT1, FASN, PPARA, CEBPA, PPARG, HSPA5, NR0B2, LPL, SOD1
	aktivnost superoksid dismutaze	GO:0004784	6,187E-7	TNF, SOD1, SOD2
	aktivnost oksidoreduktaze, koja deluje na superoksidne radikale kao akceptor	GO:0016721	6,187E-7	TNF, SOD1, SOD2
	aktivnost oksidoreduktaze, koja deluje na uparene donore, sa ugradnjom ili redukcijom molekularnog kiseonika	GO:0016705	1,564E-6	CYP1B1, AKT1, TNF, SCD, ESR1, CNR1

\*Izvrstani na osnovu statističke značajnosti ( $p < 0.05$ )

Skup od 31 gena je dalje analiziran korišćenjem *ToppGene ToppFun* funkcije otkrivajući 10 najvažnijih komorbiditeta gojaznosti u koje su ovi geni uključeni (Tabela 31). Utvrđeno je da je sedam gena (CCL2, IL6, LPL, PPARA, PPARG, SERPINE1 i TNF) povezano sa svih 10 najvažnijih komorbiditeta koje je ToppFun funkcija navela.

Tabela 31. Najvažnijih 10 komorbiditeta gojaznosti u koje je uključen 31 gen zajednički za sve tri ispitivane supstance (DEHP, DBP, BPA) (*TopGenes's ToppFun* funkcija - <https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>)

Bolest*	p vrednost	Geni
Metabolički sindrom X	1,114E-28	SREBF1, AHR, CCL2, AKT1, TNF, NR1I2, PPARA, CEBPA, HSD11B1, PPARG, MMP9, SAT1, HSPA5, NR0B2, SCD1, IL6, NR1I3, ESR1, CNR1, LPL, SOD2, CD40, SERPINE1
Steatohepatitis	2,083E-28	SREBF1, AHR, CYP1B1, CCL2, DPYD, AKT1, FASN, TNF, NR1I2, PPARA, CEBPA, PPARG, MMP9, HSPA5, NR0B2, SCD1, IL6, CNR1, LPL, SOD1, SOD2, CYCS, SERPINE1
Masna jetra	4,781E-27	SREBF1, AHR, CYP1B1, CCL2, FASN, TNF, NR1I2, PPARA, CEBPA, HSD11B1, PPARG, MMP9, HSPA5, NR0B2, SCD1, IL6, LPL, SOD1, SOD2, CYCS, SERPINE1
Dijabetes melitus, nezavisan od insulina	6,425E-23	SREBF1, AHR, CYP1B1, CCL2, AKT1, FASN, TNF, NR1I2, PPARA, CEBPA, HSD11B1, PPARG, MMP9, SAT1, ME1, HSPA5, NR0B2, SCD1, IL6, NR1I3, ESR1, CNR1, LPL, SOD2, SERPINE1
Šećerna bolest	6,160E-20	SREBF1, KCNMA1, CCL2, AKT1, FASN, TNF, NR1I2, PPARA, CEBPA, HSD11B1, PPARG, MMP9, HSPA5, NR0B2, SCD1, IL6, NR1I3, ESR1, CNR1, LPL, SOD1, SOD2, CD40, SERPINE1
Bezalkoholna masna bolest jetre	1,110E-19	SREBF1, CCL2, AKT1, FASN, TNF, NR1I2, PPARA, CEBPA, HSD11B1, PPARG, HSPA5, NR0B2, IL6, LPL, SOD2, SERPINE1

Neoplazme jetre	1,849E-19	SREBF1, AHR, CYP1B1, CCL2, DPYD, AKT1, FASN, TNF, NR1I2, PPARA, CEBPA, PPARG, MMP9, SAT1, HSPA5, NR0B2, SCD1, IL6, NR1I3, ESR1, LPL, SOD1, SERPINE1
Koronarna arterijska bolest	2,705E-19	SREBF1, KCNMA1, CCL2, AKT1, TNF, NR1I2, PPARA, HSD11B1, PPARG, MMP9, HSPA5, SCD1, IL6, ESR1, CNR1, LPL, SOD1, SOD2, CD40, SERPINE1
Kardiovaskularne bolesti	2,257E-18	CYP1B1, CCL2, TNF, NR1I2, PPARA, CEBPA, HSD11B1, PPARG, MMP9, NR0B2, SCD, IL6, ESR1, CNR1, LPL, SOD2, CD40, SERPINE1
Koronarna arterioskleroza	3,199E-18	SREBF1, CCL2, AKT1, TNF, NR1I2, PPARA, HSD11B1, PPARG, MMP9, HSPA5, SCD, IL6, ESR, CNR1, LPL, SOD1, SOD2, CD40, SERPINE1
<b>Geni/proteini uključeni u sve komorbiditete: CCL2, IL6, LPL, PPARA, PPARG, SERPINE1, TNF</b>		

\*Definisani i sortirani po statističkoj značajnosti ( $p < 0.05$ )

Zatim, DisGeNET baza podataka iskorišćena je za izdvajanje najznačajnijih parova gen-bolest za odabranih 7 gena. Ova baza podataka može se koristiti za integraciju i rangiranje povezanosti gena i bolesti. DisGeNET rangiranje uzima u obzir broj publikacija koje podržavaju asocijaciju, pri čemu se dodeljene vrednosti kreću od 0 do 1. Viši rezultat predstavlja veću povezanost [161]. Među filtriranim uparenim gen-bolest parovima, najviši rezultat povezanosti je pronađen između LPL i hiperlipoproteinemije tipa I (1.000) i PPARG i porodične delimične lipodistrofije, tip 3 (0.940). Za gojaznost je utvrđeno da PPARG i LPL imaju najviši rezultat povezanosti, 0,900 i 0,600, redom (Tabela 32).

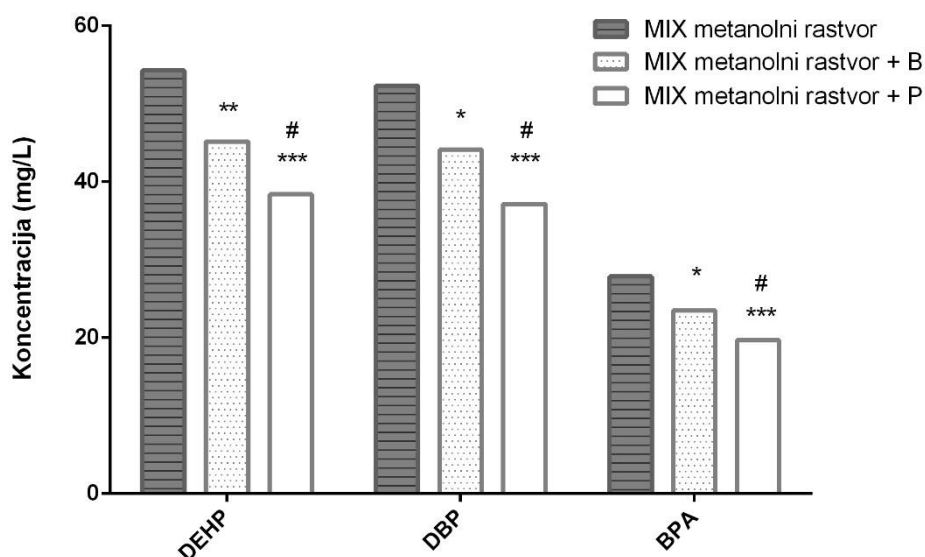
Tabela 32. Najznačajniji gen-bolest parovi za odabranih 7 gena - CCL2, IL6, LPL, PPARA, PPARG, SERPINE1, TNF (*DisGeNET* baza podataka - <http://www.disgenet.org>)

Gen	Bolest	Klasa bolesti	Jačina povezanosti gen-bolest
LPL	Hiperlipoproteinemija tip I	Urođene, nasledne i neonatalne bolesti i abnormalnosti; Bolesti ishrane i metabolizma	1,000
PPARG	Porodična delimična lipodistrofija, tip 3	Bolesti ishrane i metabolizma; Bolesti kože i vezivnog tkiva	0,940
PPARG	Gojaznost	Bolesti ishrane i metabolizma; Patološka stanja, znaci i simptomi	0,900
TNF	Reumatoidni artritis	Bolesti imunskog sistema; Bolesti mišićno-skeletnog sistema; Bolesti kože i vezivnog tkiva	0,700
PPARG	Hipertenzivna bolest	Kardiovaskularne bolesti	0,700
TNF	Inflamatorne bolesti creva	Bolesti digestivnog sistema	0,600
TNF	Dijabetes melitus, nezavisan od insulina	Bolesti endokrinog sistema; Bolesti ishrane i metabolizma	0,600
LPL	Gojaznost	Bolesti ishrane i metabolizma; Patološka stanja, znaci i simptomi	0,600
PPARG	Maligni tumor debelog creva	Bolesti digestivnog sistema; Neoplazme	0,600
TNF	Kongestivna srčana insuficijencija	Kardiovaskularne bolesti	0,600
TNF	Otkazivanje srca	Kardiovaskularne bolesti	0,600
SERPINE1	Hipertenzivna bolest	Kardiovaskularne bolesti	0,600
TNF	Hipertenzivna bolest	Kardiovaskularne bolesti	0,600
TNF	Infarkt miokarda	Kardiovaskularne bolesti	0,600
CCL2	Zatajenje bubrega, hronično	Urogenitalne bolesti i komplikacije u trudnoći	0,600
PPARG	Porodična parcijalna lipodistrofija	Bolesti ishrane i metabolizma; Bolesti kože i vezivnog tkiva	0,600
LPL	Hiperholesterolemija, porodična	Urođene, nasledne i neonatalne bolesti i abnormalnosti; Bolesti ishrane i metabolizma	0,600

## 4.2. ISPITIVANJE PROTEKTIVNOG DEJSTVA PROBIOTIKA

### 4.2.1. *In vitro* rezultati uticaja probiotika na smanjenje koncentracije ftalata i bisfenola A

Izračunati procenat smanjenja koncentracije za tri ispitivane supstance bio je sledeći: za višekomponentni probiotski preparat (P) procenat smanjenja ispitivanih supstanci unutar smeše iznosio je 29,25, 29,04 i 41,75% za DEHP, DBP i BPA, redom, a za *Saccharomyces boulardii* (B) 16,79, 15,66% i 15,66% za DEHP, DBP i BPA, redom. Koncentracije supernatanta ispitivanih supstanci takođe su upoređene sa onima u pozitivnoj kontroli (Slika 23), ukazujući na to da se najniža koncentracija u supernatantu mogla primetiti nakon inkubacije sa višekomponentnim probiotikom.



Slika 23. Koncentracije ispitivanih supstanci DEHP, DBP, BPA prisutnih u smeši nakon inkubacije kada je prisutna sama smeša ispitivanih supstanci (MIX metanolni rastvor), nakon inkubacije sa jednokomponentnim probiotskim preparatom (MIX metanolni rastvor + B), nakon inkubacija sa višekomponentnim probiotskim preparatom (MIX rastvor metanola + P)

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (u poređenju sa pozitivnom kontrolom – MIX); #  $p < 0,05$  (u poređenju sa koncentracijom u MIX + B supernatantu).

### 4.2.2. *In vivo* rezultati na modelu pacova

#### 4.2.2.1. Prirast telesne mase

Tabela 33 prikazuje prirast telesne mase (engl. *Body weight gain*, BWG) u četiri praćena perioda tokom eksperimenta, kao i procentualnu razliku sa kontrolom za sve vrednosti.

Nakon prve nedelje eksperimenta, zabeležen je značajan pad telesne mase u MIX grupi u poređenju sa kontrolom, kao i u poređenju sa P i MIX + P grupom, dok u MIX + P i P grupi nije zabeležena značajna promena u poređenju sa kontrolom. Nakon druge nedelje zabeležen je značajan pad samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolom. Nakon treće nedelje, smanjenje prirasta mase u poređenju sa kontrolom bilo je prisutno u svim tretiranim grupama, mada je bilo izraženije u MIX grupi (-20%) nego u P (-13%) i MIX + P (-15%) grupi. Međutim, nakon četvrte nedelje tretmana, smanjenje prirasta mase mogo je da se primeti samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolom.

Tabela 33. Prirast telesne mase nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

		1. nedelja	2. nedelja	3. nedelja	4. nedelja
Kontrola	BWG	0,4344 ± 0,05996	0,8265 ± 0,1092	1,151 ± 0,1708	1,425 ± 0,2461
P	BWG	0,3964 ± 0,01380	0,7632 ± 0,01317	0,9973 ± 0,03611*	1,317 ± 0,07116
	% u odnosu	-9	-8	-13	-8

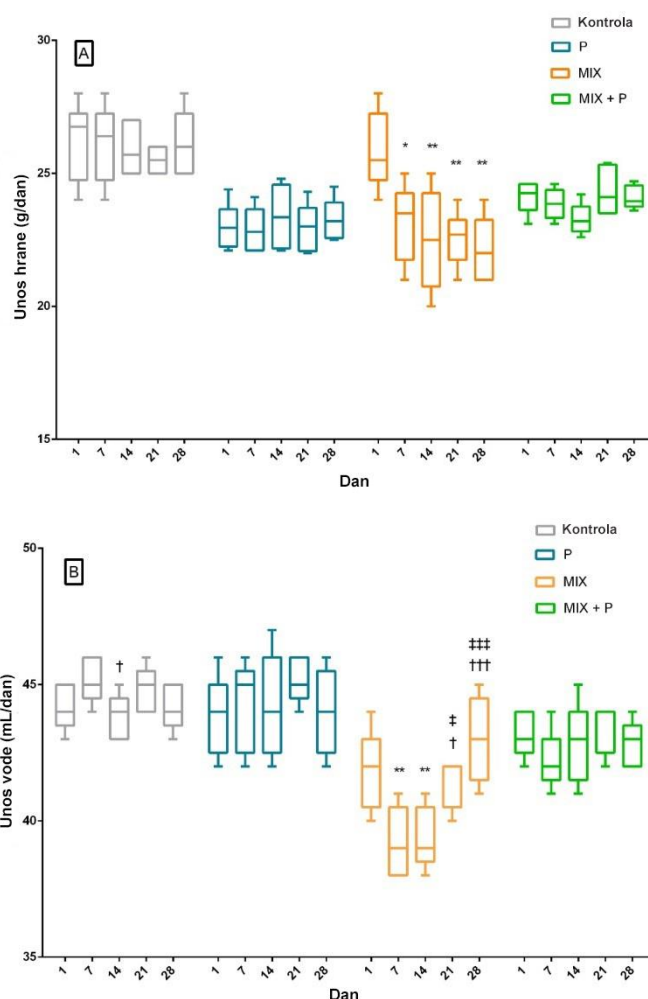
	na kontrolu				
MIX	BWG	0,3190 ± 0,03681***††	0,6459 ± 0,04416***	0,9237 ± 0,3505**	1,147 ± 0,1048**
	% u odnosu na kontrolu	-27	-22	-20	-20
MIX + P	BWG	0,3887 ± 0,02272‡‡	0,7486 ± 0,009676	0,9759 ± 0,05624*	1,277 ± 0,02415
	% u odnosu na kontrolu	-11	-9	-15	-10

Eksperimentalne grupe: Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg b.w/day DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA; MIX + P: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg b.w/day DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA + Probiotik; \* p < 0.05, \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 (u odnosu na kontrolu); †† p < 0.01 (u odnosu na P grupu), ‡‡ p < 0.01 (u odnosu na MIX grupu. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti i standardne devijacije. (n = 6). BWG: prirast telesne mase (engl. *Body weight gain*).

#### 4.2.2.2. Unos hrane i vode

ANOVA za ponovljena merenja sa LSD post hoc testom sprovedena je kako bi se procenilo da li postoji promena u unosu hrane i vode tokom vremena u svakoj eksperimentalnoj grupi između pet različitih vremenskih perioda tokom eksperimenta (1, 7, 14, 21. i 28. dan studije) (Slike 24A i 24B). U grupi MIX, smanjenje unosa hrane primećeno je nakon prve nedelje tretmana (p < 0,05). Unos hrane nastavio je da se smanjuje kako je eksperiment tekao (p < 0,01 nakon druge nedelje tretmana, ostajući na tom nivou značajnosti do kraja eksperimenta). U svim ostalim grupama nisu zabeležene značajne razlike u unosu hrane između odabranih vremenskih perioda (slika 24A). Kao što je prikazano u Tabeli 34, primećen je značajan pad ukupnog unosa hrane u MIX grupi u poređenju sa kontrolom, kao i u poređenju sa grupama P i MIX + P. Ukupni unos hrane i u P i u MIX + P grupi bio je nešto niži u poređenju sa kontrolom (p < 0,05). Međutim, primećeni pad nije bio toliko izražen kao u MIX grupi (p < 0,001) (Tabela 34).

Fluktuacije u unosu vode bile su najuočljivije u MIX grupi, gde su uočene značajne razlike između 1. i 7, 1. i 14, 7. i 21, 14. i 21, 7. i 28, kao i 14. i 28. dana, što nije bio slučaj u svim ostalim grupama. Ukupan unos vode bio je značajno niži u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom, P i MIX + P grupom. Značajna razlika u poređenju sa kontrolom može se zabeležiti i u MIX + P grupi (p < 0,05), ali nije bila tako izražena kao u MIX grupi (p < 0,001).



Slika 24. A. Unos hrane (g/dan) i B. vode (mL/dan) nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

Eksperimentalne grupe: Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg b.w/day DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA; MIX + P: Smeša (50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg b.w/day DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA) + Probiotik. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (u odnosu na 1. dan eksperimenta). †  $p < 0,05$ , †††  $p < 0,001$  (u odnosu na 7. dan eksperimenta), ‡  $p < 0,05$ , ‡‡‡  $p < 0,001$  (u odnosu na 14. dan eksperimenta). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*). Svaki dijagram predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), linija unutar okvira predstavlja srednju vrednost, a krajnje ivice minimalne i maksimalne vrednosti unutar grupe.

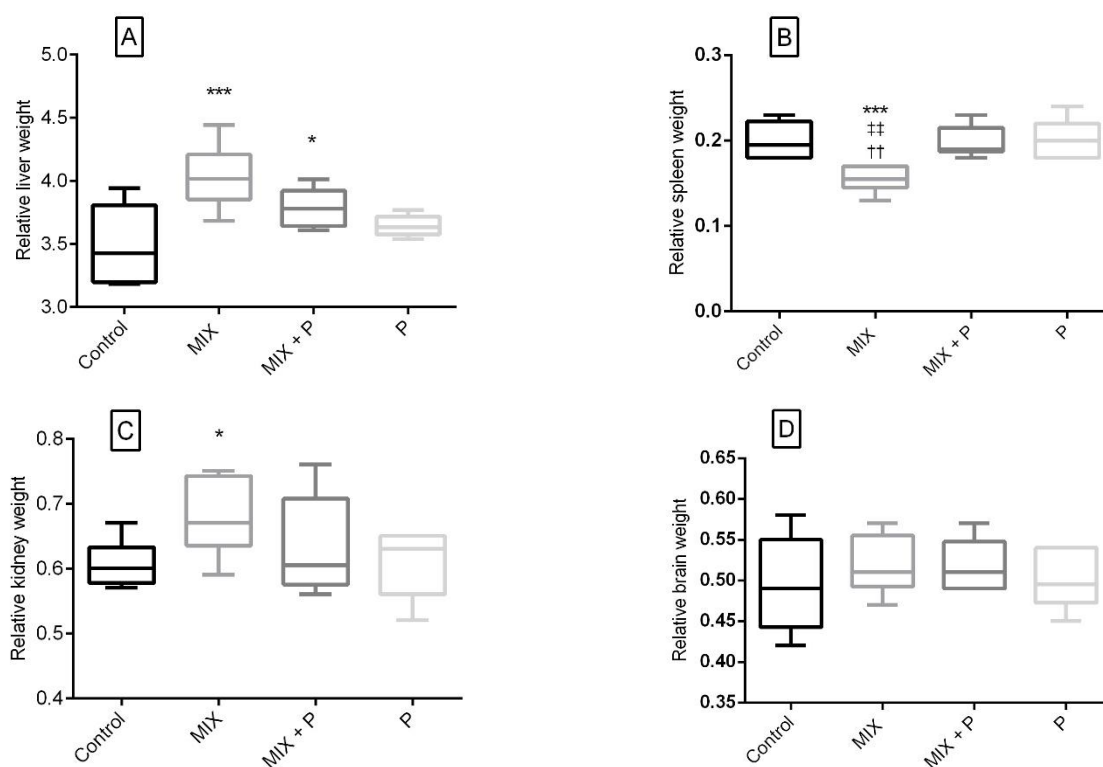
Tabela 34. Ukupan unos hrane i vode nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

		Kontrola	P	MIX	MIX + P
Ukupan unos hrane G,	Srednja vrednost	25,16	24,36*	22,66***†††	24,42***‡‡‡
	SD	1,261	1,373	1,102	1,439
Ukupan unos vode (mL)	Srednja vrednost	44,68	44,21	41,18***†††	43,04***‡‡‡
	SD	3,198	2,843	2,294	2,116

Eksperimentalne grupe: Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg b.w/day DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA; MIX + P: Smeša (50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg b.w/day DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA) + Probiotik. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*). Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti i standardne devijacije (n=6). \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (u odnosu na kontrolu), †  $p < 0,05$ , †††  $p < 0,001$  (u odnosu na P grupu), ‡‡  $p < 0,05$  (u odnosu na MIX grupu).

#### 4.2.2.3. Relativne mase organa

Relativne mase organa pacova nakon 28 dana izlaganja DEHP, DBP, BPA smeši, smeši sa dodatkom probiotika i probiotiku tokom 28 dana predstavljene su na Slici 25. Zabeležen je značajan porast relativne mase jetre u MIX grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,001$ ), kao i u poređenju sa P grupom ( $p < 0,05$ ). U grupi MIX + P takođe je zabeležen značajan porast relativne mase jetre u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,05$ ), mada ne toliko izražen kao u grupi MIX (Slika 25A). Značajan pad zabeležen je u relativnoj težini slezine u poređenju sa kontrolom, kao i kod svih ostalih tretiranih grupa (Slika 25B), dok je zabeležen značajan porast relativne mase bubrega u poređenju sa kontrolom (Slika 25C). Međutim, nije bilo značajne promene u relativnoj težini mozga među eksperimentalnim grupama (Slika 25D).



Slika 25. Relativna masa organa nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

A. relativna masa jetre, B. relativna masa slezine, C. relativna masa bubrega, D. relativna masa mozga. Eksperimentalne grupe: Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: smeša (50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA); MIX + P: smeša (50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA) + probiotik \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (u poređenju sa kontrolom), †  $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$  (u poređenju sa P grupom); ‡‡  $p < 0,01$  (u poređenju sa MIX grupom). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference*, LSD). Svaki dijagram predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), linija unutar okvira predstavlja srednju vrednost, a krajevi minimalne i maksimalne vrednosti unutar grupe.

#### 4.2.2.4. Hematološki parametri

Hematološki parametri izmereni u delu istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije koje se tiče ispitivanja protektivnog dejstva probiotika predstavljeni su u Tabeli 35. Nakon izlaganja smeši ftalata i BPA tokom 28 uzastopnih dana, u MIX grupi zabeleženo je značajno povišenje vrednosti WBC, LIM, NEU, MON, RBC, HGB, HCT i MCHC u poređenju sa kontrolom. Primena probiotika u MIX + P grupi smanjila je sve gore pomenute parametre, što je rezultiralo time da se nijedan od njih nije značajno razlikovao u poređenju sa kontrolom. Nijedan od izmerenih parametara u P grupi se takođe nije razlikovao u poređenju sa kontrolom. Međutim, značajna razlika u koncentraciji HGB primećena je u MIX grupi u poređenju sa MIX + P i P grupama.

Tabela 35. Hematološki parametri nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

Parametar		Kontrola	P	MIX	MIX + P
WBC (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	5,400	5,680	8,700**	5,833
	SD	1,740	1,740	0,8958	1,924
NEU (%)	Srednja vrednost	6,680	6,580	5,833	6,800
	SD	1,983	1,608	0,7581	0,3916
LYM (%)	Medijana	86,40	73,30	93,10*	87,55
	Opseg	84,75 – 88,20	72,80 – 87,40	91,48 – 93,53	74,68-90,55
MON (%)	Srednja vrednost	0,4333	0,6200	0,9200*	0,7000
	SD	0,1633	1,643	0,3114	0,3578
EOS (%)	Medijana	0,4500	0,2000	0,1500	0,2500
	Opseg	0,2750 – 0,5250	0,1500 – 0,3000	0,1000 – 0,3750	0,2000 – 0,3500
BAS (%)	Srednja vrednost	0,6000	0,4800	0,5167	0,5333
	SD	0,2000	0,2387	0,2639	0,1211
NEU (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	0,4583	0,4600	0,6260*	0,4100
	SD	0,1157	0,1427	0,05737	0,09345
LYM (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	4,810	4,960	7,440**	5,033‡
	SD	0,3540	1,179	2,180	1,958
MON (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	0,03667	0,03833	0,06333	0,0400
	SD	0,02503	0,01941	0,04274	0,02098
EOS (10 <sup>9</sup> /L)	Medijana	0,0200	0,0200	0,0150	0,0150
	Opseg	0,0150 – 0,0250	0,0100 – 0,0200	0,0100 – 0,0225	0,0100 – 0,0200
BAS (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	0,03333	0,0408	0,04317	0,0395
	SD	0,01325	0,02126	0,02740	0,02038
RBC (10 <sup>12</sup> /L)	Srednja vrednost	7,100	7,070	7,940*	7,348
	SD	0,5571	0,4006	0,6403	0,4528
HGB (g/L)	Srednja vrednost	138,0	138,0	151,7*†	140,7‡
	SD	2,550	6,481	2,0101	7,967
HCT (%)	Srednja vrednost	0,4400	0,4292	0,4940**†	0,4448‡
	SD	0,02052	0,02349	0,01937	0,0281
MCV (fL)	Srednja vrednost	61,37	60,53	62,23	60,53
	SD	1,857	2,099	1,773	0,8618
MCH (pg)	Srednja vrednost	19,12	19,08	19,10	19,03
	SD	0,5020	0,5933	0,3735	0,2422
MCHC (g/L)	Srednja vrednost	313,2	314,4	317,5*	315,0
	SD	3,114	5,367	4,215	2,966
PLT (10 <sup>9</sup> /L)	Srednja vrednost	548,0	520,6	589,4	521,2
	SD	22,64	56,65	55,89	71,42

Eksperimentalne grupe: Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA; MIX + P: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA + probiotik. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (u poređenju sa kontrolom); †  $p < 0,05$  (u poređenju sa P grupom); ‡  $p < 0,05$  (u poređenju sa MIX grupom). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*)/Neparametarski *Kruskal–Wallis* test + *Dunn* test. WBC: Bela krvna zrnca, NEU: Neutrofili, LYM: Limfociti, MON: Monociti, EOS: Eozinofili, BAS: Bazofili, RBC: Crvena krvna zrnca, HGB: Hemoglobin, HCT: Hematokrit, MCV: Srednja korpuskularna zapremina, MCH: Srednja korpuskularna hemoglobin, MCHC: Srednja koncentracija korpuskularnog hemoglobina, PLT: Trombociti.

#### 4.2.2.5. Biohemijski parametri

Tabela 36 predstavlja serumske biohemijske parametre nakon 28 dana izlaganja DEHP, DBP, BPA smeši, smeši sa dodatkom probiotika i probiotiku. Od parametara povezanih sa jetrom, u MIX grupi zabeleženo je značajno povišenje aktivnosti ALT, AST i koncentracije ukupnog bilirubina u poređenju sa kontrolom. Ukupni nivo bilirubina i ALT takođe su se značajno razlikovali u poređenju sa P grupom. Takođe, došlo je do značajnog povišenja aktivnosti ALT u MIX grupi u poređenju sa MIX + P. U slučaju ukupnog nivoa bilirubina i aktivnosti AST, nije bilo značajne razlike između MIX i MIX + P grupa, ali ni značajne razlike između MIX + P grupe i kontrole. Nije bilo značajne razlike u *De Ritis* odnosu i direktnom nivou bilirubina ni u jednoj eksperimentalnoj grupi u poređenju sa kontrolom, kao ni između tretiranih grupa. Značajan porast nivoa glukoze u poređenju sa kontrolom zabeležen je samo u MIX grupi. Od parametara lipidnog profila, zabeležen je značajan pad nivoa holesterola samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolom. Značajno povišenje nivoa LDL moglo se zabeležiti u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,05$ ), što je bilo još izraženije u poređenju sa P grupom ( $p < 0,001$ ). Značajno sniženje nivoa HDL zabeleženo je



samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolom. Postojala je značajna razlika između nivoa gvožđa u serumu u MIX grupi u poređenju sa P grupom, kao i između MIX i MIX + P grupa.

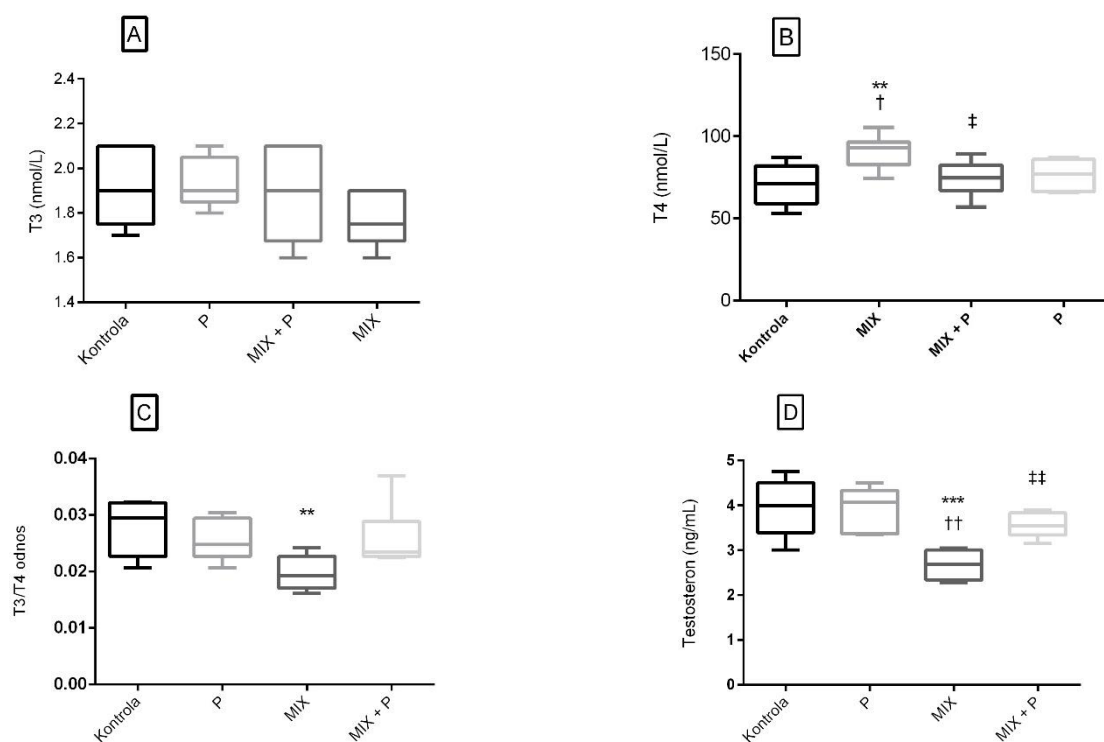
Tabela 36. Biohemijski parametri nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

Parametar	Parametar	Kontrola	P	MIX	MIX + P
Glukoza (mmol/L)	Srednja vrednost	11,78	12,72	14,58*	13,68
	SD	2,931	1,169	1,941	1,968
CRP (mg/L)	Medijana	0,4500	0,5000	0,8000**†	0,5500
	Opseg	0,4000 - 0,5000	0,4000 - 0,6000	0,6750 - 0,9000	0,5000 - 0,7500
Urea (mmol/L)	Srednja vrednost	6,980	6,880	8,033*††	6,983‡
	SD	0,8075	0,2588	0,8779	0,4119
Kreatinin (μmol/L)	Srednja vrednost	43	42,80	42,50	42,83
	SD	4,743	2,588	2,345	3,251
Mokraćna kiselina (μmol/L)	Srednja vrednost	337,2	326,2	355,8	338,0
	SD	71,71	14,92	59,18	24,68
Ukupni proteini (g/L)	Srednja vrednost	76,20	76,80	76,17	76,50
	SD	4,207	3,271	2,639	3,619
Albumin (g/L)	Srednja vrednost	50,75	50,60	53,00	51,83
	SD	2,500	0,5477	2,530	2,137
Ukupni bilirubin (μmol/L)	Srednja vrednost	1,020	1,120	1,520**†	1,250
	SD	0,3271	0,1483	0,1789	0,2588
Direktan bilirubin (μmol/L)	Srednja vrednost	0,6500	0,6400	0,7500	0,7000
	SD	0,1291	0,1517	0,1378	0,1095
ALT (U/L)	Srednja vrednost	57,8	58,83	73,00**††	57,60†††
	SD	6,140	7,600	2,309	7,232
AST (U/L)	Srednja vrednost	134,6	135,3	154,5*	138,4
	SD	7,733	7,230	12,26	8,444
De Ritis odnos	Medijana	2,377	2,351	2,053	2,468
	Ratio	2,031 - 2,663	2,080 - 2,562	1,980 - 2,227	2,193 - 2,641
ALP (U/L)	Srednja vrednost	363,00	348,6	385,0	364,8
	SD	36,98	27,26	34,29	30,86
Holesterol (mmol/L)	Srednja vrednost	1,584	1,486	1,290*	1,488
	SD	0,2031	0,1459	0,1377	0,2084
HDL (mmol/L)	Srednja vrednost	0,9980	1,032	0,8425*	0,9560
	SD	0,07225	0,09960	0,09605	0,1326
LDL (mmol/L)	Srednja vrednost	0,2960	0,2520	0,3450*†††	0,2780††
	SD	0,02608	0,02168	0,01243	0,04970
Trigliceridi (mmol/L)	Srednja vrednost	1,122	1,042	1,115	1,064
	SD	0,1535	0,1190	0,1097	0,04827
Serumsko gvožđe (μmol/L)	Srednja vrednost	46,33	48,56	41,13†	47,35‡
	SD	3,963	4,150	5,086	4,377

Eksperimentalne grupe: Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA; MIX + P: (50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA) + probiotik. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (u poređenju sa kontrolom); †  $p < 0,05$  (u poređenju sa P grupom); ††  $p < 0,01$ , †††  $p < 0,001$ ; ‡  $p < 0,05$ , ‡‡  $p < 0,01$  (u poređenju sa MIX grupom). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*)/Neparametarski *Kruskal-Wallis* test + *Dunn* test; CRP: C-reaktivni protein, AST: Aspartat aminotransferaza, ALT: Alanin aminotransferaza, ALP: Alkalna fosfataza, HDL: Lipoprotein visoke gustine, LDL: Lipoprotein niske gustine.

#### 4.2.2.6. Nivoi hormona

Na slici 26 prikazani su hormonski parametri izmereni kod pacova nakon 28 dana izlaganja DEHP, DBP, BPA smeši, smeši sa dodatkom probiotika i probiotiku. Nije bilo značajne razlike u nivou T3 u poređenju sa kontrolom u svim tretiranim grupama, kao ni među tretiranim grupama (Slika 26A). U MIX grupi zabeležen je značajan porast nivoa T4 u serumu u poređenju sa kontrolnom i P grupom. Međutim, tretman probiotikom regulisao je nivo T4 u MIX + P grupi, čineći ga značajno nižim u poređenju sa MIX grupom i ne značajno različitim u odnosu na kontrolu (Slika 26B). Došlo je do značajnog sniženja odnosa T3/T4 samo u MIX grupi, dok je u MIX + P grupi odnos ova dva hormona bio na nivou kontrole (Slika 26C). Sličan trend mogao se primetiti i u nivou testosterona u serumu, gde je zabeležen značajan pad u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom i P grupom, dok je tretman probiotikom ublažio pomenuti efekat u MIX + P grupi (Slika 26D).



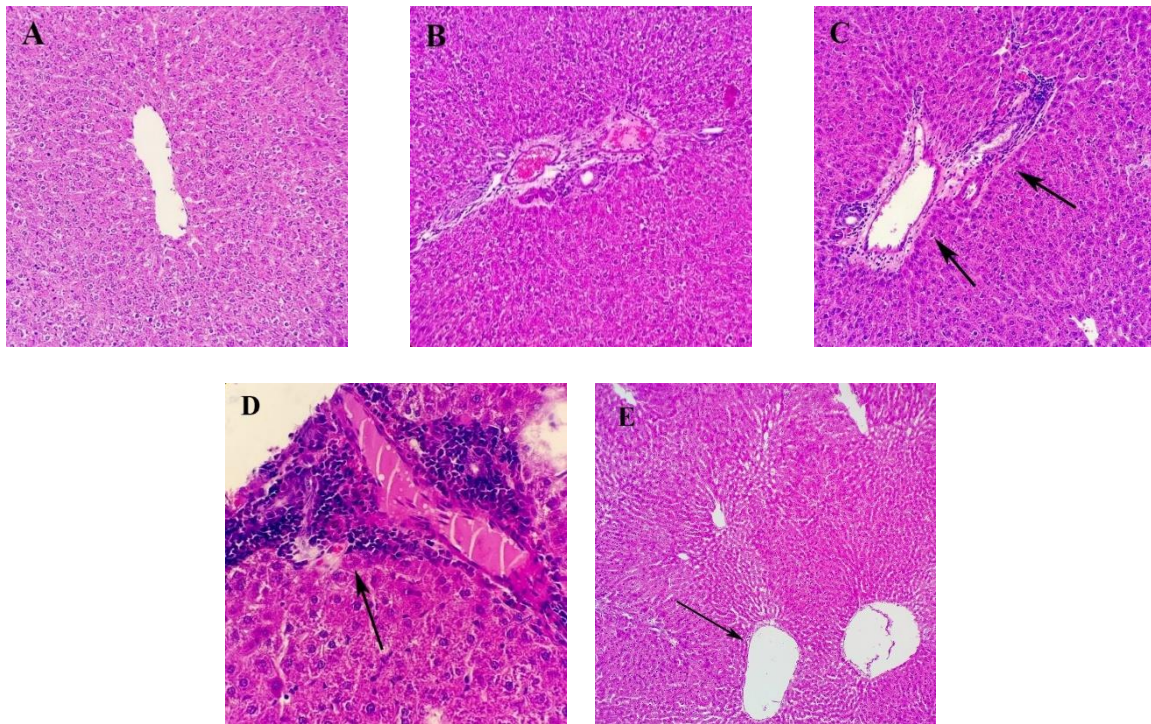
Slika 26. Nivoi hormona u serumu nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

Eksperimentalne grupe: Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA; MIX + P: (50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA) + probiotik. \*\*  $p < 0,01$  (u poređenju sa kontrolnom), †  $p < 0,05$  (u poređenju sa P grupom), ‡  $p < 0,05$ , ‡‡  $p < 0,01$  (u poređenju sa MIX grupom). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*)/Neparametarski *Kruskal–Wallis* test + *Dunn* test. Svaki dijagram predstavlja interkvartilni opseg (25–75. percentil), linija unutar okvira predstavlja srednju vrednost, a krajnje ivice minimalne i maksimalne vrednosti unutar grupe.

#### 4.2.2.7. Patohistološki nalazi

##### 4.2.2.7.1. Jetra

Prilikom mikroskopskog pregleda preseka tkiva jetre tretiranih životinja uočene su histološke promene, dok u tkivima jetre kontrolne i P grupe nisu uočene nikakve abnormalnosti. U ove dve grupe portni prostori bili su uniformne morfologije, širine i celularnosti (Slika 27A i 27B). Parenhim jetre je ispoljio normalne hepatocite raspoređene oko centralnih vena (Slika 27A). Svi pacovi kojima je davana smeša toksičnih supstanci imali su umerenu sinusoidnu dilataciju u lobulusima, pretežno oko centralne vene. U nekim slučajevima, portni prostori bili su lako prošireni, zbog povećanog broja inflamatornih ćelija (pretežno limfocita, u manjem broju eozinofilnih granulocita) – portni hepatitis (Slika 27C i 27D). Primena probiotika umanjila je pomenute efekte, što je rezultiralo samo umerenom dilatacijom sinusoida oko centralnih vena (Slika 27E).



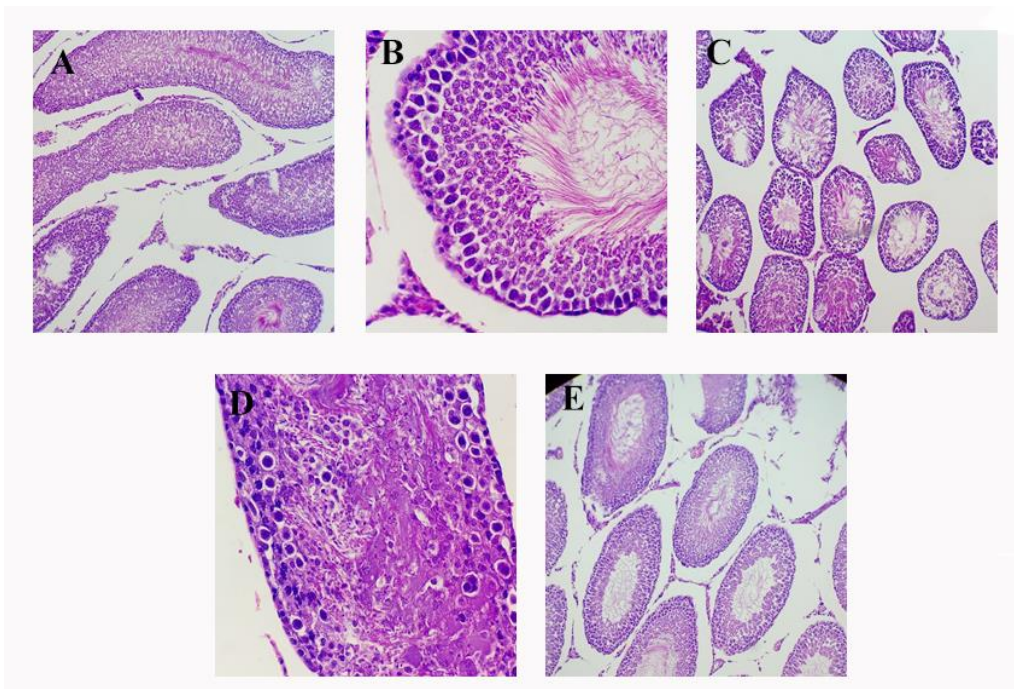
Slika 27. Patohistološki nalazi na jetri nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

A. Kontrola: nema značajnih morfoloških promena, uveličanje: x20; B. P grupa: nema značajnih morfoloških promena, uveličanje: x20; C. MIX grupa: lako prošireni portovi, povećan broj inflamatornih ćelija (strelice), uveličanje: x20; D. MIX grupa: povećan broj inflamatornih ćelija (pretežno limfocita, u manjem broju eozinofilnih granulocita) (strelica), uveličanje: x40; E. MIX + P grupa, umerena sinusoidna dilatacija oko centralnih vena (strelica), Uveličanje: x20.

Eksperimentalne grupe: Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA; MIX + P: (50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA) + probiotik.

#### 4.2.2.7.2. Testisi

U intersticijumu tkiva testisa, u kontrolnoj grupi i grupi koja je primala probiotik nisu uočena bitna odstupanja u morfologiji (Slika 28A i 28B). U MIX grupi bile primetne promene poput lako atrofičnih seminifernih tubula, smanjenja debljine germinativnog epitela, lakostepene dilatacije tubularnog lumena, deskvamiranih ćelija germinativnog epitela (eksfolijacija), kao i veći broj uvećanih ćelija, u kojima su se mogla uočiti hiperhromatska jezgra, kao i sporadični multinuklearni oblici ćelija (Slika 28C i 28D). U grupi koja je uz smešu DEHP/DBP/BPA primala i probiotik, u najvećem broju seminifernih tubula, kontinuitet spermatogeneze bio je očuvan, a tubuli su bili uobičajene veličine i oblika. U malobrojnim fokusima, zapažena je laka atrofija tubula i redukcija debljine germinativnog epitela, odnosno narušen kontinuitet spermatogeneze, u smislu smanjenja ili potpunog gubitka spermataida, uz laku dilataciju lumena tubula. Ekspolijacija i/ili intracitoplazmatska vakuolizacija ćelija germinativnog epitela nije uočena. Takođe, nisu uočene krupne ili višejedarne ćelijske forme (Slika 28E).



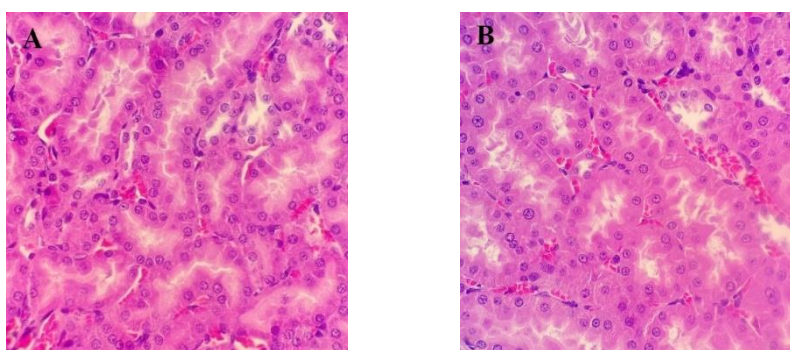
Slika 28. Patohistološki nalazi na testisima nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

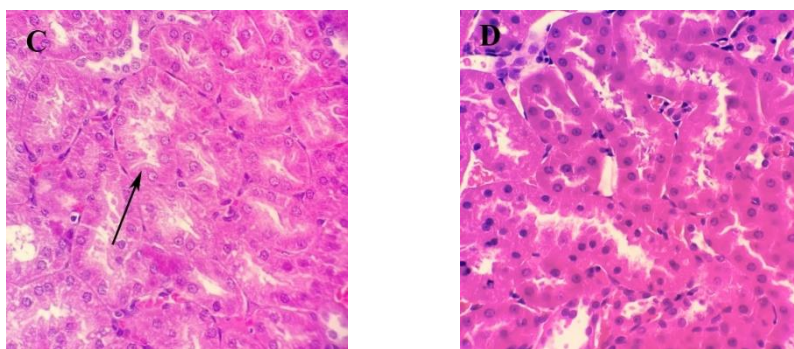
A. Kontrola: uzdužno i poprečno presečeni seminiferni tubuli, uobičajene veličine i oblika, obloženi germinativnim epitelom, uveličanje x10; B. P grupa: seminiferni tubul, uobičajene veličine i oblika, obložen germinativnim epitelom, očuvanog kontinuiteta spermatogeneze; u intersticijumu se uočavaju grupice Lajdigove ćelije, uveličanje x40; C. MIX grupa: pojedini seminiferni tubuli pokazuju znake lake atrofije, redukciju debljine germinativnog epitela i laku dilataciju lumena; u lumenu pojedinih tubula, nalaze se deskvamovane ćelije germinativnog epitela (eksfolijacija), uveličanje x10; D. MIX grupa: uzdužno presečeni seminiferni tubul, u kome se uočava eksfolijacija ćelija germinativnog epitela u lumen tubula; vidi se veći broj ćelija krupnog, hiperhromatičnog jedra, kao i jedna višejedarna ćelijska forma; u jednom broju ćelija uočavaju se intracitoplazmatske vakuole (vakuolizacija), uveličanje x40; E. MIX + P grupa: jedan deo seminifernih tubula pokazuje znake lake atrofije, sa redukcijom debljine germinativnog epitela i lakom dilatacijom lumena, dok su preostali tubuli uobičajene veličine i debljine germinativnog epitela.

#### 4.2.2.7.3. Bubrezi

Očekivano, nisu primećene značajne morfološke promene u medularnim sabirnim kanalicima i intersticijumu ni u kontrolnoj (Slika 29A), niti u P grupi (Slika 29B).

U MIX grupi, primećen je fokalni gubitak četkastog pokrova tubulocita u korteksu, sa blagom dilatacijom tubula. Nisu uočene značajne morfološke promene u glomerulu i intersticijumu u poređenju sa kontrolom (slika 29C). U grupi MIX + P uočene su promene u poređenju sa kontrolnom, ali blaže u poređenju sa MIX grupom. One su uključivale veoma retke fokuse primećene u korteksu sa gubitkom četkastog pokrova tubula (epitel bubrežnih tubula). Glomeruli i intersticijum bili su regularne morfologije (slika 29D).



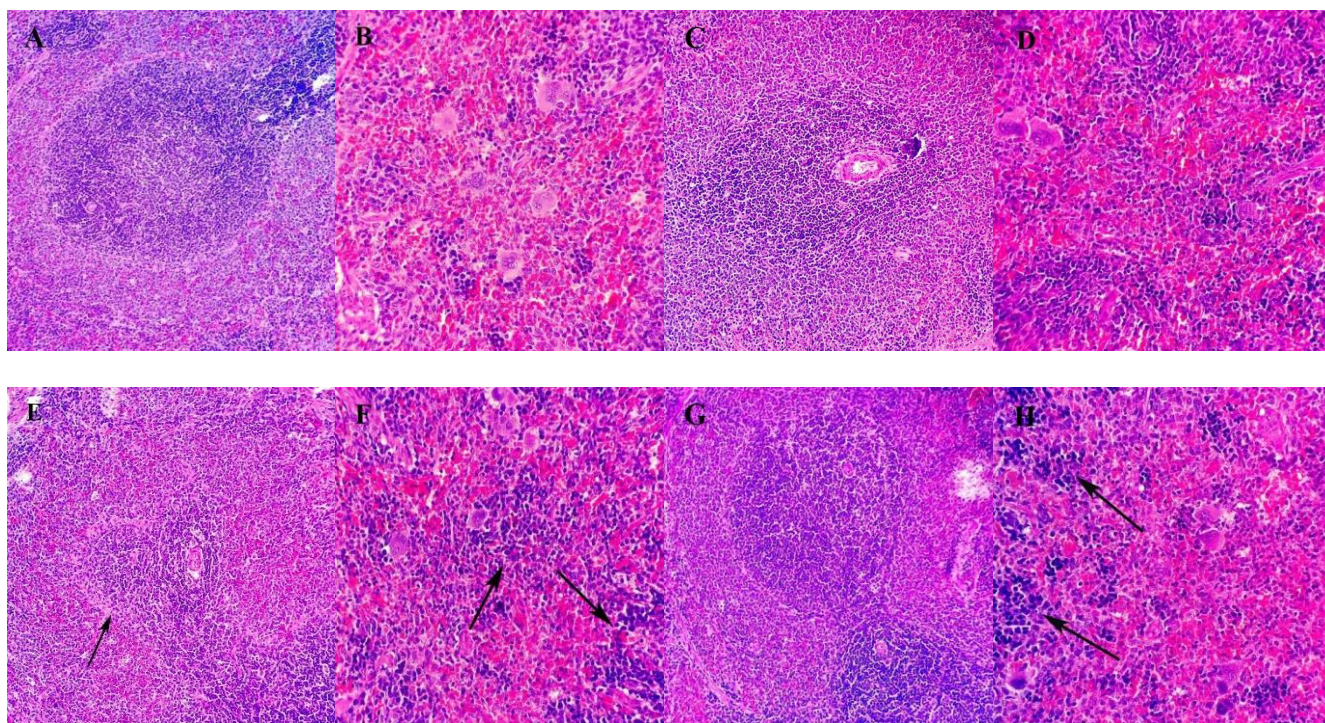


Slika 29 Patohistološki nalazi na bubrezima nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

A. Kontrola: nema značajnih morfoloških promena u medularnim sabirnim kanalićima i intersticijumu, uveličanje: x20; B. P grupa: nema značajnih morfoloških promena u medularnim sabirnim kanalićima i intersticijumu, uveličanje: x20; C. MIX grupa: gubitak četkastog pokrivača tubulocita u korteksu; blago proširenje tubula (strelica), uveličanje: x20; D. MIX + P grupa: veoma retki fokusi u korteksu sa gubitkom četkastog pokrova tubula. Glomeruli i intersticijum regularne morfologije, uveličanje: x20. Eksperimentalne grupe: Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA; MIX + P: (50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA) + probiotik.

#### 4.2.2.7.4. Slezina

I u kontrolnoj (Slika 30A i 30B) i u P grupi (Slika 30C i 30D), uočeno je tkivo slezine pravilne morfologije crvene i bele pulpe. U svim uzorcima slezine MIX grupe, bela pulpa je pokazala vrlo blago smanjenje veličine periarterijskog limfocitnog omotača (PALS), dok je marginalna zona bila očuvane veličine, ali blago smanjene celularnosti (Slika 30E). Dodatno, ekstramedularna hematopoeza (prvenstveno eritroidne i mijeloidne loze) bila je lako povećana u crvenoj pulpi. Limfni folikuli sa germinativnim centrima su uglavnom bili uobičajenog broja (Slika 30F). U beloj pulpi grupe MIX + P nisu primećene promene u poređenju sa kontrolnom (Slika 30G). Međutim, u nekim od uzoraka MIX + P crvene pulpe, primećeno je blago povećana ekstramedularna hematopoeza eritroidne i mijeloidne loze (Slika 30H).

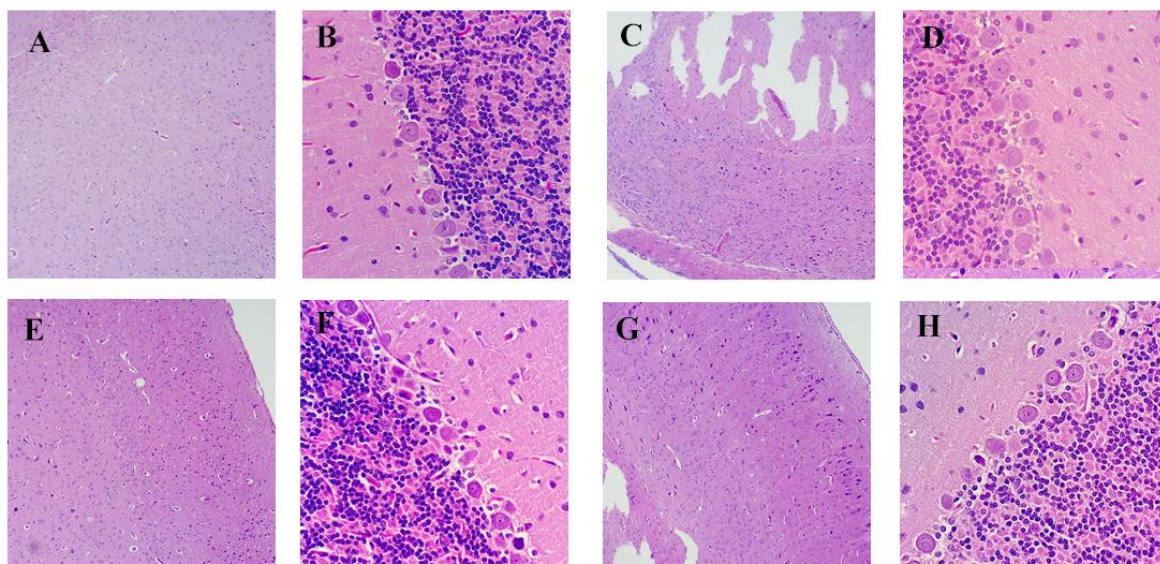


Slika 30. Patohistološki nalazi na slezini nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

A. Kontrola, bela pulpa: germinalni centar, periarterijski limfocitni omotač (PALS) i marginalna zona, uveličanje: x20; B. Kontrola: Crvena pulpa: ekstramedularna hematopoeza, uveličanje: x20; C. P grupa: Bela pulpa: PALS i marginalna zona zajedničke celularnosti, uveličanje x20; D. P grupa: Crvena pulpa: najčešće zastupljeni elementi ekstramedularne hematopoeze; E. MIX grupa: bela pulpa: svetlo smanjenje veličine PALS, sa smanjenjem celularnosti marginalne zone (strelica), uveličanje: x10; F. MIX grupa: crvena pulpa: povećan broj ćelija eritroidne i mijeloidne linije ekstramedularne hematopoeze (strelice), uveličanje: x40; G. MIX + P: Bela pulpa: PALS i marginalna zona - pravilna zastupljenost elemenata bele pulpe, uveličanje: x20; H. MIX + P: blago povećana eritroidna i mijeloidna linija ekstramedularne hematopoeze (strelice), uveličanje x40. Eksperimentalne grupe: Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA; MIX + P: (50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA) + probiotik.

#### 4.2.2.7.5. Mozak

Patohistološkom analizom pokazano je da ni u jednom uzorku tretiranih grupa nisu uočene značajne morfološke razlike u tkivu mozga – ni u strukturi moždane kore, niti u strukturi malog mozga u poređenju sa kontrolom. Mozak životinja u svim grupama imao je karakterističan izgled normalnog cerebralnog korteksa, dok je laminarna građa kore velikog mozga i malog mozga bila regularne morfologije (Slika 31).



Slika 31. Patohistološki nalazi na mozgu pacova nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

A. Kontrola: laminarna građa kore velikog mozga. Tkivo velikog mozga (cerebralni korteks) i malog mozga regularne morfologije, Cerebralni korteks, uveličanje x10; B. Kontrola: Mali mozak – laminarna građa kore malog mozga – molekularni sloj, sloj Purkinjeovih ćelija, granularni sloj; bela masa normalne morfologije, uveličanje x40; C. P grupa: laminarna građa kore velikog mozga. Tkivo velikog mozga (cerebralni korteks) i malog mozga regularne morfologije, Cerebralni korteks, uveličanje x10; D. P grupa: Mali mozak – laminarna građa kore malog mozga – molekularni sloj, sloj Purkinjeovih ćelija, granularni sloj; bela masa normalne morfologije, uveličanje x40; E. MIX grupa: laminarna građa kore velikog mozga. Tkivo velikog mozga (cerebralni korteks) i malog mozga regularne morfologije, Cerebralni korteks, uveličanje x10; F. MIX grupa: Mali mozak – laminarna građa kore malog mozga – molekularni sloj, sloj Purkinjeovih ćelija, granularni sloj; bela masa normalne morfologije, uveličanje x40; G. MIX + P grupa: laminarna građa kore velikog mozga. Tkivo velikog mozga (cerebralni korteks) i malog mozga regularne morfologije, Cerebralni korteks, uveličanje x10; H. MIX + P grupa: Mali mozak – laminarna građa kore malog mozga – molekularni sloj, sloj Purkinjeovih ćelija, granularni sloj; bela masa normalne morfologije, uveličanje x40.

#### 4.2.2.8. Parametri oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite

Parametri oksidativnog stresa izmereni u plazmi i homogenatima tkiva testisa, jetre, bubrega, pankreasa, slezine, mozga, srca, pluća i timusa nakon subakutne izloženosti probiotiku (P),

DEHP, DBP, BPA smeši (MIX) i smeši sa dodatkom probiotika (MIX + P) predstavljeni su u Tabeli 37.

Dodatak probiotika otklonio je sve statistički značajne promene u parametrima oksidativnog stresa (u poređenju sa kontrolnom grupom) prisutne u plazmi pacova, uključujući povišenje TOS i sniženje aktivnost SOD i koncentracije SH grupa. Međutim, od ova tri parametra, samo u slučaju TOS, uočena je značajna razlika između MIX i MIX + P grupa.

S druge strane, u homogenatu tkiva testisa, dodatak probiotika je u potpunosti otklonio uočene značajne promene (u poređenju sa kontrolnom grupom) u slučaju pojedinih parametara (TOS,  $O_2^-$ , MDA), a ublažio značajne promene u slučaju drugih (TAS, SOD). Kod pojedinih parametara takođe se mogla primetiti i statistički značajna razlika između MIX i MIX + P grupa (TAS, TOS,  $O_2^-$ , SOD). Takođe, u slučaju pojedinih parametara MIX grupe (TAS, TOS,  $O_2^-$ , SOD, MDA) i MIX + P grupe (SOD) uočene su značajne razlike i sa P grupom.

U slučaju homogenata tkiva jetre, uočeno je da povišenje TOS i koncentracije MDA prisutno u MIX grupi nije bilo prisutno u grupi koja je osim smeše toksičnih supstanci primala i probiotik. Isto tako, u slučaju parametara kod kojih nije primećena značajna promena u odnosu na kontrolnu grupu, moglo se uočiti da su vrednosti  $O_2^-$  blago, iako ne statistički značajno, snižene u MIX + P grupi, u poređenju sa MIX grupom, kao i da su vrednosti SH grupa bile blago, iako ne statistički značajno, snižene u MIX grupi, u poređenju sa MIX + P.

U homogenatu tkiva bubrega, dodatak probiotika ublažio je povišenje koncentracije MDA, iako je ovaj parametar bio blago, iako ne statistički značajno povišen i u MIX + P grupi u odnosu na kontrolnu.

Povišenje TOS zapaženo u homogenatu tkiva pankreasa moglo se uočiti u MIX grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,001$ ), ali i u poređenju sa MIX + P i P grupama ( $p < 0,01$ ). Slično tome, smanjenje SOD uočeno je samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,01$ ), ali i u poređenju sa MIX + P i P grupama ( $p < 0,05$ ). S druge strane, sniženje koncentracije SH grupa bilo je prisutno samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolom, ukazujući na to da je dodatak probiotika otklonio ovu promenu. Povećanje MDA moglo se zabeležiti u MIX grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,05$ ), ali i u poređenju sa P grupom ( $p < 0,01$ ).

U homogenatima tkiva slezine, od značajnih promena zabeleženih u MIX grupi u odnosu na kontrolnu, tretman probiotikom povoljno je uticao u slučaju MDA i SH grupa, pri čemu su koncentracije SH u MIX + P grupi bile u nivou kontrolne, dok je povećanje koncentracije MDA bilo izraženije u MIX grupi ( $p < 0,001$ ) nego u MIX + P grupi u odnosu na kontrolnu ( $p < 0,01$ ). Takođe, iako nije bilo statistički značajnih razlika između kontrolne i tretiranih grupa, kao i među tretiranim grupama u slučaju koncentracije  $O_2^-$  i AOPP, moglo se zapaziti da su koncentracije ovog parametra blago povišene u MIX grupi u odnosu na ostale tretirane grupe i kontrolnu. Takođe, koncentracija AOPP bila je blago snižena u P grupi u odnosu na ostale grupe, uključujući i kontrolnu.

Od parametara redoks statusa izmerenih u homogenatima tkiva srca, povoljno dejstvo probiotika jedino se moglo se zapaziti u slučaju koncentracije TOS, koja je bila nešto niža u P grupi u odnosu na kontrolnu.

U homogenatu tkiva pluća primećeno je da je dodatak probiotika ublažio smanjenje aktivnosti SOD primećeno u MIX grupi (u odnosu na kontrolnu i na P grupu). Takođe, povišena koncentracija AOPP uočena je samo u MIX grupi u odnosu kako na kontrolnu tako i na P grupu, dok je dodatak probiotika u potpunosti otklonio ovu promenu. Takođe, uočeno je statistički značajno povišenje TOS u MIX grupi kako u odnosu na P, tako i u odnosu na MIX + P grupu.

I, na kraju, u homogenatu tkiva timusa povoljno dejstvo probiotika bilo je potvrđeno u slučaju TOS, TAS i SH grupa, pri čemu su sve pomenute promene nastale pod dejstvom smeše toksičnih supstanci bile u potpunosti uklonjene dodatkom probiotika. Takođe, u slučaju sva tri ova parametra, uočena je značajna razlika između MIX i P grupe, što se takođe moglo primetiti i kod koncentracije  $O_2^-$ , koja je bila značajno viša kako u odnosu na P, tako i u odnosu na MIX + P grupu, iako ne i u odnosu na kontrolnu. Takođe, značajna razlika između MIX i MIX + P grupa uočena je i u slučaju koncentracije SH, značajno više u MIX grupi.

Tabela 37. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi i tkivima nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

Uzorak	Parametar		Kontrola	P	MIX	MIX + P	
Plazma <sup>a</sup>	TOS (μmol/L)	Srednja vrednost	20,31	18,10	24,58**††	21,22‡	
		SD	2,289	2,261	3,676	2,029	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μg/min/L)	Srednja vrednost	114,3	117,2	126,8	119,8	
		SD	10,67	4,550	13,33	14,34	
	SOD (U/L)	Medijana	143,4	142,3	130,8*	141,8	
		Opseg	3,209	3,304	16,01	6,099	
	MDA (μmol/L)	Medijana	2,519	2,741	3,889	2,833	
		Opseg	2,259 - 2,593	2,667 - 2,741	3,370 - 3,991	2,454 - 2,944	
	SH grupe (mmol/L)	Srednja vrednost	0,1842	0,2306	0,1441*	0,2062	
		SD	0,04895	0,08436	0,02646	0,05959	
Testis	TAS (μmol/g proteina)	Srednja vrednost	159,3	148,3	99,85****†††	131,9**††	
		SD	20,84	15,16	11,68	16,76	
	TOS (μmol/g proteina)	Srednja vrednost	0,8973	0,7050	1,746**†††	1,113‡	
		SD	0,1448	0,3464	0,1714	0,6446	
	OSI indeks	Srednja vrednost	0,007205	0,005386	0,01837	0,008600	
		SD	0,001712	0,002945	0,006461	0,005306	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μg/min/g proteina)	Srednja vrednost	36,34	37,09	48,99****††	40,42‡	
		SD	3,937	2,268	7,816	1,528	
	SOD (U/g proteina)	Srednja vrednost	24,64	24,44	19,38****†††	22,31*†††	
		SD	1,212	1,351	2,271	0,8457	
	AOPP (μmol/g proteina)	Srednja vrednost	12,20	12,33	12,97	12,77	
		SD	1,303	1,516	1,520	2,146	
	MDA (μmol/g proteina)	Medijana	0,2053	0,2194	0,3787**††	0,2900	
		Opseg	0,1948 - 0,2707	0,1541 - 0,2704	0,3601 - 0,3933	0,2611 - 0,2971	
	SH grupe (mmol/g proteina)	Medijana	0,08741	0,1021	0,06853	0,07424	
		Opseg	0,07724 - 0,09357	0,08156 - 0,1542	0,06551 - 0,07500	0,04884 - 0,1177	
	Jetra	TAS (μmol/g proteina)	Srednja vrednost	46,68	63,09	40,39	47,10
			SD	16,02	23,53	12,95	28,26
TOS (μmol/g proteina)		Srednja vrednost	2,488	2,595	3,939*†	2,879	
		SD	0,2893	0,6660	1,179	1,004	
OSI indeks		Medijana	0,04945	0,04971	0,07191	0,04786	
		Opseg	0,04233 - 0,1137	0,03030 - 0,06508	0,05499 - 0,1392	0,03489 - 0,06494	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μg/min/g proteina)		Medijana	33,10	29,44	34,60	33,96	
		Opseg	32,48 - 38,16	28,95 - 30,80	31,73 - 38,70	28,33 - 36,17	
SOD (U/g proteina)		Srednja vrednost	11,01	12,10	9,360	11,09	
		SD	1,353	1,188	1,754	1,675	
MDA (μmol/g proteina)		Medijana	0,1925	0,1899	0,2664*	0,2010	
		Opseg	0,1720 - 0,2142	0,1858 - 0,2261	0,2474 - 0,2813	0,1944 - 0,2218	
SH grupe (mmol/g proteina)	Medijana	0,07132	0,08130	0,06573	0,07838		
	Opseg	0,06476 - 0,1025	0,07145 - 0,09935	0,04491 - 0,07032	0,06719 - 0,08555		
Bubreg <sup>a</sup>	TOS (μmol/g proteina)	Srednja vrednost	3,851	3,788	4,407	3,934	
		SD	0,6090	0,4690	1,281	0,7383	
	SOD (U/g proteina)	Srednja vrednost	22,47	20,82	18,42	18,51	
		SD	5,718	2,620	3,287	4,385	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μg/min/g proteina)	Medijana	28,48	26,50	30,28	29,33	
		Opseg	24,45 -	25,49 -	25,98 -	24,57 -	



	MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Medijana	32,59	28,78	37,17	31,22	
		Opseg	0,6395	0,6900	1,425* <sup>†</sup>	1,200	
	SH grupe (mmol/g proteina)	Srednja vrednost	0,4615 - 0,8194	0,5850 - 0,7600	1,119 - 1,592	0,8350 - 1,290	
		SD	0,1943	0,1925	0,1650	0,1740	
	AOPP ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	0,06024	0,04924	0,05972	0,01517	
		SD	4,980	6,850	6,844	6,678	
<b>Pankreas<sup>a</sup></b>	TOS ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	1,436	1,829	3,004*** <sup>††</sup>	1,724 <sup>‡‡</sup>	
		SD	0,6239	0,4296	0,7061	0,8932	
	SOD (U/g proteina)	Srednja vrednost	14,18	13,27	11,64*** <sup>†</sup>	13,35 <sup>‡</sup>	
		SD	12,72 - 14,87	13,23 - 14,24	11,15 - 12,17	12,91 - 14,46	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/min/g}$ proteina)	Srednja vrednost	31,89	36,18	37,74	37,09	
		SD	10,38	5,840	9,542	10,75	
	MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	0,1667	0,1508	0,2268*** <sup>††</sup>	0,2100	
		SD	0,1487 - 0,1883	0,1468 - 0,1573	0,2074 - 0,2722	0,1376 - 0,2155	
	SH grupe (mmol/g proteina)	Srednja vrednost	0,06488	0,04811	0,04305*	0,04621	
		SD	0,02060	0,02034	0,01479	0,009405	
	<b>Slezina<sup>a</sup></b>	TOS ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Medijana	8,160	6,595	7,885	7,820
			Opseg	7,920 - 8,770	4,828 - 8,130	7,295 - 8,948	6,985 - 8,525
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/min/g}$ proteina)		Srednja vrednost	20,50	20,65	24,71	20,75	
		SD	4,770	1,980	3,875	3,385	
SOD (U/g proteina)		Srednja vrednost	16,44	18,58	19,81	19,68	
		SD	2,417	1,660	4,499	4,655	
MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)		Medijana	0,7702	1,006	1,305*** <sup>†</sup>	1,173**	
		Opseg	0,1673	0,08651	0,3663	0,2399	
SH grupe (mmol/g proteina)		Srednja vrednost	1,117	1,459	1,893***	1,535	
		SD	0,2426	0,1465	0,5312	0,2300	
AOPP ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)		Srednja vrednost	5,450	4,253	5,603	5,130	
		SD	1,754	0,8072	0,5393	0,6481	
<b>Mozak<sup>a</sup></b>	TOS ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	2,279	1,993	2,343	1,949	
		SD	0,5511	0,6374	0,3005	0,3614	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/min/g}$ proteina)	Srednja vrednost	41,09	36,20	38,12	36,46	
		SD	7,232	3,046	1,782	0,9016	
	SOD (U/g proteina)	Srednja vrednost	22,36	23,21	24,54	23,42	
		SD	3,264	1,774	2,052	6,358	
	MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	2,165	2,103	2,324	2,289	
		SD	0,4455	0,8051	0,5315	0,6084	
	SH grupe (mmol/g proteina)	Srednja vrednost	0,2088	0,2140	0,1932	0,1978	
		SD	0,05200	0,08042	0,03616	0,02626	
	AOPP ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	12,20	13,21	13,94	13,34	
		SD	1,392	0,8892	1,940	1,885	
<b>Srce<sup>a</sup></b>	TOS ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	Srednja vrednost	3,863	3,010*	3,623	3,328	
		SD	0,4118	0,5171	0,5207	0,6983	
	SOD (U/g proteina)	Srednja vrednost	9,667	8,994	8,934	8,108	
		SD	1,668	2,510	0,9344	0,9452	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/min/g}$ proteina)	Srednja vrednost	13,57	13,26	13,46	13,23		

	MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	SD	0,9924	0,5582	1,133	1,084	
		Srednja vrednost	0,2196	0,1944	0,2152	0,1967	
	SH grupe (mmol/g proteina)	SD	0,02367	0,01075	0,03572	0,02192	
		Srednja vrednost	0,04999	0,05362	0,05905	0,05292	
	AOPP ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	SD	0,008988	0,006080	0,01316	0,009582	
		Srednja vrednost	5,968	5,738	7,336 <sup>†</sup>	6,643	
<b>Pluća<sup>a</sup></b>	TOS ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	SD	1,061	1,172	1,600	0,7967	
		Srednja vrednost	4,89	4,37	5,35 <sup>*†</sup>	4,34 <sup>‡</sup>	
	SOD (U/g proteina)	SD	0,80	0,55	0,85	0,57	
		Srednja vrednost	21,04	21,18	15,21 <sup>****††</sup>	18,31 <sup>*†‡</sup>	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/min/g}$ proteina)	SD	2,20	2,03	2,04	1,02	
		Srednja vrednost	22,92	21,34	25,61 <sup>†</sup>	20,74 <sup>**</sup>	
	MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	SD	3,08	2,51	2,66	1,41	
		Srednja vrednost	0,84	0,85	1,02	0,83	
	SH grupe (mmol/g proteina)	SD	0,12	0,13	0,26	0,10	
		Srednja vrednost	0,18	0,18	0,18	0,18	
	AOPP ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	SD	0,073	0,073	0,063	0,036	
		Srednja vrednost	9,34	8,95	11,69 <sup>***††</sup>	9,52 <sup>‡</sup>	
	SD	SD	1,58	2,09	0,81	1,05	
		Srednja vrednost	2,94	3,60	4,00 <sup>*</sup>	3,75	
	<b>Timus</b>	TAS ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)	SD	0,76	0,85	0,76	0,57
			Srednja vrednost	170,1	167,1	135,5 <sup>***††</sup>	164,7 <sup>**</sup>
		OSI indeks	SD	16,85	16,49	14,32	6,605
			Srednja vrednost	0,018	0,022	0,030 <sup>**†</sup>	0,023 <sup>‡</sup>
SOD (U/g proteina)		SD	0,006	0,005	0,005	0,003	
		Srednja vrednost	19,18	18,58	16,25	17,89	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/min/g}$ proteina)		SD	0,92	2,56	3,73	3,92	
		Srednja vrednost	21,55	20,57	25,98 <sup>†</sup>	20,69 <sup>‡</sup>	
MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)		SD	4,34	1,98	3,71	3,20	
		Srednja vrednost	0,64	0,64	0,84	0,62	
SH grupe (mmol/g proteina)		SD	0,14	0,16	0,19	0,17	
		Srednja vrednost	0,082	0,072	0,051 <sup>**†</sup>	0,069 <sup>‡</sup>	
AOPP ( $\mu\text{mol/g}$ proteina)		SD	0,015	0,012	0,010	0,012	
		Srednja vrednost	16,44	14,49	18,13 <sup>†</sup>	16,43	
SD		SD	1,95	0,97	3,34	2,67	

TAS: totalni antioksidativni status, TOS: totalni oksidativni status, O<sub>2</sub><sup>-</sup>: superoksidni anjon radikal, SOD: aktivnost enzima superoksid dismutase, AOPP: uznapredovali produkti oksidacije proteina (engl. *Advanced oxidation protein products*), MDA: malondialdehid, SH grupe: ukupne sulfhidrilne grupe. Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA; MIX + P: (50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA) + probiotik. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fisherov test najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference, LSD*)/Neparametarski *Kruskal–Wallis* test + *Dunn* test. <sup>a</sup>U označenim uzorcima nije bilo moguće određivanje TAS i izračunavanje OSI indeksa.

#### 4.2.2.9. Bioelementi

Bioelementi mereni u tkivu jetre, bubrega, srca, pluća i timusa (Cu, Zn i Fe) posle peroralne izloženosti probiotiku (P), smeši DEHP, DBP, BPA (MIX), kao i smeši sa dodatkom probiotika (MIX + P) u trajanju od 28 dana prikazani su u Tabeli 38. Kao što se iz tabele može videti, u tkivu jetre zabeležen je pad nivoa Zn i porast Fe u MIX grupi, dok je dodatak probiotika otklonio ove

promene. Nije bilo značajnih promena ni u tkivu bubrega, niti u tkivu srca ni za jedan od merenih bioelemenata. Primećeno je značajno sniženje nivoa Zn u grupi MIX u tkivu pluća u poređenju sa svim ostalim grupama, dok je probiotik otklonio ovu promenu. U slučaju tkiva timusa, primećeno je da je dodatak probiotika ublažilo promene u koncentraciji Fe i Zn.

Tabela 38. Bioelementi u tkivima nakon subakutne izloženosti pacova probiotiku, smeši DEHP, DBP i BPA, ili smeši sa dodatkom probiotika

Uzorak	Parametar (μmol/kg)		Kontrola	P	MIX	MIX + P
Jetra	Cu	Srednja vrednost	3,231	3,090	3,212	3,248
		SD	0,1339	0,3224	0,2376	0,4193
	Zn	Srednja vrednost	26,13	25,12	23,29*	25,39
		SD	1,620	3,180	1,570	2,273
	Fe	Srednja vrednost	60,91	59,45	67,84*†	61,37
		SD	6,176	6,933	5,798	2,523
Bubreg	Cu	Medijana	5,36	5,20	4,60	4,99
		Opseg	0,65	0,44	0,40	0,94
		Srednja vrednost	20,63	19,62	19,71	20,41
	Zn	SD	0,93	0,88	0,98	0,44
		Srednja vrednost	58,70	60,41	61,37	58,07
	Fe	SD	5,79	5,58	6,52	3,31
Srednja vrednost		0,74	0,99	1,00	0,96	
Pluća	Cu	Srednja vrednost	0,74	0,99	1,00	0,96
		SD	0,28	0,18	0,26	0,21
	Zn	Srednja vrednost	16,60	17,28	15,44*††	17,36‡
		SD	1,10	0,66	0,94	0,72
	Fe	Srednja vrednost	79,33	77,93	75,63	77,46
		SD	12,20	13,53	11,41	8,687
Srce	Cu	Srednja vrednost	4,812	4,987	4,704	4,579
		SD	0,7997	0,8536	0,6848	0,6344
	Zn	Srednja vrednost	13,98	14,87	14,97	14,99
		SD	1,291	0,6928	1,292	0,9753
	Fe	Srednja vrednost	60,22	55,15	55,39	59,91
		SD	9,920	4,328	6,467	6,370
Timus	Cu	Srednja vrednost	0,71	0,69	1,09	0,93
		SD	0,44	0,39	0,60	0,35
	Zn	Srednja vrednost	14,98	15,31	17,45***†	17,02*
		SD	1,81	1,08	1,22	1,48
	Fe	Srednja vrednost	14,15	14,59	20,07***†	18,52*
		SD	3,76	3,39	2,86	3,19

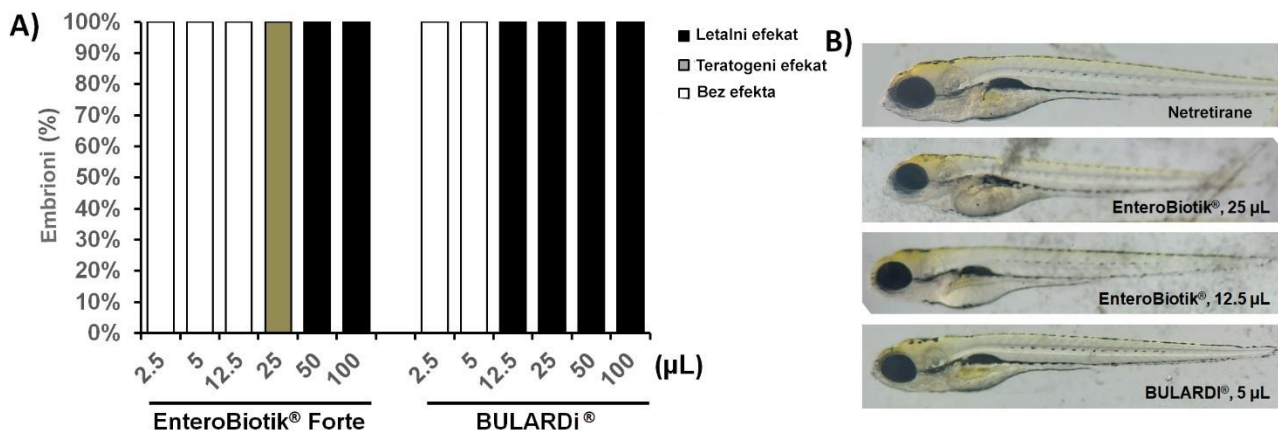
Cu: bakar, Zn: cink, Fe: gvožđe, Kontrola: kukuruzno ulje; P: probiotik; MIX: 50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA; MIX + P: (50 mg/kg t.m./dan DEHP + 50 mg/kg t.m./dan DBP + 25 mg/kg t.m./dan BPA) + probiotik. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) + Fišerov test najmanje značajne razlike (engl. Fisher's Least Significant Difference, LSD)/Neparametarski Kruskal–Wallis test + Dunn test

#### 4.2.3. In vivo rezultati na modelu zebrice

##### 4.2.3.1. Letalni i efekti na rast i razvoj

Na slici 32A i 32B prikazani su efekti različitih koncentracija višekomponentnog i jednokomponentnog probiotika na zebričama, na osnovu kojih je izvršen odabir koncentracije probiotika od 5 μL u kasnijem ispitivanju protektivnog dejstva protiv letalnih i teratogenih efekata DEHP, DBP, BPA i njihove smeše. Na osnovu ovih rezultata, *Saccharomyces boulardii* pokazao se

toksičnijim od višekomponentnog probiotika (Slika 32A). Na osnovu rezultata studije akutne toksičnosti na modelu zebriće, jednodokomponentni probiotik *Saccharomyces boulardii* nije ispoljio vidljivo protektivno dejstvo protiv teratogenih efekata smeše DEHP/DBP/BPA, niti je umanjio perikardijalni edem indukovano dejstvom BPA. S druge strane, višekomponentni probiotik ispoljio je vrlo jasno protektivno dejstvo, prilikom čega su svi embrioni zebrića izloženi najvišim koncentracijama ove tri supstance u smeši prezivali. Međutim, probiotik nije uspeo u potpunosti da otkloni kardio- i hepatotoksične efekte. Takođe, tretman embriona višekomponentnim probiotikom sprečio je nastanak perikardijalnog edema kod embriona izloženih 10 µg/mL BPA.

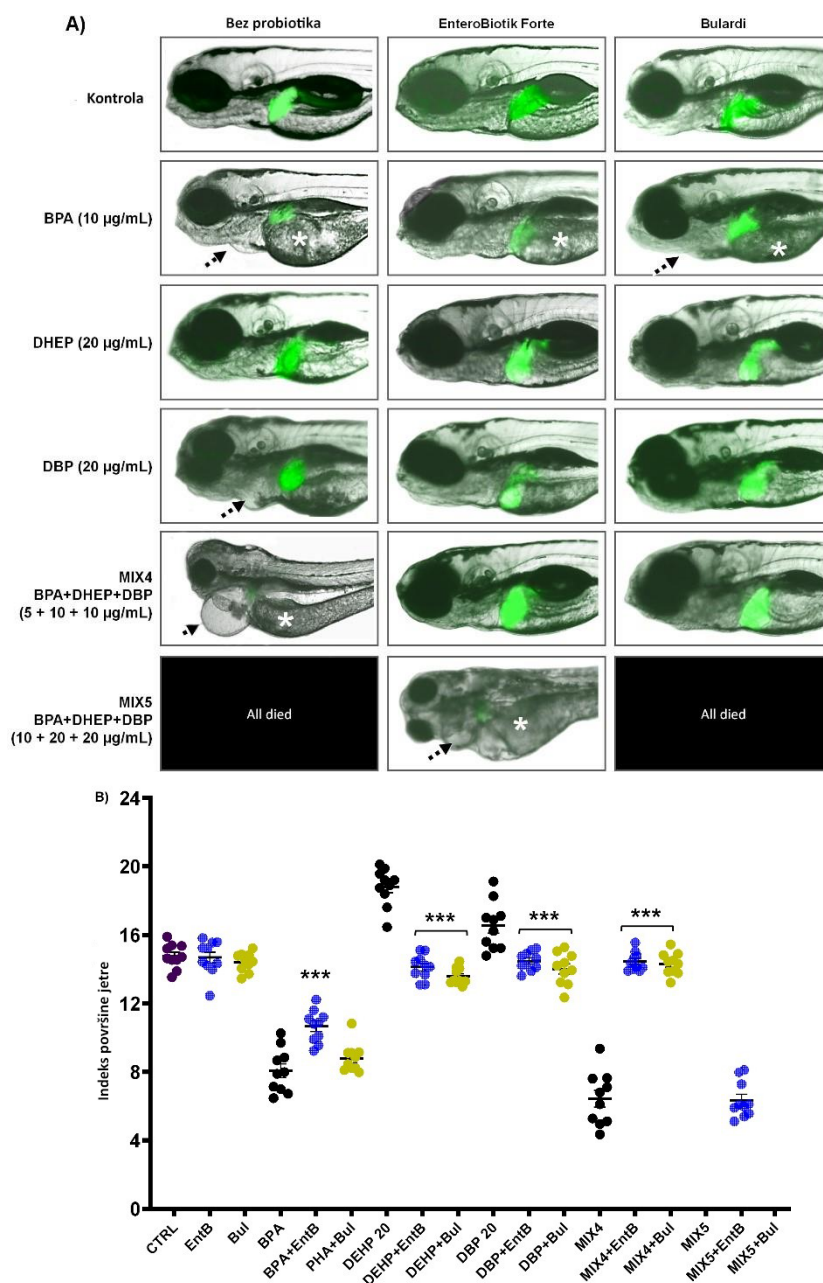


Slika 32. Efekti različitih koncentracija višekomponentnog i jednodokomponentnog probiotika na embrionima zebrića

A. Letalni i efekti na rast i razvoj; B. Prikaz embriona zebriće tretiranih pojedinih koncentracijama probiotika.

#### 4.2.3.2. Hepatotoksičnost

Na slici 33 prikazan je uticaj višekomponentnog i jednodokomponentnog probiotika na hepatotoksične efekte izazvane smešom DEHP/DBP/BPA kod embriona zebriće Tg(-2.8fabp10a:EGFP) sa fluorescentno obeleženom jetrom. Prilikom tretmana pojedinačnim supstancama, gde je hepatotoksičnost BPA bila najizraženija, višekomponentni probiotik ispoljio je svoje protektivno dejstvo sprečivši nastanak perikardijalnog edema, dok se u slučaju jednodokomponentnog probiotika edem prouzrokovan BPA javio, iako manje naglašen nego u slučaju odsustva probiotika. Pri tretmanu smešom, i višekomponentni i jednodokomponentni probiotik (5 µL) ispoljili su protektivno dejstvo kada je reč o tretmanu nižom dozom ispitivanih supstanci prisutnih u smeši (5 + 10 + 10 µg/mL), pri čemu je fluorescencija u oba slučaja bila jasno vidljiva, a perikardijalni edem i neresorbovano žumance nisu bili prisutni. Ipak, pri najvišoj dozi ispitivanih supstanci prisutnih u smeši (10 + 20 + 20 µg/mL) jedino su embrioni zebrića tretirani najvišom koncentracijom i višekomponentnim probiotikom preživeli, iako sa vidljivim toksičnim efektima: razvojem perikardijalnog edema i neresorbovanog žumanceta i gotovo neprimetnom fluorescencijom (Slika 33A). Takođe, prilikom tretmana i višekomponentnim i jednodokomponentnim probiotikom, LA index vraćen je u nivo kontrole, osim u slučaju tretmana najvišom koncentracijom supstanci prisutnih u smeši, gde je ostao snižen (Slika 33B).



Slika 33. Protektivni efekat probiotika protiv hepatotoksičnosti DEHP, DBP, BPA i njihove smeše kod embriona zebrice Tg(-2.8fabp10a:EGFP) sa fluorescentno obeleženom jetrom (n = 10)

Hepatotoksičnost se procenjuje prema A. fluorescenciji jetre i B. indeksu površine jetre u odnosu na kontrolnu grupu (tretiranu DMSO). Indikovano je razvoje perikardnog edema (isprekidana strelica) i neresorbovanog žumanceta (zvezdica) nakon primenjenih tretmana. Statistička značajna razlika u indeksu površine jetre (engl. *Liver area index*, LA) između tretiranih i netretiranih grupa označena je zvezdicama (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ). DEHP: bis(2-etilheksil) ftalat; DBP: dibutil ftalat; BPA: bisfenol A; MIX: DEHP + DBP + BPA.

## 5. Diskusija

Široka upotreba različitih ftalata i BPA u prirodnom okruženju otvara niz mogućnosti za istovremenu izloženost ljudi ovim jedinjenjima. Ove toksične supstance su predmet brojnih naučnih istraživanja sa ciljem da se sagledaju štetni efekti koji nastaju nakon njihove kombinovane primene, iz razloga što toksični efekti smeše mogu biti izmenjeni u odnosu na efekte pojedinačnih supstanci. Tassinari i sar. (2020) sugerisali su da, nakon izlaganja pacova različitim kombinovanim dozama DEHP i BPA tokom 28 dana, u metaboličkom sistemu, sinergistički efekti preovlađuju kod ženki pacova, dok su kod mužjaka najčešće aditivni. S druge strane, ovi autori su utvrdili postojanje antagonističkih efekata ove dve supstance u reproduktivnom i endokrinom sistemu [162]. Howdeshell i sar. (2008) izveli su eksperiment u kome su gravidne ženke pacova istovremeno bile izložene dejstvu pet ftalata, što je dovelo do adekvatnog smanjenja proizvodnje fetalnog testosterona [163]. Takođe se pokazalo da prenatalna izloženost kombinaciji DBP i DEHP menja proizvodnju fetalnog testosterona i ekspresiju INSL3 gena, što dovodi do različitih abnormalnosti u reproduktivnom traktu [164]. Na primer, pojedinačni ftalati koji imaju sličan način delovanja (DEHP i DBP), ali različite glavne metabolite (monoetilheksil ftalat (MEHP) naspram monobutil ftalata (MBP)) mogu proizvesti aditivne efekte kada su prisutni u smeši [86,88,165,166]. Takođe, najnovijim izmenama regulative uvedena su dodatna ograničenja za upotrebu ftalata ne samo u igračkama već i drugim proizvodima, dok se ograničenja za BPA za sada nisu proširivala. Imajući u vidu potencijalne interakcije supstanci, smeša dva ftalata (DEHP i DBP), najčešće korišćena i najznačajnija na osnovu njihove toksičnosti, i BPA za sada nije dovoljno ispitana, odnosno postoje samo ograničeni rezultati istraživanja istovremene izloženosti smeši DEHP/DBP/BPA. Stoga je u okviru ove doktorske disertacije ispitivana toksičnost navedene smeše u odnosu na toksičnost pojedinačnih supstanci na dva eksperimentalna modela, pacovima i zebricama. Dodatno, *in silico* toksikogenomičkom analizom podataka razmatrani su mehanizmi toksičnosti smeše DEHP/DBP/BPA. Takođe, u okviru doktorske disertacije ispitana je potencijalna efikasnost probiotskih kultura u smanjenju izloženosti, a time i štetnih efekata smeše DEHP/DBP/BPA kod pacova i zebrica, kako bi se pronašao način da se, osim uvođenja novih ograničenja za njihovu primenu, smanji izloženost ovim sveprisutnim supstancama u našem okruženju. Stoga je diskusija ove doktorske disertacije organizovana u dva dela. U prvom delu su diskutovani rezultati dobijeni *in vivo* ispitivanjem na dva eksperimentalna modela, kao i *in silico* rezultati o uticaju ispitvane smeše ftalata i BPA na razvoj različitih poremećaja/bolesti. Drugim rečima, primenjen je integrativan pristup u analizi dobijenih rezultata i dostupnih literaturnih podataka. Identifikovani molekularni mehanizmi toksičnosti diskutovani su po utvrđenoj značajnosti prema *in silico* rezultatima uz istovremeno razmatranje dobijenih rezultata kod pacova i zebrica. U drugom delu diskusije rezultati dobijeni *in vivo* studijom protektivnog dejstva probiotika ispitnog na pacovima i zebricama, kao i *in vitro* ispitivanjem sprovedenim u okviru ove doktorske disertacije analizirani su prema dostupnim literaturnim podacima.

### 5.1. TOKSIČNOST FTALATA, BISFENOLA A I NJIHOVE SMEŠE

#### 5.1.1. Prirast mase, unos hrane i vode

Potvrđena je sposobnost ispitivanih supstanci da utiču na prirast mase, unos hrane i vode pacova. Iako se primenjena doza BPA smatra NOAEL vrednošću za efekte na telesnu masu, u ovom istraživanju je zabeleženo smanjenje telesne mase pacova iz BPA grupe u gotovo svim predstavljenim vremenskim periodima, kao i u slučaju ukupnog prirasta telesne mase. Uprkos tome što je ukupan unos hrane u slučaju DBP i BPA grupe bio znatno viši u poređenju sa kontrolnom, kod ovih grupa je zabeležen niži prirast telesne mase u poređenju sa kontrolom u svim predstavljenim vremenskim periodima. To bi moglo ukazivati na to da neki drugi mehanizmi stoje

iza uočenih pojačanih anaboličkih reakcija. Smanjene unosa vode i hrane primećeno je u MIX grupi, praćeno znatno nižim prirastom telesne mase u poređenju sa kontrolom. Međutim, nije bilo značajne razlike u prirastu telesne mase između MIX i DEHP, DBP i BPA grupa. Iako je primenjena doza bila mnogo viša nego u istraživanju sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije, studija u kojoj su pacovi primali 1000 mg/kg t.m./dan DEHP tokom 10 dana, takođe je pokazala sniženje telesne mase nakon 10 dana izloženosti DEHP [167]. U studiji od 90 dana, zabeleženo je sniženje telesne mase nakon 30 dana primene smeše ftalata (DEHP, DBP, DMP, DEP, BBP i DNOP). Svaka od komponenata smeše bila je primenjena u jednakoj dozi, pri čemu je doza za svaku od njih iznosila 26,7 mg/kg t.m./dan tokom 90 dana [168]. Ista grupa autora zabeležila je smanjenje telesne mase pacova nakon primene tri različite doze iste smeše ftalata (1,6, 16 i 160 mg/kg t.m./dan) tokom 15 nedelja [85].

### 5.1.2. Inflamacija i dejstvo na slezinu

Primećeno je da su tretmani u DEHP, DBP i MIX grupi prouzrokovali znaćajan porast nivoa limfocita, dok nije bilo znaćajne razlike u BPA grupi u poređenju sa kontrolom. Ovo, zajedno sa nivoom CRP, znaćajno povišenim u ovim grupama, moglo bi se povezati sa sistemskom inflamacijom niskog stepena izazvanom ispitivanim supstancama, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u studiji sprovedenoj od strane Zhou i sar. (2019) u kojoj su pacovi bili oralno izloženi 0, 5, 50 i 500 mg/kg/dan DEHP tokom 8 nedelja. Njihovi rezultati ukazali su na povećane vrednosti inflamacije (IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ ), pri čemu je zaključeno da inflamacija može igrati regulatornu ulogu u poremećajima u metabolizmu lipida izazvanim od strane DEHP [117]. Štaviše, autori još jedne studije na pacovima izvestili su o visokoj korelaciji između koncentracije antitela protiv tiroidne peroksidaze i stepena limfocitne infiltracije štitaste žlezde nakon pet nedelja izloženosti DBP u dozama od 5 i 50 mg/kg t.m./dan [169,170]. Imajući u vidu da je slezina primarna meta za signale u eferentnom putu inflamatornog refleksa [171], u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije ispitana je sposobnost DEHP, DBP, BPA i njihove smeše da izazovu patohistološke promene i oksidativno oštećenje u tkivu ovog organa. Rezultati patohistološke analize slezine zabeleženi u ovoj studiji ukazali su na promene u beloj pulpi u svim tretiranim grupama. S druge strane, promene u crvenoj pulpi javile su se u DEHP i BPA grupi, ali ne i u DBP grupi. Uočena je lako povišena ekstramedularna hematopoeza (prvenstveno eritroidne i mijeloidne linije) u crvenoj pulpi DEHP, BPA i MIX grupe, što bi se moglo povezati sa primećenim porastom eritrocita i hemoglobina u punoj krvi. Takođe, u beloj pulpi primećeno je smanjenje velićine PALS. Od merenih parametara oksidativnog stresa, u homogenatima tkiva slezine zabeležen je porast MDA i SH grupa jedino u MIX grupi u poređenju sa kontrolom, ukazujući na moguće aditivne efekte tri ispitivane supstance. Iako ne statistićki znaćajan, takođe je uoćen i porast SOD u MIX grupi u poređenju sa ostalim tretiranim grupama i kontrolnom, verovatno (kao i u slućaju povišenih SH grupa) kao kompenzatorni mehanizam usled indukovanog oksidativnog oštećenja.

### 5.1.3. Dejstvo na lipidni profil

U studiji na pacovima u okviru ove doktorske disertacije primećen je pad nivoa holesterola u DEHP, DBP i MIX grupi u poređenju sa kontrolom, dok je nivo holesterola u BPA bio znaćajno viši u poređenju sa MIX grupom. Koncentracija triglicerida bila je znaćajno povišena u DBP i BPA grupama u poređenju sa kontrolom. Smanjenje nivoa holesterola može se objasniti mogućim oštećenjem funkcije jetre, u slućaju DEHP grupe, kod koje je primećen porast relativne mase jetre, zajedno sa povećanjem aktivnosti ALP u poređenju sa kontrolom. Ovo takođe može biti povezano i sa smanjenjem nivoa T4 i promenom funkcije štitaste žlezde prisutne u DBP grupi [172]. Dalje, promene nivoa holesterola i triglicerida mogu biti povezane sa inflamacijom primećenom u DBP i MIX grupama, opšte prihvaćenom kao jednim od ključnih koraka u procesu metabolićkih poremećaja lipida [117]. Rezultati studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije mogu se uporediti sa rezultatima 13-nedeljne studije na pacovima, u kojoj su Majeed i sar. (2017) pokazali smanjenje nivoa holesterola u serumu nakon primene iste doze DBP (50 mg/kg t.m./dan). U BPA

grupi primećeno je blago, ali ne i značajno povišenje holesterola, dok su nivoi LDL i triglicerida bili značajno povišeni [173]. Abdel-Wahab i sar. (2014) takođe su zabeležili porast LDL i triglicerida nakon oralne primene niže doze BPA (10 mg/kg t.m./dan) u toku istog vremenog perioda. U ovoj studiji primećen je značajan porast ukupnog holesterola. Jedna od uloga tiroidnih hormona je i regulacija energetskog metabolizma. Imajući u vidu da je nivo T4 u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije bio značajno snižen u DBP i BPA grupama, ovaj rezultat se može povezati sa povišenim nivoom triglicerida u pomenutim grupama. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studije u kojoj su mušjaci pacova bili izloženi 7,5 i 75 mg/kg t.m./dan tokom 30 dana [175]. U ovoj studiji nije zabeležena značajna promena u istim parametrima lipidnog profila koji su ispitivani u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije [175]. Međutim, u osmonedeljnoj studiji na pacovima, Zhou i sar. (2019) pokazali su porast ovog parametra, kao i LDL i HDL, pri višoj dozi DEHP (500 mg/kg t.m./dan) [117]. U animalnoj studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije nisu primećene značajne promene u nivou triglicerida, LDL i HDL u poređenju sa kontrolom nakon primene DEHP tokom 28 dana.

#### 5.1.4. Dejstvo na jetru

Jetra je primarni organ koji se proučava u toksikološkim istraživanjima jer igra ključnu ulogu u metabolizmu, deponovanju, distribuciji i izlučivanju kako endogenih tako i stranih hemikalija iz organizma. Štaviše, to je primarni organ odgovoran za metabolizam ftalata i BPA kako kod životinja tako i kod ljudi. Ftalati se metabolišu u dve faze - faza 1 (hidroliza, oksidacija) i faza 2 (konjugacija) [176]. Kratkolančani ftalati (npr. DBP, DMP, DEP, itd) obično se izlučuju putem urina kao monoestri, dok se dugolančani ftalati (npr. DEHP, DINP, DIDP) prolaze kroz brojne biotransformacije, uključujući dodatnu hidrosilaciju i oksidaciju, pre nego što budu izlučeni urinom i fecesom [177]. S druge strane, BPA se transformiše u glukuronid i izlučuje putem žuči ili urina [178,179]. Pokazalo se da ove hemikalije izazivaju različite štetne efekte na jetru. Ftalati mogu izazvati akumulaciju lipida i povećati oksidativni stres u hepatocitima blokiranjem JAK2/STAT5 puta u BRL-3A ćelijama, što potencijalno dovodi do progresije nealkoholne masne bolesti jetre. Pored toga, izloženost ftalatima može uticati na metabolizam holesterola u zvezdastim ćelijama jetre, što kasnije pogoršava fibrozu jetre [50]. Utvrđeno je da su količine proteina i fosfoproteina uključene u različite biološke procese povezane sa hepatotoksičnošću, masnom jetrom i kancerom izmenjene nakon izloženosti BPA. Pretpostavlja se da BPA indukuje promene redoks statusa, proteoma i fosfoproteoma u jetri pacova, što može da podstakne patogenezu poremećaja ovog organa [82].

U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, funkcija jetre ispitana je kombinovanjem *in silico* sa dva *in vivo* modela, pacova i zebrića. *In silico* istraživanjem istaknuto je 148, 136 i 338 gena sa kojima DEHP, DBP i BPA interaguju, a istovremeno su povezani sa hemijski-indukovanim oštećenjem jetre, redom. Čak 75 od ovih gena bilo je zajedničko za sve tri ispitivane supstance. Od ovih gena izdvojeno je 10 najvažnijih u izgrađenoj mreži (CLU, AHR, SERPING1, GSN, MMP9, APOE, SOD1, IL6, CTNNA1 i BLVRB) [150].

Nakon istraživanja ontologije gena, aktivnost oksidoreduktaze (delovanje na superoksidne radikale kao akceptor), aktivnost superoksid dismutaze i aktivnost oksidoreduktaze izdvojili su se kao 4 najvažnija biološka procesa, označavajući oksidativni stres/antioksidativnu odbranu kao posebno važne mehanizme u oštećenju jetre izazvanom smešom DEHP/DBP/BPA. S druge strane, aktivnost receptora i aktivnost citokina bile su među najvažnijim molekularnim funkcijama. Ovo se takođe odrazilo na 10 najznačajnijih gena. SOD1 i APOE su uključeni u antioksidativno dejstvo, dok su IL6, AHR, CLU, SERPING1, MMP9, APOE, SOD1, GSN i CTNNA1 uključeni u proces funkcionisanja imunskog sistema. Utvrđeno je da sve tri supstance smanjuju ekspresiju iRNK SOD, dok DEHP i DBP takođe smanjuju aktivnost SOD proteina. Ovaj gen kodira enzim superoksid dismutazu, koji predstavlja veoma važan odbrambeni mehanizam od oksidativnog stresa u organizmu, delujući protiv ROS, ali i kao antiinflamatorno sredstvo [180]. Takođe je prikazan značaj APOE u antioksidativnoj zaštiti. Nedostatak ovog molekula je povezan sa oštećenjem jetre,



povećanim nivoom oksidativnog stresa u jetri, što je često udruženo sa smanjenom ekspresijom SOD i CAT [181]. Međutim, imajući u vidu da je naša *in silico* studija pokazala da DEHP povećava ekspresiju APOE iRNK, a da DBP smanjuje ekspresiju ovog gena, dok BPA može delovati na oba načina, teško je izvesti zaključak i predvideti konačan ishod u slučaju izloženosti smeši ove tri supstance. To je bio slučaj i sa jednim od 10 najvažnijih

gena, CLU, koji se može smatrati biosenzorom za ROS [182]. Dok DEHP smanjuje ekspresiju iRNK ovog gena, DBP povećava njenu ekspresiju, a BPA može delovati na oba načina. Oštećenje jetre izazvano alkoholom povezano je sa povećanjem aktivnosti MMP-9 kao rezultat razvoja oksidativnog stresa i inflamatornog odgovora. Ovaj gen je eksprimiran u leukocitima tokom ishemijske/reperfuzione povrede, dok je matriksna metaloproteinaza-9 (MMP-9), kodirana ovim genom, zabeležena u visokoj meri kod pacijenata sa cirozom jetre. Leukociti proizvode MMP-9 tokom ishemijske jetre i oštećenja reperfuzije. MMP-9 je multifunkcionalna metaloproteinaza koja inhibira regeneraciju jetre [183]. Rezultati studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije su pokazali da svaka od tri hemikalije ima sposobnost povećanja ekspresije MMP-9 proteina. Štaviše, sve tri supstance povećale su ekspresiju IL-6 proteina, dok su DEHP i BPA takođe povećali ekspresiju IL6 iRNK. IL-6 protein je ključni medijator regeneracije tkiva jetre, a njegov nivo takođe je visok kod hroničnih poremećaja kao što su masna jetra i ciroza. Ovaj protein može da podstakne regeneraciju i reparaciju tkiva jetre. Međutim, kontinuirana izloženost toksičnim supstancama ne samo da eliminiše zaštitne sposobnosti IL-6, već i čini jetru podložnijom oštećenju i nekrozi [184].

U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije na modelu pacova zabeležena je statistički značajna povišena vrednost ukupnog bilirubina, AST i ALT u MIX grupi, kao i blago, ali ne i statistički značajno smanjenje *De Rihterovog* odnosa. Ovo, zajedno sa povećanjem relativne mase jetre, sugerise moguće hepatocelularno oštećenje izazvano ispitivanom smešom, kao i intrahepatičnu bilijarnu opstrukciju koja se može povezati sa agonistima PPAR i ER [30]. U DEHP grupi zabeležen je značajan porast samo aktivnosti ALP, zajedno sa porastom relativne mase jetre. Mnogobrojne studije su pokazale da agonisti PPAR $\alpha$ , uključujući DEHP i DBP, potiskuju apoptozu jetre pri niskim dozama, a povećavaju učestalost apoptotičnih hepatocita pri višim dozama [185–188]. Još jedan parametar povezan sa funkcijom jetre ispitivan u ovoj studiji bio je albumin. Međutim, nije primećena značajna promena u njegovoj koncentraciji u poređenju sa kontrolom ni u jednoj od tretiranih grupa. Ipak, imajući u vidu da bi dehidratacija (potencijalno prisutna u DBP i MIX grupi) mogla dovesti do prividno viših koncentracija ovog parametra u serumu, postoji mogućnost da bi koncentracija albumina bila nešto niža u tim grupama da nije bilo promena u ukupnoj zapremini krvi usled smanjenog unosa vode i dehidratacije.

Rezultatima patohistološke analize u okviru ove doktorske disertacije ustanovljeno je da sve tri ispitivane supstance, kao i njihova smeša, mogu izazvati degenerativne promene u tkivu jetre, kao što je blago proširenje sinusoida u lobulusima, uglavnom oko centralne vene. Pored toga, DEHP i MIX doveli su do blagog uvećanja i povećanja broja inflamatornih ćelija, pretežno limfocita, sa manjim brojem eozinofila. Međutim, dok su ove promene bile prisutne u uzorcima svih životinja koje su primale smešu toksičnih supstanci, one su se mogle uočiti samo u sporadičnim uzorcima DEHP grupe, što ukazuje na moguće aditivne/sinergističke efekte.

Istraživanje u kome je pacovima aplikovano 0,05, 5 i 500 mg/kg DEHP dnevno tokom 8 nedelja pokazalo je da doze DEHP koje izazivaju oštećenje jetre dovode prvenstveno do povećanja inflamacije i edema [189]. Ye i sar. (2017) otkrili su da čak i više doze DEHP (250, 500 i 750 mg/kg) primenjene svakodnevno tokom 30 dana dovode do histoloških promena u jetri, uključujući smanjenje broja i uvećanja hepatocita [190]. Nakon izlaganja miševa istoj dozi DBP tokom istog vremenskog perioda kao u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije (50 mg/kg t.m./dan tokom 28 uzastopnih dana), primećen je edem ćelija jetre, sinusoidna vena bila je sužena, a centralna proširena, što je takođe praćeno povećanjem ROS i MDA u tkivu jetre [191]. Slično, Zhang i sar. (2021) su pokazali da DBP (aplikovan pacovima u toku 6 nedelja u dozi od 5 mg/kg t.m./dan) dovodi do povećanja MDA i smanjenja aktivnosti SOD, dok su uočene histološke promene kao što su agregacija inflamatornog faktora, delimična fuzija hepatocita i fokalna nekroza [192]. Elswefy i sar. (2016) otkrili su da doza BPA dvostruko viša od one koja je korišćena u studiji

sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije (50 mg/kg t.m./dan), davana odraslim pacovima tokom 8 nedelja, izaziva fibrozu jetre. Ovo se odrazilo na povećanje aktivnosti ALT i AST u serumu, kao i na povećanje koncentracije hidroksiprolina u jetri. Rezultati ove studije takođe su pokazali da su zapaljenje, oksidativni stres i apoptoza uključeni u oštećenje jetre i fibrozu izazvanu od strane BPA [81].

Mnoge od pomenutih studija tragale su za vezom između uočenih histoloških promena i oksidativnog stresa kao jednog od glavnih uzroka oštećenja jetre pod dejstvom toksičnih supstanci. Naše *in silico* istraživanje ukazalo je na povezanost između ispitivane smeše i poremećaja oksidativnog statusa. Ovo se može primetiti u identifikovanim zajedničkim genima, biološkim procesima, kao i molekularnim funkcijama. U našem *in vivo* eksperimentu, od izmerenih parametara redoks statusa i bioeleminata, moglo se primetiti da su određene promene bile ili najizraženije, ili prisutne samo u MIX grupi, što ukazuje na moguće aditivne efekte. TOS i Fe bili su povišeni samo u MIX grupi, dok su promene MDA i Zn bile najizraženije u grupi koja je primala smešu toksičnih supstanci. Iako nisu bile statistički značajne, uočene su blage promene u TAS, koji je bio nešto niži u DBP i MIX grupama u poređenju sa drugim grupama. Slično, nivoi SOD i SH grupa bili su najniži u MIX grupi.

Zhao i sar. (2021) primetili su da DEHP, u dozama mnogo višim nego u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije (500 ili 1000 mg/kg), izaziva hepatomegaliju, povećava aktivnost OH<sup>\*</sup> i nivoa MDA i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zajedno sa poremećajem homeostaze enzimskog sistema citohroma P450 (CYP450). Ovi autori su zaključili da DEHP-indukovane ROS aktiviraju nuklearni eritoidni faktor 2 (Nrf2) i nuklearne ksenobiotičke receptore (NKSRs), koji uključuju receptor za aromatične ugljovodonike (AHR), pregnan X receptor (PXR), kao i konstitutivni androstan receptor (CAR) [193]. Ovo je delimično u skladu sa rezultatima naše *in silico* studije, čiji rezultati su istakli AHR kao jedan od najznačajnijih izdvojenih gena, pri čemu je DEHP povećao ekspresiju AHR iRNK, kao i ekspresiju proteina. Ha i sar. (2016) dodatno su pokazali da DEHP dovodi do oksidativnog stresa u jetri aktiviranjem p53, koji bi mogao posredovati u apoptozi kod hepatotoksičnosti izazvane DEHP kod pacova kojima je svakodnevno oralno aplikovan DEHP (250, 500 i 750 mg/kg t.m./dan) tokom 30 dana [194]. Prema Hasanu i sar. (2012), BPA može povećati proizvodnju ROS i smanjiti nivoa ekspresije antioksidativnih gena u tkivu jetre, što dovodi do hepatotoksičnosti, koja je ispitivana nakon oralne primene BPA (0,1, 1, 10, 50 mg/kg t.m./dan) pacovima u toku četiri nedelje. U njihovoj studiji, grupa životinja koja je primala 50 mg/kg t.m./dan BPA (što je dvostruko viša doza od one primenjene u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije) imala je značajno niže nivoa SDH, SOD, GPX, GST, GSR i aktivnosti katalaze [195].

Kada je u pitanju remećenje nivoa bioeleminata, Aydemir i sar. (2018) sugerišu da se ono može svrstati u važne mehanizme oštećenja jetre izazvanog DEHP. U njihovoj studiji, pacovima je davan DEHP u znatno višim dozama nego u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije (0, 100, 200 i 400 mg/kg t.m./dan). Uočeno je da je izloženost DEHP dovela do smanjenja sadržaja natrijuma (Na), kalcijuma (Ca), kalijuma (K), litijuma (Li), rubidijuma (Rb) i cezijuma (Cs), kao i povećanja sadržaja Fe i seleno (Se). Međutim, u njihovom eksperimentu nisu primećene značajne promene u tkivu jetre [196]. Ovo nije u skladu sa rezultatima studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije, imajući u vidu da su ispitivane supstance dovele do promena i u nivou Zn i Fe. Erkekoglu i sar. (2015) takođe su proučavali uticaje više doze DEHP (1000 mg/kg) primenjene na pacovima *per os* tokom 10 dana na koncentracije bioeleminata u plazmi, jetri i bubrezima. Nivoi Se i Zn u krvi bili su znatno niži u poređenju sa kontrolom, kao i Se, Cu i Mn u bubrezima i Fe u jetri [197]. Tanoren i sar. (2015), s druge strane, nakon prenatalnog tretmana pacova umerenim količinama DEHP ili DBP (61 µg/kg t.m./dan od šestog do devetnaestog dana graviditeta), detektovali su povišeni nivoi Zn i Cu u jetri pacova [198]. S druge strane, Nair (2015) je otkrio povećanje nivoa Cu i Zn u tkivu testisa nakon tretmana DBP u dozama od 500, 1.000 i 1.500 mg/kg t.m. [199]. Treba napomenuti da je Zn posebno važan kao deo strukture pojedinih proteina, ima ulogu kofaktora u brojnim enzimima i učestvuje u važnim biohemijским reakcijama. Zajedno sa Se, on je ključni element u antioksidativnoj odbrani ćelija [200]. Dakle, smanjenje Zn i povećanje nivoa Fe zabeleženo u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije može biti povezano sa

histološkim promenama u jetri pacova. Pored toga, smanjenje Zn takođe može biti povezano sa blagim, ali ne značajnim, padom aktivnosti SOD primećenim u MIX grupi, imajući u vidu da se Zn ulazi u sastav enzima SOD1. S druge strane, povećanje nivoa Fe kod pacova kojima je aplikovana smeša ispitivanih supstanci može dodatno doprineti oksidativnom oštećenju. Sposobnost Fe da generiše oksidativni stres prvenstveno zavisi od ćelijske distribucije ovog metala. Jetra je glavni organ za skladištenje Fe, dok je koncentracija u ćelijama strogo regulisana kako bi se izbegli potencijalni toksični efekti, ali i ostvarili neophodni pozitivni efekti gvožđa [201].

Nakon procene hepatotoksičnosti na modelu zebrice, pak, otkriveno je da BPA i ftalati mogu imati sličan ili suprotan efekat na razvoj jetre u zavisnosti od primenjene koncentracije. Dok je izloženost embriona BPA smanjila LA indeks na dozno zavisani način, niže koncentracije DEHP ( $< 2 \mu\text{g/mL}$ ) i DBP ( $\leq 5 \mu\text{g/mL}$ ) su smanjile vrednosti LA, dok su više koncentracije ovih ftalata povećale LA indeks. Izlaganje smeši DEHP/DBP/BPA dovelo je do značajne hepatotoksičnosti, čak i do letalnog efekta. Važno je napomenuti da je efekat BPA na jetru embriona zebrice usmerio efekat smeše, koji je bio izraženiji u poređenju sa izloženošću samo jednoj supstanci. BMD analiza je iskorišćena da se detaljnije istraži obrazac hepatotoksičnih efekata ftalata i BPA na embrionima zebrica. Pokazalo se da je BMDL za oba ftalata bio niži u slučaju smeše u odnosu na pojedinačne supstance, što ukazuje da koncentracije od čak i  $0,55 \mu\text{g/mL}$  (i za DEHP i za DBP) mogu dovesti do 5% smanjenja LA indeksa kada su prisutne u smeši sa BPA. Većina dobijenih intervala pouzdanosti je bila uska, što ukazuje na visoku pouzdanost rezultata. Drugi autori su takođe istraživali hepatotoksične efekte različitih ftalata i BPA na zebricama. U studiji koju su sprovedeli Jiao i sar. (2020), tretman zebrica MBP u visokim koncentracijama ( $10 \text{ mg/L}$ ) rezultirao je smanjenom vitalnošću ćelija, teškim lezijama tkiva i smrću hepatocita u jetri zebrice. Oštećenje hepatocita dovelo je do nastanka vakuola različitih prečnika, zagušenja portalne vene i sinusoida [202]. Histološkim pregledom, Sant i sar. (2021) otkrili su da izloženost  $200 \mu\text{g/L}$  MEHP značajno povećava vakuolizaciju i akumulaciju lipida u jetri larvi zebrica [203]. Rezultati istrživanja Huffa i sar. (2018) na zebricama pokazali su da je izloženost DEHP povezana sa različito izraženim transkriptima uključenim u promenu metaboličkih procesa u jetri, uključujući poremećaj sledećih puteva: 'FOKSA2 i FOKSA3 mreže faktora transkripcije', 'Metabolički putevi', 'metabolizam aminokiselina i derivata', 'metabolizam lipida i lipoproteina' i 'metabolizam masnih kiselina, triacilglicerola i ketonskih tela' [204]. Kod odraslih zebrica izloženih BPA primećena je hepatosteatoza, povezana sa povećanjem obezogenih endokanabinoida 2-arahidonoilglicerola i anandamida u jetri, sa istovremenim smanjenjem palmitoiletanolamida. Razlike u ekspresiji glavnih endokanabinoidnih kataboličkih i metaboličkih enzima, kao i povećanje ekspresije endokanabinoidnog receptora *cnr1*, povezane su sa ovim promenama [205].

#### 5.1.5. Dejstvo na bubrege

U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije analizirano je tkivo bubrega imajući u vidu da se većina metabolita kratkolančanih ftalata, donekle dugolančanih ftalata, kao i BPA, izlučuje putem urina [177–179]. Takođe, literaturni podaci ukazuju na to da ftalati i BPA mogu prouzrokovati oštećenje bubrežnog tkiva [196,206–208].

U istraživanju sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije, od ispitivanih pojedinačnih supstanci DEHP je izazvao najizraženiji fokalni gubitak četkastog pokrova tubulocita, dok je u grupi koja je primala smešu toksičnih supstanci dodatno primećena i lakostepena dilatacija tubula. S druge strane, u glomerulu i intersticijumu nisu uočene značajne morfološke promene. Pored toga, primećeno je značajno povećanje relativne težine bubrega i nivoa ureje samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom. Blago, ali ne značajno povećanje nivoa mokraćne kiseline primećeno je u DEHP, DBP i MIX grupi. Neke od studija iz literature pokazale su da ftalati i BPA mogu prouzrokovati oštećenje bubrežnog tkiva [196,206–208]. Nakon što su istražili efekat viših doza DEHP od onih primenjenih u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije (0, 100, 200 i  $400 \text{ mg/kg}$  telesne mase DEHP/dan), Aydemir i sar. (2018) sugerisali su da je interakcija DEHP sa nivoom bioelemenata, pogotovo Se, jedan od mehanizama oštećenja bubrega izazvanog

ovim jedinjenjem. Ovi autori su uočili povišenu koncentraciju Se u tkivu bubrega u odnosu na kontrolu u grupi koja je primala 200 mg/kg DEHP [196]. Erkekoglu i sar. (2015) istraživali su uticaj 1000 mg/kg t.m./dan DEHP na pacovima, prilikom čega su u tkivu bubrega nivoi Se, Cu i Mn bili značajno sniženi [197]. Ovo je u skladu sa rezultatima studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije, gde je nakon primene niže doze ftalata (50 mg/kg t.m./dan DEHP) tokom 28 uzastopnih dana, iako ne značajno, koncentracija Cu bila niža u MIX grupi u poređenju sa svim ostalim tretiranim grupama i kontroli. Međutim, nije primećena značajna promena u tkivu bubrega ni za jedan od drugih ispitivanih bioelemenata. Takođe, ispitivani su i parametri oksidativnog statusa, imajući u vidu da bi oksidativna oštećenja mogla stajati iza nekih od uočenih patohistoloških promena. Pored povišenja MDA, u bubrežnom tkivu nekih od tretiranih grupa zabeleženo je i blago, iako ne značajno smanjenje aktivnosti SOD i povećanje  $O_2^-$  u odnosu na kontrolu. S druge strane, Gu i sar. (2021) zabeležili su povećane nivoe ROS i MDA, smanjene nivoe GSH, kao i povišen nivo inflamatornih citokina (TNF- $\alpha$  i IL-6) u bubrezima miša nakon izloženosti nižoj dozi DEHP nego u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije (0,05 mg/kg t.m./dan) u trajanju od 5 nedelja, [207]. Odsustvo efekata u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije u poređenju sa onom koju su sprovedeli Gu i sar. (2021) moglo bi se objasniti upotrebom različite vrste eksperimentalne životinje i nešto dužim vremenom izlaganja. Erkekoglu i sar. (2012) izložili su pacove mnogo višoj dozi od one koja je primenjena u studiji u okviru ove doktorske disertacije (1000 mg/kg t.m./dan) tokom 10 uzastopnih dana. Ovi autori su primetili da je DEHP izazvao oksidativni stres u bubrezima pacova i smanjio aktivnost GPX, SOD, sadržaj GSH i tiola i povećao nivo TBARS [206]. Nakon oralnog izlaganja miševa istoj dozi DBP kao onoj koja je korišćena u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije (50 mg/kg t.m./dan) tokom 28 dana, Liang i sar. (2021) su primetili značajno povećanje bubrežne disfunkcije, oksidativnog stresa i apoptoze u poređenju sa kontrolom. Ovo takođe može sugerisati da su miševi podložniji ftalatima u smislu efekata na bubrege od pacova. Mourad i sar. (2012) primenili su istu dozu BPA kao u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije (25 mg/kg t.m./dan) na pacovima tokom 6 nedelja. Ovi autori nisu primetili značajne promene u peroksidaciji lipida, nivoa GSH i aktivnosti katalaze u tkivu bubrega, dok je jedina značajna zabeležena promena bilo povećanje aktivnosti glutation S-transferaza (GST) [208].

#### 5.1.6. Dejstvo na štitastu žlezdu

U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije funkcija štitaste žlezde ispitivana je merenjem sadržaja T3 i T4 u serumu. U DBP i BPA grupama zabeležen je značajan pad T4 hormona u poređenju sa kontrolom. U studiji na pacovima od strane Wu i sar. (2017), smanjenje nivoa T3 i T4 demonstrirano je nakon pet nedelja peroralne izloženosti istoj dozi DBP (50 mg/kg t.m./dan) kao u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije. Suprotno rezultatima studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije, porast nivoa T4 zabeležen je u studiji u kojoj su pacovi oralno tretirani nešto višom dozom BPA od one primenjene u eksperimentu sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije (40 mg/kg t.m./dan) tokom 15 dana [209]. U istoj studiji, nivo T3 je ostao nepromenjen, dok je odnos T3/T4 bio snižen u tretiranoj grupi u odnosu na kontrolnu. Kao zaključak, autori su sugerisali da je izloženost BPA uticala na periferni metabolizam hormona štitaste žlezde [209]. Na osnovu rezultata studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije može se izneti zaključak da nakon 4 nedelje izloženosti BPA, što odgovara trogodišnjoj izloženosti ljudi [210], odbrambeni mehanizmi više nisu bili u stanju da spreče štetne efekte BPA na štitastu žlezdu. Interesantno je, međutim, da rezultati studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije nisu pokazali značajniju promenu nivoa T4 u DEHP grupi. To može biti rezultat aktiviranja odbrambenih mehanizama pod uticajem nižih doza DEHP, koji bi bili premašeni u prisustvu viših doza i duže izloženosti ovoj supstanci.

Slično kao u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, Sun i sar. (2018) nisu primetili razliku u nivou T4 i T3 pri istoj dozi kao u eksperimentu sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije (50 mg/kg t.m./dan), ali su zabeležili smanjene nivoe T3 i T4 u serumu nakon

izloženosti mnogo višoj dozi DEHP (500 mg /kg t.m./dan) tokom 28 dana [211]. Druga studija koja je pokazala sniženje nivoa tiroidnih hormona pri višim dozama DEHP (250, 500 i 750 mg/kg t.m./dan) ukazuje na to da DEHP može dovesti do pada nivoa hormona tiroidne žlezde uticajem na biosintezu, biotransformaciju, biotransport, nivo receptora, kao i metabolizam tiroidnih hormona [212].

S druge strane, rezultati studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije pokazali su značajno više nivoe T4 u MIX grupi u poređenju sa kontrolom, prilikom čega se kod izloženosti smeši javio suprotan efektu u poređenju sa pojedinačnim supstancama. Slični rezultati su primećeni u studiji u kojoj su pacovi tretirani istom dozom DBP u kombinaciji sa imunizacijom tireoglobulinom [169]. U ovoj studiji pokazani su niži nivoi T3 i T4 u grupama koje su primale samo DBP, dok je smeša DBP i tireoglobulina izazvala suprotan efekat, značajno povišivši nivoe ovih hormona. Autori su predložili mogućnost različitih mehanizama koji utiču na proizvodnju hormona štitaste žlezde u zavisnosti od toga da li je DBP prisutan sam ili u kombinaciji sa tireoglobulinom, pokazujući da oksidativni stres izazvan tireoglobulinom igra važnu ulogu u efektu pogoršanja toksičnih efekata DBP [169].

U istraživanju sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije, sličan obrazac javio se i u MIX grupi, u kojoj je nivo T4 bio povišen, zajedno sa smanjenjem odnosa T3/T4. Otuda sposobnost BPA da indukuje oksidativni stres [213] može biti jedno od objašnjenja za uočene efekte smeše. Ovo je u skladu sa rezultatima studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije, koji su ukazali na potencijalne promene parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite zabeležene u mnogim organima, kao i u plazmi pacova. Takođe, ove promene govore o potencijalnoj aditivnosti između ispitivanih supstanci. Na primer, u plazmi, detektovano povišenje TOS i sniženja aktivnosti SOD primećeno je samo u MIX grupi, dok je povišenje MDA, iako primećeno i u slučaju izloženosti samo DEHP, bilo izraženije u MIX grupi.

Dalje, moglo bi se pretpostaviti da bi se porast T4 u MIX grupi mogao pripisati dobro poznatom fenomenu nemonotonog doznog odgovora (engl. *Non-monotonic dose response*, NMDR) karakterističnom za EDC [214–216], pogotovo u slučaju BPA [217,218]. Zbog toga se može pretpostaviti mogućnost pomeranja smera osovine doza-odgovor usled dozne aditivnosti komponenata smeše.

#### 5.1.7. Molekularni mehanizmi poremećaja funkcije muškog reproduktivnog sistema povezani sa smešom ftalata i bisfenola A

##### 5.1.7.1. Androgena aktivnost i nivo testosterona u serumu

U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, nivo testosterona u serumu meren je kao jedan od markera androgene aktivnosti. Rezultati su ukazali na značajan pad ovog parametra u poređenju sa kontrolom samo u MIX grupi, dok nije bilo značajne razlike u grupama koje su primale pojedinačne supstance (DEHP, DBP, BPA) u poređenju sa kontrolom, iako se blagi trend sniženja ovog hormona mogao zabeležiti i kod njih, iako ne statistički značajan.

Izraženiji efekat smeše na nivo testosterona može se objasniti mogućim toksikokinetičkim interakcijama između supstanci prisutnih u smeši. Ove interakcije su potvrđene u studiji akutne toksičnosti na miševima u kojoj je ispitivan uticaj jedne supkutano aplikovane doze DEHP (3, 9 i 18 mg/kg t.m) na deponovanje BPA koji su životinje unosile putem hrane (50 mg/kg t.m. 14C-BPA). Rezultati ove studije ukazali su na to da DEHP povećava deponovanje BPA u epididimisu mužjaka miševa u poređenju sa kontrolnom grupom [90].

Efekti pojedinačnih ftalata na produkciju testosterona ispitani su u različitim studijama, ali uglavnom nakon prenatalne izloženosti. Furr i sar. (2014) istraživali su uticaj različitih ftalata, uključujući DEHP i DBP, na postnatalnu fetalnu produkciju testosterona, demonstrirajući smanjenje nivoa ovog hormona nakon primene i DEHP i DBP u dozi od 100 mg/kg t.m./dan gravidnim ženama u periodu između 14. i 18. dana gestacije [219]. Uticaj BPA na nivo testosterona ispitivan je na prepubertetskim pacovima nakon subkutane izloženosti BPA (0, 20, 100 i 200 mg/kg t.m /dan)

tokom 6 nedelja. Ovom studijom pokazano je da do sniženja nivoa ovog hormona u serumu dolazi tek nakon primene viših doza (100 i 200 mg/kg t.m/dan), što je u skladu sa rezultatima studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije [220]. Druge studije su pokazale da BPA inhibira steroidogenezu u testisu pacova i smanjuje sekreciju testosterona, čime smanjuje aktivnost GnRH neurona i ekspresiju steroidogenih enzima [78,79].

Jin i sar. (2013) zaključili su da BPA oralno davan pacovima može dovesti do oštećenja spermatogeneze izazvanog zaustavljanjem procesa mejoze germinativnih ćelija i time aktiviranjem puta apoptoze u ovim ćelijama [221]. Dozno aditivni efekti prikazani su za smešu ftalata na osnovu njihovog uticaja na sintezu testosterona fetusa pacova. U studiji Howdeshell i sar. (2015) sprovedenoj na pacovima dokazani su aditivni toksični efekti na rast i razvoj nakon izloženosti smeši 5 ftalata (DEHP, DBP, BBP, DiBP i DPP). Autori su naveli supresiju steroidogenog puta i ekspresije INSL3 gena u fetusima pacova kao glavni razlog za oštećenje postnatalnog reproduktivnog razvoja kod mužjaka pacova [222]. Drugi autori su naveli smanjenu sintezu holesterola kao jedan od razloga zbog kojih ftalati utiču na steroidogenezu [223], što bi se moglo uporediti sa rezultatima studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije, imajući u vidu sniženje nivoa kako holesterola, tako i testosterona u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom. Androgena aktivnost bila je glavni fokus nekoliko studija u kojima su istraženi toksični efekti različitih smeša plastifikatora. Zhang i sar. (2013) pokazali su da su, u kombinaciji sa DBP i BPA, nivoi ekspresije gena polnih hormona bili viši u poređenju sa kontrolnom grupom, što ukazuje na aditivni ili sinergistični efekat [88]. Aditivni efekat takođe je potvrđen u eksperimentima sa smešom koja je sadržala tri ftalata, BBP, DBP i DEHP, u kombinaciji sa drugim antiandrogenima (vinklozolin, procimidon, linuron i prochloraz) [87]. Studije na životinjama u kojima je ispitivano dejstvo smeše ftalata i/ili BPA uglavnom su sprovedene nakon prenatalne izloženosti. Pokazalo se da smeša ftalata modulira ekspresiju gena koji kodiraju proteine i miRNK i modifikuje fenotipske parametre kao što je anogenitalna udaljenost u F1 generaciji nakon izloženosti majke [224]. Howdeshell i sar. (2008) dokazali su sposobnost smeše ftalata aplikovane gravidnim ženkama pacova da suzbije fetalnu proizvodnju testosterona na aditivan način [163]. Međutim, kada je reč o postnatalnoj izloženosti, poznato je da toksičnost po muški reproduktivni sistem povezana sa izloženošću ftalatima zavisi od starosti, jer su životinje pre puberteta i u toku puberteta obično osetljivije od odraslih [225]. Uglavnom su potrebne niže doze, kao i kraći period izloženosti da bi se izazvalo oštećenje testisa kod mladih pacova [225,226]. U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, patohistološka analiza je pokazala da su se, u sve tri grupe koje su primale pojedinačne supstance, u sporadičnim uzorcima mogli primetiti lako atrofični seminiferi tubuli i smanjena debljina germinativnog epitela, kao i narušeni kontinuitet spermatogeneze. Međutim, u MIX grupi, ove promene bile su prisutne u svim uzorcima. U novijoj literaturi identifikovan je NOAEL od 4,8 mg DEHP/kg t.m/dan na osnovu efekata na testise kod F1 životinja iz studije tri generacije u kojoj je ispitivana toksičnost na rast i razvoj pacova [227]. U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, iako je doza bila viša, deskvamovane ćelije germinativnog epitela uočene su samo u 2 od 6 uzoraka DEHP grupe, dok se oštećenje spermatogeneze moglo primetiti u 3 od 6 uzoraka, najverovatnije zbog kraćeg vremena izloženosti. To je bio slučaj i za DBP i BPA, koji su uticali na kontinuitet spermatogeneze u samo 2 od 6 uzoraka. Naprotiv, ove promene su mogle da se primete u svim uzorcima MIX grupe. Pored toga, u MIX grupi, izvestan broj uvećanih ćelija sa hiperhromatskim jezgrima mogao je da se uoči u 66,66% uzoraka, zajedno sa sporadičnim višejedrnim ćelijskim oblicima i intracitoplazmatskim vakuolama. Abdel-Maksouds i sar. (2019) pokazali su da BPA i DEHP, pojedinačno, imaju sposobnost da poremete razvoj germinativnih ćelija i proizvodnju sperme kod muškog potomstva kada se primenjuju na gravidnim ženkama od 12 do 21 dana gestacije u dozama od 2,5 ili 25 mg/kg t.m/dan i 5, odnosno 50 mg/kg t.m/dan, redom [228]. U gore pomenutoj studiji, tretman BPA doveo je do atrofije seminiferi tubula, smanjenja broja germinativnih ćelija i ulivanja ćelija u cevasti lumen u seminiferi tubulima, dok je tretman DEHP pruzrokovao žarišna područja gubitka germinativnih ćelija, intersticijsku ćelijsku hiperplaziju između seminiferi tubula i uvlačenje germinativnih ćelija u cevasti lumen [228]. Takođe, Oudir i sar. (2018) pokazali su odsustvo zrelih spermatozoida u testisima pacova nakon

svakodnevne izloženosti DEHP (0,5 i 5000 mg/kg t.m/dan) od 21. do 120. postnatalnog dana. Dodatno, zaključili su da postnatalna izloženost malim dozama DEHP utiče ne samo na broj spermatozoida, već i na broj Sertolijevih i Lajdigovih ćelija i nivo testosterona [229]. Međutim, promene u broju Sertolijevih i Lajdigovih ćelija nisu primećene u istraživanju sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije, verovatno usled kraćeg vremena izloženosti, kao i zbog toga što se ekspozicija nije desila tokom značajnih razvojnih faza, što je slučaj u studijama više generacije i primene ftalata i BPA na gravidnim ženama. Ipak, slično rezultatima studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije, Alam i sar. (2018) zapazili su deformisane seminiferne tubule, produženje lumena, nedostatak spermatida, kao i smanjenje debljine njihovog epitelnog pokrova nakon izloženosti DBP u trajanju od 7 dana. Međutim, doza primenjena u ovoj studiji (500 mg DBP/kg t.m/dan) bila je 10 puta viša nego u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije [230].

#### 5.1.7.2. Zajednički geni i molekularni putevi

*In silico* pristupom korišćenim u ovoj studiji identifikovano je 20 gena povezanih sa poremećajima muškog reproduktivnog sistema (neplodnost, kriptorhizam, hipospadija, neoplazme testisa i testikularni tumor germinativnih ćelija) na koje utiču sve tri ispitivane supstance. Ovi geni obuhvataju AHR, AR, ATF3, BAX, BCL2, CASP3, CYP17A1, CYP1A1, DMRT1, ENO1, ESR1, FGFR3, FSHB, INSL3, LHB, LHCGR, MMP2, NR5A1, SELENOP i SOD2.

Dalji korak ove studije bio je usmeren ka istraživanju molekularnih puteva i bioloških procesa povezanih sa 20 zajedničkih gena. Ovi geni učestvuju u 5 glavnih zajedničkih molekularnih puteva: neplodnost muškaraca, SUMOilacija unutarćelijskih receptora, mreža receptora za aromatične ugljovodonike, steroidogeneza jajnika i apoptoza izazvana nanomaterijalima. Očekivano, prva tri biološka procesa u koja su bili uključeni uzajamni geni bili su polna diferencijacija, razvoj polnih žlezda i razvoj primarnih polnih karakteristika. Pratili su ih razvoj ženskih polnih žlezda, razvoj primarnih ženskih polnih karakteristika i ženska polna diferencijacija, što ukazuje na povezanost ispitivanih hemikalija sa feminizacijom zabeleženom kod eksperimentalnih životinja nakon prenatalne izloženosti. Na primer, rezultati eksperimenta na pacovima pokazali su da produžena *in utero* izloženost fetusa DBP može dovesti do nepravilnog formiranja epididimisa, hipospadije i kriptorhidizma [231]. Isto tako, Christiansen i sar. (2010) su pokazali da prenatalna izloženost DEHP može prouzrokovati smanjenje anogenitalne udaljenosti kod mužjaka, zadržavanja bradavica, hipoplaziju prostate, kao i blagu disgenezu spoljašnjih genitalija. Autori su sugerisali da je smanjenje produkcije testosterona kod mužjaka pacova u toku perioda kritične faze diferencijacije pola najverovatniji mehanizam kojim bi se izloženost DEHP mogla povezati sa demaskulinizirajućim efektima [226].

Očekivano, *in silico* rezultati dobijeni u sklopu ove doktorske disertacije pokazali su da su sve tri supstance u interakciji sa genima DMRT1 i NR5A1, pri čemu utiču na smanjenje ekspresije njihove iRNK. Dok je DMRT1 komponenta molekularnog puta uključenog u diferencijaciju pola kod kičmenjaka i ključni regulator razvoja jedinki muškog pola [232], NR5A1 može biti povezan sa poremećajima razvoja reproduktivnog sistema, hipospadijom, anorhijom i neplodnošću [233]. Imajući ovo u vidu, moglo bi da se pretpostavi da su ovi mehanizmi povezani sa prenatalnom i izloženošću u kritičnim fazama razvoja. Međutim, utvrđeno je da na gene uključene u proces metabolizma, poput CYP1A1, CYP17A1 i ENO1, utiču sve tri ispitivane supstance, što bi donekle moglo objasniti određene promene poput smanjenja nivoa testosterona uočenog u animalnoj studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije. Dok se CYP1A1 može povezati sa povećanim metabolizmom estrogena [234], CYP17A1 igra ključnu ulogu u biosintezi androgena [235]. Shodno tome, Gonçalves i sar. (2018) zapazili su smanjenje nivoa testosterona nakon inhibicije gena koji kodira steroidogene enzime, uključujući Cip17a1 i Cip19a1, u TM3 mišjim Leidigovim ćelijama izloženim niskim koncentracijama BPA tokom 24 ili 48 sati. S druge strane, zaključili su da veće koncentracije BPA povećavaju kondenzaciju hromatina, izazivajući apoptozu [236].

### 5.1.7.3. Nuklearni receptori i receptor za aromatične ugljovodonike

Sprovedeno *in silico* istraživanje pokazalo je da bi sve tri ispitivane hemikalije mogle da dovedu do povećane aktivnosti ESR1 proteina vezivanjem za estrogene receptor. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima, koji navode da ova jedinjenja mogu imitirati estradiol i *in vitro* i *in vivo* [237,238]. Dalje, podaci iz CTD baze pokazali su da DEHP i BPA mogu i da povećaju i da smanje aktivnost ESR1, dok je DBP samo doveo do povećanja aktivnost ovog gena. Za BPA, ovo je dobro ilustrovano u eksperimentu u kome je gravidnim ženkama pacova oralno aplikovana ova supstanca od 6. dana gestacije do okota. Autori su zaključili da BPA može izazvati promene u urogenitalnom sinusu fetusa i razvoju urogenitalnog trakta mužjaka glodara putem estrogenih mehanizama samo kada je prisutan u niskim dozama [239].

Štaviše, utvrđeno je da sve tri supstance utiču na AR, što je takođe moglo da se potvrdi podacima iz literature. Takeuchi i sar. (2005) pokazali su da ftalati sa alkilnim lancima u dužini od C3 do C6 intereaguju sa AR [240], dok su Lee i sar. (2003) pokazali da BPA deluje kao moćan antagonist AR inhibirajući transkripcionu aktivnost Ar indukovanu androgenima [241].

*In silico* rezultati ove studije takođe su ukazali na sposobnost sve tri ispitivane supstance da povećaju aktivnost AHR, gena koji kodira receptor za aromatične ugljovodonike (AhR), dok je AhR molekularni put bio među najvažnijim izvrstanim molekularnim putevima. AhR je transkripcioni faktor koji igra važnu ulogu u fiziologiji i patofiziologiji, uključujući reproduktivnu funkciju. Ovaj receptor učestvuje u unakrsnim interakcijama sa receptorima steroidnih hormona, adaptivnom metabolizmu, kontroli plodnosti i ćelijskog ciklusa [242,243]. Ekspresija AhR u muškom reproduktivnom traktu utiče na odgovor na polne hormone. Zaključeno je da aktivacija AhR dovodi do deaktiviranja androgenih receptora, što rezultira modulacijom transkripcione aktivnosti [242]. Pretpostavlja se da je AhR put povezan sa neplodnošću kod muškog pola, dok se AHR aktivacija u testisima može povezati sa smanjenjem kapaciteta spermatogeneze i proizvodnje sperme [243,244]. Stoga, moglo bi se pretpostaviti da bi ovaj mehanizam mogao biti povezan sa oštećenim kontinuitetom spermatogeneze uočenim patohistološkom analizom. U epidemiološkoj studiji, čiji su rezultati ukazali da su neplodni muškarci imali znatno više nivoa BPA u poređenju sa plodnim, ekspresija ne samo AhR, već i gena ERa, ERb, AR i PKSR, mogla je da se poveže sa višim nivoima BPA, što sugerise njihovu moguću upotrebu kao biomarkera za intoksikaciju ovom supstancom [78]. S druge strane, pokazano je da DEHP inhibira faktor rasta fibroblasta 21, ciljni gen AHR signalnog puta [243].

### 5.1.7.4. Apoptoza

Rezultati *in silico* istraživanja sugerisali su da bi se apoptoza mogla smatrati jednim od glavnih puteva na koje utiče smeša DEHP, DBP i BPA. Ovo je slučaj posebno za unutrašnji put koji je posredovan grupom proteina B-ćelijskog limfoma 2 (Bcl-2) [245], u koji su uključeni geni poput BAX, BCL2 i CASP3. Eksperimentima na životinjama pokazano je da ftalati i BPA mogu da indukuju apoptozu unutar tkiva testisa. Rezultati na miševima pokazali su sposobnost BPA da poveća ekspresiju kaspaze-7, kaspaze-9, kao i Bax u tkivu testisa, ali i da smanji nivo transkripcije DNK metiltransferaze testisa (DNMT) i ekspresiju bcl-2 u F1 generaciji miševa u 56. postnatalnom danu nakon izloženosti gravidne ženke [80]. Međutim, rezultati eksperimenta u kojem je mužjacima miševa intragastrično aplikovan DEHP (0, 100, 200 ili 400 mg/kg t.m/dan) tokom 21 dana, pokazali su da je oksidativni stres uključen u apoptozu indukovanu DEHP i autofagiju Lajdigovih TM3 ćelija miša čak i nakon kraćeg vremena izloženosti [246]. Zaključeno je da je mehanizam kojim DEHP može indukovati apoptozu u testisima povećanje nivoa aktivirane Caspase-3, Caspase-8 i Bax i smanjenje nivoa Bcl-2 [246]. Samim tim, imajući u vidu sličnost u periodu izloženosti, moglo bi se pretpostaviti da je apoptoza bila uključena u patohistološke promene na testisima zabeležene u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, poput deskvamativnih ćelija germinativnog epitela i gubitka spermatida u nekim uzorcima DEHP i svim uzorcima MIX grupe. Rezultati *in silico* istraživanja pokazali su da su sve tri istražene supstance uticale na AR gen, dok se sugerise da androgeni receptor igra presudnu ulogu u promociji androgen-zavisne i nezavisne



apoptoze u ćelijama testisa [247]. Štaviše, pokazalo se da su sve tri supstance sposobne da povećaju ekspresiju BAX gena i smanje ekspresiju BCL2 iRNK i BCL2 proteina, što dovodi do apoptoze. Međutim, interakcije navedene u CTD bazi takođe su pokazale sposobnost ovih supstanci da deluju na suprotan način, smanjujući ekspresiju proapoptotskog BAX i povećavajući ekspresiju antiapoptotskog BCL2. Ovaj obrazac je prikazan u studiji sprovedenoj od strane Zhou i sar. (2017) na kultivisanom antralnom folikulu miša na koji je primenjena smeša 6 ftalata (uključujući DEHP i DBP) u različitim koncentracijama. Pri višim koncentracijama, prikazana je povećana ekspresija Bcl2 i smanjeni odnos Bax/Bcl2, što ukazuje na dominantan efekat antiapoptotskog faktora Bcl2 i inhibiranu apoptozu. Rezultati Zhou i sar. (2017) takođe su pokazali i smanjenu ekspresiju Casp8, što ukazuje na smanjenu ćelijsku smrt [248]. Dakle, moguće smanjenje apoptoze takođe može igrati ulogu u razvoju raka germinativnih ćelija testisa, zajedno sa interakcijama sa genima poput FGFR3, čije su mutacije mogle da se povežu sa tumorima testisa [249], i MMP2, koji se smatra mehanizmom u osnovi prekida spojnih kompleksa izazvanog MEHP i rezultujućeg gubitka polnih ćelija [250].

#### 5.1.7.5. Oksidativni stres

Da bi se istražilo da li se oksidativni stres može smatrati jednim od mehanizama uključenih u ispoljavanje toksičnih efekata na testise nakon subakutne izloženosti DBP, BPA, DEHP i njihovoj smeši, izmereni su različiti parametri redoks statusa u homogenatima tkiva testisa pacova. Rezultati su potvrdili sposobnost ispitivane smeše da izazove različite toksične efekte u većoj meri u poređenju sa pojedinačnim supstancama. Dok je u nekim slučajevima (npr. TOS, TAS, SOD) efekat primećen u MIX grupi bio izraženiji od efekta pojedinačnih supstanci, u drugim slučajevima efekat je bio prisutan samo u MIX grupi (porast  $O_2^-$  i nivo MDH i smanjenje ukupnih -SH grupa). Dalje, iako su se značajne promene mogle zabeležiti u TAS i TOS parametrima u nekim grupama pojedinačnih supstanci (DEHP i BPA u slučaju TOS i DEHP u slučaju TAS), porast OSI javio se samo u MIX grupi, što ukazuje na najveći stepen oksidativnog oštećenja među tretiranim grupama. Zatim, dok je *in vivo* studija sprovedena u sklopu ove doktorske disertacije pokazala sposobnost ispitivane smeše da inhibira SOD, *in silico* rezultati ukazali su na to da sve tri supstance imaju sposobnost interakcije sa SOD2 genom, delujući na ekspresiju i aktivnost SOD2 proteina i/ili ekspresiju iRNK. Takođe, SOD2 je označen kao jedan od gena uključenih u molekularni put neplodnosti kod muškaraca, što je razumljivo imajući u vidu da se antioksidativni sistem u semenoj plazmi sastoji od nekoliko enzima, kao što su mitohondrijska SOD i glutation peroksidaza 1 (GSH-Pk), kodirani SOD2 i GPKS1 genima. Dodatni rezultati *in silico* istraživanja sprovedenog u sklopu ove doktorske disertacije pokazali su da su sve tri istražene supstance u interakciji sa SELENOP, genom koji kodira selenoprotein P, dok su DEHP i DBP u interakciji sa GPKS4, genom koji kodira glutation peroksidazu 4.

Oksidativni stres je prepoznat kao jedan od glavnih mehanizama uključenih u razvoj muške neplodnosti. Pokazalo se da povećane ROS zajedno sa smanjenom antioksidativnom zaštitom dovode do smanjenja pokretljivosti sperme i oštećenja DNK sperme [251]. Budući da spermatozoidi sadrže velike količine nezasićenih masnih kiselina u svojim ćelijskim membranama, oni su veoma podložni štetnim efektima ROS i posledičnoj lipidnoj peroksidaciji [251]. U eksperimentalnoj studiji na modelu pacova, oralna primena DEHP u koncentracijama višim od koncentracija primenjenih u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije (1 ili 2 g/kg t.m/dan tokom 7 dana) dovela je do povećanja generacije ROS, smanjenja GSH u tkivu testisa, kao i koncentracije askorbinske kiseline, što je bilo praćeno selektivnom indukcijom apoptoze spermatocita i atrofijom testisa [252]. Ova zapažanja, zajedno sa rezultatima dobijenim u našoj analizi parametara oksidativnog stresa, ukazuju na to da se oksidativni stres i njegove posledice, poput apoptoze, mogu smatrati jednim od vodećih mehanizama koji su doveli do promena na testisima uočenih patohistološkom analizom tkiva. Slično rezultatima studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije, Kasahara i sar. (2002) zaključili su da je apoptoza u testisima indukovana dejstvom DEHP primećena prvenstveno kod spermatocita, ali ne i kod Sertolijevih ćelija. Ovi autori

su pretpostavili da bi se to moglo pripisati višim koncentracijama GSH, vitamina E i enzima povezanih sa GSH prisutnim u ovim ćelijama [252]. Dok je SOD2 enzim koji katalizuje detoksikaciju superoksidnih radikala u mitohondrijama, GSH-Px je povezan sa neutralizacijom peroksidnih radikala [253]. Međutim, iako GPX1 nije naveden među interakcijama za BPA u istraživanju sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije, studije na eksperimentalnim životinjama pokazale su da je ova supstanca takođe u stanju da utiče na nivo GSH-Px. Kod pacova peroralno izloženih ovoj supstanci (1 mg/kg t.m/dan) tokom 4 nedelje primećeno je značajno povećanje aktivnosti GSH-Px, kao i povećanje nivoa ROS i LPO. Slično rezultatima redoks analize sprovedene u okviru ove doktorske disertacije, zabeležen je porast  $O_2^{\cdot-}$ , za koji je poznato da izaziva promene u funkciji sperme [254]. Nakon primene DBP (100, 250 i 500 mg/kg t.m/dan u toku 2 uzastopne nedelje), primećena je inhibicija SOD, GSH-Px i GSH, zajedno sa povećanjem MDH u testisima pacova. Ovo je praćeno atrofijom seminifernih tubula i deskvamacijom ćelija seminifernih epitela pri dozi DBP od 500 mg/kg t.m/dan [255]. Sposobnost DBP da indukuje oksidativni stres u tkivu testisa takođe je dokazana eksperimentom u kojem su pacovi tretirani sa 200, 400 ili 600 mg DBP/kg t.m/dan svakodnevno tokom 15 dana. Tretman DBP smanjio je ukupni antioksidativni kapacitet u serumu i izazvao degeneraciju tkiva testisa, odsustvo spermatogeneze i spermatozoida, kao i nekrozu u nekim od seminifernih tubula. Autori su sugerisali da su oksidativni stres i posledično smanjenje sekrecije testosterona potencijalni osnovni mehanizam oštećenja testisa izazvanog DBP [256]. Međutim, u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, usled mnogo niže doze DBP, nije bilo promena u redoks parametrima uočenih nakon 28 dana tretmana ovom supstancom. Takođe je pokazano da oralna primena DEHP (1 ili 2 g/kg t.m/dan tokom 7 dana) povećava stvaranje ROS, smanjenje nivoa GSH u tkivu testisa, kao i askorbinske kiseline, dok selektivno indukuje apoptozu spermatoocita i vodi do atrofije ovog organa [252]. U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, iako je bio primenjen u nižoj dozi, DEHP je doveo do nekoliko promena parametara redoks statusa, kao što su povećanje TOS i smanjenje TAS i SOD. Ove promene bi mogle objasniti oštećenja uočena tokom patohistološke analize, kao što su deskvamatizovane ćelije germinativnog epitela, koje nisu zapažene u drugim grupama koje su bile tretirane pojedinačnim supstancama.

#### 5.1.8. Molekularni mehanizmi razvoja dijabetesa povezani sa smešom ftalata i bisfenola A

U nekoliko studija poprečnog preseka zabeležena je povezanost između izloženosti ftalatima i BPA i povećanog rizika od DM, posebno T2DM [257–260]. Pored toga, Kim i sar. (2013) predložili su vezu između T2DM izazvanog DEHP i oksidativnog stresa, posebno koncentracije MDA u uzorcima urina kod ljudi, koja se povećavala proporcijalno sa koncentracijama DEHP, i bila dozno-zavisna sa indeksom insulinske rezistencije, posebno kod ispitanika sa T2DM [258]. Veza između DEHP, DBP, BPA i T2DM takođe je ispitana i u studijama na životinjama. U studiji na pacovima, Rajagopal i sar. (2019) pokazali su vezu između izloženosti DEHP u toku razvoja i preuzimanja i oksidacije glukoze, kao i smanjenih nivoa iRNK insulinskog receptora, GLUT2 i smanjenog GLUT2 proteina u citoplazmi [51]. S druge strane, Srinivasan i sar. (2011) su potvrdili da čak 30-dnevna oralna izloženost pacova DEHP u dozi od 100 mg/kg može izazvati smanjenje insulina, povezujući izlaganje DEHP sa povišenim nivoom glukoze u serumu [52]. Pokazalo se da ista doza i period izloženosti mogu izazivati povišen nivo glukoze u još jednom eksperimentu na pacovima, povezanom sa transdukcijom insulinskog signala oštećenom DEHP [261], dok su Ding i sar. (2021) otkrili da DEHP aktivira Jun-N-terminalnu kinazu (JNK) i remeti osetljivost na insulin u jetri ženki pacova u pubertetskom stadijumu razvoja nakon 3 nedelje izloženosti u dozama od 1,8, 18 i 180 mg DEHP/kg telesne mase/dan [53]. Štaviše, nakon oralne izloženosti miševa DBP (0,5, 5, 50 mg/kg t.m./dan) u trajanju 7 nedelja, ova supstanca je pogoršala DM tako što je ometala signalni put insulina i sekreciju ovog hormona [262]. U studiji na pacovima koja je trajala 13 nedelja, Mjaeed i sar. (2017) istraživali su efekat 10 i 50 mg/kg t.m./dan DBP na nivo glukoze u serumu. U ovoj studiji zabeležen je NMDR u slučaju nivoa glukoze u serumu. Iako je nivo glukoze bio visok u obe tretirane grupe, ova promena je bila izraženija u grupi tretiranoj nižom dozom [173]. Rezultati

studije u kojoj su miševi bili tretirani nižim koncentracijama BPA (0,5 i 2 mg/kg t.m./dan) tokom 4 nedelje, pak, pokazali su da je uticaj BPA na povišenje nivoa glukoze u krvi u tretiranim grupama u poređenju sa kontrolnom dozno-zavisnom [263]. Rezultati studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije pokazali su značajan porast nivoa glukoze u poređenju sa kontrolom u DEHP, DBP i MIX grupama, dok je nivo glukoze bio značajno niži u BPA grupi u poređenju sa MIX. Poremećaj sekrecije insulina može biti povezan sa nekoliko metaboličkih promena u jetri, što dovodi do remećenja homeostaze glukoze, imajući u vidu da ovaj hormon stimuliše upotrebu i skladištenje glukoze i potiskuje njenu sintezu i oslobađanje iz ovog organa [264]. Visok nivo glukoze često može biti praćen abnormalnostima u nivou lipida, poput povišene koncentracije trigliceridija i LDL, koja se, u slučaju studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije, javila samo u DBP grupi. Može se pretpostaviti da izloženost nije bila dovoljno duga da bi izazvala dosledne rezultate u vezi sa ovim promenama u drugim tretiranim grupama.

#### 5.1.8.1. Zajednički geni i molekularni putevi

Rezultati toksikogenomičke analize podataka sprovedene u okviru ove doktorske disertacije ukazali su na postojanje 44 zajednička gena za DEHP, DBP i BPA povezana sa razvojem T2DM. Većina identifikovanih gena bila je u fizičkim interakcijama (31,39%), dok je 21,02% bilo u koekspresiji. Nadalje, uočene su veze između izdvojenog skupa gena i raznih komplikacija dijabetesa.

Pet najvažnijih izdvojenih molekularnih puteva uključivali su put regulacije dugovečnosti, signalni put apoptoze, signalni put adipocitokina, insulinsku rezistenciju i apoptozu izazvanu slobodnim radikalima dok su najvažniji biološki procesi bili odgovor na jedinjenje koje sadrži kiseonik, regulacija ćelijske smrti, regulacija apoptotičkog procesa, regulisanje programirane ćelijske smrti i negativna regulacija ćelijske smrti. Dalja analiza ontologije gena i molekularnih puteva sprovedena u okviru ove doktorske disertacije pokazala je da su apoptoza i oksidativni stres dva glavna mehanizma pomoću kojih smeša DEHP, DBP i BPA može biti povezana sa razvojem T2DM.

#### 5.1.8.2. Apoptoza

Treba napomenuti da je 6 od 15 najvažnijih bioloških procesa koji su izdvojeni u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije bilo povezano sa apoptozom i programiranom smrću ćelije (regulacija ćelijske smrti, regulacija apoptotičkog procesa, regulacija programirane ćelijske smrti, negativna regulacija ćelijske smrti, negativna regulacija ćelijske smrti, apoptotički proces, negativna regulacija programirane ćelijske smrti), kao i 5 od 15 najznačajnijih molekularnih puteva (signalni put apoptoze, apoptoza izazvana slobodnim radikalima, indukcija apoptoze preko DR3 i DR4/5 receptora smrti, programirana ćelijska smrt i unutrašnji put apoptoze). Na molekularnom nivou, gubitak  $\beta$ -ćelija pankreasa apoptozom igra vitalnu ulogu u smanjenju/prestanku lučenja insulina, kao i na početku i/ili u toku progresije bolesti [265]. Bioinformatička analiza sprovedena u sklopu ove doktorske disertacije otkrila je da su sve tri supstance bile u interakciji sa genima koji kodiraju i pro-apoptotske (BAX) i anti-apoptotske članove proteinske porodice Bcl2 (BCL2), uključene u intrinzični ili apoptotski put zavisano od mitohondrija [265].

Takođe, utvrđeno je da sve tri supstance deluju na CASP3 i CASP8. Kaspaza-3, kodirana genom CASP3, je glavna efektorska kaspaza apoptotske kaskade, čija je uključenost implicirana u izolovanim Langenharšovim ostrvcima pankreasa kod pacijenata sa T2DM [266], dok se pokazalo da je kaspaza-8 neophodna za apoptozu  $\beta$ -ćelija u modelima T2DM i u regulaciji mase  $\beta$ -ćelija i sekrecije insulina u fiziološkim uslovima [267]. Sun i sar. (2015) pokazali su da DEHP ispoljava toksične efekte na ćelije insulinoma tako što izaziva apoptozu, dok dozno-zavisno smanjuje sekreciju insulina [268]. Štaviše, istraživanjem efekata DEHP, DBP i njihove smeše na ćelije insulinoma pacova, Li i sar. (2021) pokazali su da kombinovani efekat DEHP i DBP promoviše nastanak ROS i apoptozu  $\beta$  ćelija pankreasa posredovanu PI3K/Akt/Bcl-2 molekularnim putem [54]. Ovi autori su takođe uočili da izloženost ftalatima (i pojedinačna i u smeši) smanjuje odnos

Bcl-2/Bax i povećava nivoe ekspresije gena kaspaze 9 i kaspaze 3 u poređenju sa kontrolom [54]. Lin i sar. (2013) otkrili su izmenjenu ekspresiju članova porodice Bcl-2 i kaspaza u ćelijama insulinoma nakon izloženosti BPA, dok je apoptoza izazvana dejstvom BPA bila povezana sa mitohondrijalnim defektima u  $\beta$ -ćelijama, što je dokazano smanjenjem ATP, oslobađanjem citohroma c, gubitkom mitohondrijalne mase i membranskog potencijala, i promenama u ekspresiji gena uključenih u funkciju i metabolizam mitohondrija [269]. U skladu sa rezultatima Li i sar. (2021), koji je predložio međusobnu vezu između apoptoze i oksidativnog stresa izazvanog smešom ftalata, analiza molekularnih puteva u okviru ove doktorske disertacije takođe je pokazala da je jedan od mehanizama pomoću kojih smeša DEHP, DBP i BPA može izazvati apoptozu nastanak ROS. Geni za koje je utvrđeno da su uključeni u apoptozu izazvanu slobodnim radikalima uključuju RELA, TNF, NFKB1, SOD1 i GPKS1.

### 5.1.8.3. Oksidativni stres

Još jedan važan biološki proces/molekularni put identifikovan u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije bio je oksidativni stres. Podaci iz literature sugerišu da se ovaj mehanizam može smatrati jednim od glavnih za patogenezu i razvoj T2DM, pri čemu je uključen u insulinsku rezistenciju, poremećenu sekreciju insulina, metabolizam glukoze u jetri, zajedno sa aktivacijom inflamatornih proinflamatornih citokina [270,271]. Oksidativni stres pojačava proizvodnju proinflamatornih citokina kao što je TNF $\alpha$  i indukuje apoptozu u  $\beta$  ćelijama pankreasa, kao i autofagiju [271]. S druge strane, IL6 i TNF $\alpha$  dovode do promena u genomskim strukturama  $\beta$  ćelija pankreasa i izazivaju izmenjenu sekreciju insulina i apoptozu [272]. Mitohondrije se smatraju glavnim izvorom oksidativnog stresa kod T2DM. Kao odgovor na insulin, proizvode se ROS i reaktivne vrste azota (RNS) da bi izvršile svoju punu fiziološku funkciju. S druge strane, ROS i RNS inhibiraju insulinsku signalizaciju, dovodeći do razvoja insulinske rezistencije, što je još jedan od faktora rizika za razvoj T2DM [273]. Takođe je važno pomenuti AGE-RAGE signalizaciju, izdvojenu u naših 15 najznačajnijih molekularnih puteva. Krajnji proizvodi napredne glikacije (AGE), grupa potencijalno destruktivnih izmenjenih proteina/lipida, smatraju se jednim od faktora koji povezuju ROS i T2DM. Oni su sposobni da povećaju generisanje ROS i oštete ćelijske antioksidativne sisteme, a takođe mogu biti povezani sa sekundarnim komplikacijama T2DM (npr. retinopatija, kardiovaskularne bolesti i nefropatija) [272]. Drugi faktor koji igra važnu ulogu u razvoju T2DM vaskularnih i drugih komplikacija su promene u aktivnosti antioksidativnih enzima kao što su katalaza (CAT—enzimski/neenzimski), SOD i GSH—Px u raznim tkivima [273]. Ovo je u skladu sa *in silico* studijom u okviru ove doktorke disertacije, u kojoj su CAT, SOD1, SOD2 i GPX1, geni koji kodiraju pomenute enzime, izdvojeni kao zajednički za sve tri ispitivane supstance.

Imajući sve ovo u vidu, hipoteza da se oksidativni stres može smatrati jednom od glavnih veza između izloženosti smeši ftalata i BPA i razvoja T2DM testirana je dodatnim *in vivo* ispitivanjem. Rezultati *in vivo* studije pokazali su da su se značajne promene u određenim parametrima dogodile samo u MIX grupi, a ne u grupama koje su primale pojedinačne supstance, što ukazuje na mogući aditivni potencijal ispitivanih supstanci kada su prisutne u smeši. Povećanje TOS i smanjenje nivoa SH grupa su među navedenim promenama, kao i smanjenje aktivnosti SOD. Kao što je ranije pomenuto, rezultati sprovedene toksikogenomičke analize ukazali su na važnost SOD u razvoju T2DM, dok je na osnovu *in silico* rezultata ove doktorske disertacije otkriveno da sve tri ispitivane supstance interaguju sa SOD1 i SOD2. I DEHP i DBP su smanjili aktivnost proteina i ekspresiju iRNK SOD1 i smanjili ekspresiju iRNK SOD2. S druge strane, dok BPA nije uticao na aktivnost proteina ni SOD1 ni SOD2, smanjio je ekspresiju njihove iRNK. Međutim, *in vivo* studija sprovedena u okviru ove doktorske disertacije nije pokazala značajne promene u O<sub>2</sub><sup>-</sup> ni u jednoj od tretiranih grupa u poređenju sa kontrolnom, što bi se verovatno moglo pripisati subakutnoj izloženosti. S druge strane, značajno povećanje nivoa MDA, jednog od krajnjih proizvoda peroksidacije lipida [271], primećeno je ne samo u MIX, već i u DBP i BPA grupama u poređenju sa kontrolnom. Ovo je važno imajući u vidu da se lipidna peroksidacija smatra glavnim

uzročnim faktorom za razvoj oksidativnog stresa koji dovodi do T2DM i povezanih mikro- i makro-vaskularnih komplikacija [271].

#### 5.1.9. Molekularni mehanizmi razvoja astme povezani sa smešom ftalata i bisfenola A

##### 5.1.9.1. Zajednički geni i molekularni putevi

Rezultati *in silico* analize sprovedene u sklopu ove doktorske disertacije ukazali su na prisustvo 24 gena uključenih u razvoj astme i zajedničkih za sve tri ispitivane supstance. Štaviše, izdvojena su tri glavna mehanizma uključena u razvoj astme povezana sa smešom DEHP/DBP/BPA (apoptoza, inflamacija i oksidativni stres). Većina identifikovanih bioloških procesa bila je povezana sa apoptozom (regulacija ćelijske smrti, regulacija apoptotičkog procesa, negativna regulacija ćelijske smrti, regulacija programirane ćelijske smrti, negativna regulacija apoptotičkog procesa i negativna regulacija ćelijske smrti, regulacija programirane ćelijske smrti). Ovaj rezultat je očekivan imajući u vidu da je hronična inflamacija disajnih puteva kod astme uzrokovana kontinuirano migracijom inflamatornih ćelija iz cirkulacije u bronhijalnu sluzokožu, nakon čega sledi njihova aktivacija. Štaviše, mehanizmi koji kontrolišu preživljavanje i smrt inflamatornih ćelija mogu igrati ključnu ulogu u hroničnoj inflamatornoj fazi bolesti [274]. Trautmann i sar. (2005) sugerisali su da T limfociti i eozinofili doprinose indukciji apoptoze epitelnih ćelija bronhija sekrecijom IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  i aktiviranjem receptora smrti, time dovodeći do odvajanja epitelnih ćelija kod astme [275]. Štaviše, prisustvo aktiviranih T limfocita i eozinofila u bronhijalnoj sluzokoži može se identifikovati u bronhijalnim biopsijama sakupljenim od pacijenata sa astmom, a njihov nivo je u korelaciji sa težinom bolesti [275]. Shodno tome, aktivnost citokina i vezivanje za citokinske receptore istaknuti su kao jedna od važnih molekularnih funkcija, dok su interleukin-4 (IL-4) i interleukin-13 (IL-13) signalni put, interleukin 17 (IL-17) signalni put, signalizacija interleukinima, interleukin-10 (IL-10) signalizacija i TNF signalni put svi bili među najvažnijim ekstrahovanim molekularnim putevima. U imunom sistemu, IL-13 i IL-4 su ključni Th2 citokini koji su jaki aktivatori inflamatornih odgovora i fibroze tokom Th2 inflamacije [276]. Th17 ćelije su, s druge strane, povezane sa razvojem teške astme i njihov karakteristični citokin, IL-17, može izazvati inflamaciju disajnih puteva, hipersekreciju sluzi, hiperplaziju peharastih ćelija, diferencijaciju miofibroblasta i proliferaciju glatkih mišića disajnih puteva u neutrofilima. Th17 diferencijacija je izazvana proinflamatornim IL-6 i antiinflamatornim TGF- $\beta$  [277]. Na kraju, IL10 je antiinflamatorni citokin koji se sekretuje u astmatičnim makrofagima i mononuklearnim ćelijama, dok se smatra da je polimorfizam IL10 povezan sa različitim fenotipovima astme [278].

##### 5.1.9.2. Oksidativni stres

U predstavljenim rezultatima bioinformatičke analize, otkrivene su različite veze sa oksidativnim stresom kako u najznačajnijim izdvojenim biološkim procesima, tako i u molekularnim funkcijama: odgovor na reaktivne vrste kiseonika, odgovor na jedinjenje koje sadrži kiseonik, metabolički proces reaktivnih vrsta kiseonika, metabolički proces reaktivnih vrsta kiseonika, antioksidativna aktivnost i aktivnost superoksid dismutaze. U *in vivo* istraživanju, naša hipoteza da smeša ftalata i BPA može izazvati promene redoks status parametara u tkivu pluća, timusa i bubrega pacova nakon subakutne izloženosti pokazala se tačnom. Kod nekih parametara (SOD i AOPP u tkivu pluća, TAS i OSI u tkivu timusa, kao i MDA u tkivu bubrega) promena je bila najizraženija u MIX grupi, dok su u drugim slučajevima (TOS, O<sub>2</sub><sup>-</sup> i SH grupe u tkivu timusa) promene uočene samo u MIX grupi. Dalje, iako nije bilo značajne promene u SOD aktivnosti, ovaj parametar je bio najniži u MIX grupi. Tako je smeša ispitivanih supstanci smanjila aktivnost SOD i u timusu i u plućnom tkivu. U tkivu bubrega, blago, ali ne značajno smanjenje aktivnosti SOD i povećanje O<sub>2</sub><sup>-</sup> takođe je zabeleženo u nekim od tretiranih grupa u poređenju sa kontrolom. Ovo je u saglasnosti sa našim *in silico* rezultatima, koji sugerišu da su sve tri supstance sposobne da smanje ekspresiju iRNK gena SOD, dok DEHP i DBP takođe mogu smanjiti aktivnost proteina SOD1.

U literaturi su studije sprovedene na životinjama pokazale da od ovih supstanci, posebno ftalati mogu imati dodatni uticaj na razvoj alergijske astme, dok je oksidativni stres predložen kao glavni mehanizam koji stoji iza ovog fenomena [279–281]. U ovim studijama, ovalbumin (OVA) se najčešće koristio za izazivanje alergijske astme. Vi i sar. (2014) istraživali su efekat DEHP adjuvansa u modelu miše astme nakon primene doze niže nego u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije (30 mg/kg t.m./dan) u kraćem vremenskom periodu (18 dana). U homogenatima tkiva pluća, ovi autori su primetili značajno smanjenje nivoa glutaciona u grupi koja je primala DEHP nakon OVA senzibilizacije, ali ne i kada je DEHP primenjen sam. Shodno tome, sličan obrazac primećen je u slučaju MDA, koji je bio značajno povećan u DEHP + OVA grupi, a ne i u DEHP grupi [279]. Iako promena koncentracije MDA nije bila značajna u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, u MIX grupi je primećen blagi porast u poređenju sa svim ostalim grupama. Štaviše, na modelu miša, Zhou i sar. (2020) istraživali su sposobnost DBP da poveća alergijsku astmu nakon senzibilizacije sa OVA. Njihovi nalazi su pokazali da se kod alergijskih astmatičnih miševa izloženih DBP tokom 53 dana javilo značajno povišenja serumskog imunoglobulusina i nivoa Th2 ćelija, kao i citokina Th1 ćelija u tkivu pluća. Uočene su i značajne promene u histologiji pluća, kao i hiperreaktivnost disajnih puteva. Nivoi oksidativnog stresa i peptida vezanog za neuropeptid kalcitonin (CGRP) takođe su bili povišeni, što sugeriše da DBP pogoršava bolesti slične astmi tako što putem oksidativnog stresa povećava ekspresiju CGRP [280]. Wang i sar. (2020) koristili su model alergijske upale disajnih puteva izazvane DBP kod pacova da bi istražili mogući mehanizam pomoću koga DBP proizvodi oštećenje pluća. U ovom eksperimentu, pacovi su tretirani visokom dozom DBP (750 mg/kg t.m./dan) tokom 9 nedelja. Izlaganje DBP izazvalo je histopatološko oštećenje, inflamaciju, oksidativni stres i apoptozu, kao i povišene nivoe proteina limfopoetina strome timusa (TSLP), Janus kinaze 1 (JAK1) i transduktora signala i aktivatora transkripcije 6 (STAT6). Ovi istraživači su došli do zaključka da DBP izaziva alergijsku inflamaciju disajnih puteva kod pacova putem inhibicije Nrf2/TSLP/JAK1 puta [281]. S druge strane, Acaroz i sar. (2019) su pokazali da je ista doza BPA kao ona korišćena u istraživanju sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije (25 mg/kg t.m./dan oralno tokom 30 dana) izazvala značajne histološke promene u plućima, uključujući zadebljanje interalveolarnog septuma i razvoj alveolarnog edema. Ovi autori su otkrili smanjenu SOD i CAT aktivnost u BPA grupi u plućnom tkivu u poređenju sa kontrolom, smanjenu koncentraciju GSH i povećanu MDA [282].

Veze između izloženosti ftalatima i BPA, razvoja astme i oksidativnog stresa su takođe testirane u epidemiološkim studijama. Franken i sar. (2017) impliciraju da se povećani rizik od dijagnoza astme kod mladih ljudi može naći za mono-n-butil ftalat (MnBP; metabolit DBP) i zbir tri metabolita DEHP (MEHP + mono(2-etil-5-hidroksiheksil) ftalat (MEHHP) + mono(2-etil-5-oksoheksil) ftalat (MEOHP)). Pored toga, pronađene su značajne veze između svih testiranih metabolita ftalata i povišenih nivoa 8-hidroksideoksiguanozina (8-OHdG) u urinu. Međutim, u ovom istraživanju, nijedan dokaz ne ukazuje na to da bi 8-OHdG mogao biti povezan sa astmom [283]. Štaviše, Vang i Karmaus (2017) su izvestili da nivoi MEHHP u urinu mogu biti dovedeni u vezu i sa astmom i sa genetskim varijantama povezanim sa oksidativnim stresom, ističući varijante SOD2 kao posebno značajne [284].

### 5.1.9.3. Bioelementi

Iako, prema našim saznanjima, sposobnost smeše DEHP, DBP i BPA da izazove promene na plućima i timusu pacova nakon subakutne izloženosti do sada nije istražena, nekoliko studija je istraživalo uticaj pojedinačnih ftalata na nivo bioelemenata u različitim tkivima i organima. Ajdemir i sar. (2018) pretpostavili su da je jedan od mehanizama oštećenja bubrega i jetre izazvanog DEHP ometanje nivoa elemenata u tragovima i minerala. U njihovoj studiji, mužjacima pacova u prepubertetskom periodu davan je DEHP u koncentracijama višim nego u istraživanju sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije (0, 100, 200 i 400 mg/kg t.m. DEHP/dan). Njihovi rezultati su pokazali smanjenje sadržaja natrijuma (Na), kalcijuma (Ca), kalijuma (K), litijuma (Li), rubidijuma (Rb) i cezijuma (Cs), kao i povećanje Fe i selena (Se) u uzorci seruma. U tkivu bubrega jedino

koncentracija Se je bila povišena u odnosu na kontrolnu grupu, samo u grupi koja je primala 200 mg/kg t.m./dan DEHP. S druge strane, u tkivu jetre nije uočena značajna promena [196]. Ovo je u skladu sa studijom sprovedenom u okviru ove doktorske disertacije, gde pri primeni niže doze ftalata (50 mg/kg t.m./dan DEHP) svakodnevno tokom 28 dana nije primećena značajna promena u tkivu bubrega ni za jedan od ispitivanih bioelemenata. Erkekoglu i sar. (2015) istraživali su uticaj više doze DEHP (1000 mg/kg), oralno primenjene na pacovima tokom 10 dana, na koncentraciju bioelemenata u plazmi i jetri. Značajno su smanjeni nivoi Se i Zn u plazmi, Se, Cu i Mn u bubrezima, kao i Fe u tkivu jetre [197]. S druge strane, Tanoren i sar. (2015) su zabeležili povišen nivo Zn i Cu u tkivu jetre pacova nakon prenatalnog tretmana niskim dozama DEHP ili DBP (61 µg/kg t.m./dan od šestog do devetnaestog dana graviditeta) [198]. Konačno, Nair (2015) je dokumentovao povećanje Cu i Zn u tkivu testisa nakon primene DBP u dozama od 500, 1000 i 1500 mg/kg t.m. [199].

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na sposobnost ispitivane smeše da utiče na nivo Zn i Fe u tkivu timusa nakon subakutne izloženosti. Kao što su Nair i sar. (2015) sugerisali, povišeni nivoi Zn mogu se pripisati gubitku fluidnosti membrane zbog povećane peroksidacije lipida i proizvodnje hidroperoksida, oslobađanja Zn usled ćelijske smrti, ili izmenjene transportne funkcije proteina iz ZnT i ZIP familija [199]. Razvoj alergije i astme je potpomognut pojačanim Th2 imunskim odgovorom i proizvodnjom citokina (npr. IL-4, IL-13 i IL-5). Pretpostavlja se da, pod različitim uslovima izloženosti, ftalati i BPA mogu uticati na diferencijaciju Th ćelija u funkcionalne subpopulacije Th1 i Th2 ćelija, dok bi u uslovima u kojima ove supstance izazivaju povišenje nivoa Th2 ćelija u odnosu na Th1 to, zajedno sa povišenim nivoima imunoglobulusina čija sinteza je promovisana Th2 ćelijama (IgG1 i IgE), pogoduje razvoju alergije ili astme [83,285,286]. S druge strane, Th1 citokini (IFN-γ, IL-4, IL-13 i IL-5) udruženi su sa Th2 citokinima (IL-4, IL-13 i IL-5) kako bi održali hroničnu alergijsku inflamaciju [287]. Štaviše, na T-limfocite utiče homeostaza cinka preko brojnih molekularnih puteva, što rezultuje regulacijom imunskog odgovora zavisnog od T-ćelija [288]. U plućima, nivo Zn je bio niži u MIX grupi u poređenju sa svim ostalim grupama. Ovo je u skladu sa rezultatima koji su pokazali smanjenje intracelularnog nivoa slobodnog Zn u zapaljenom epitelu disajnih puteva mišjeg modela alergijske inflamacije [289]. S obzirom na to da je Zn esencijalna komponenta ili kofaktor za preko 300 specifičnih enzima, uključujući SOD1 [197], ovo bi moglo sugerisati da se smanjena aktivnost SOD u plućima može delimično pripisati smanjenom nivou Zn.

#### 5.1.10. Molekularni mehanizmi razvoja gojaznosti povezani sa smešom ftalata i bisfenola A

Brojni literaturni podaci sugerišu da ftalati i BPA imaju značajne efekte na razvoj gojaznosti, posebno nakon prenatalne izloženosti niskim dozama. Na primer, Hao i sar. (2012) su demonstrirali na modelu miša da *in utero* izloženost mladunaca muškog pola niskoj dozi (0,05 mg/kg t.m./dan) 60. dana nakon rođenja može izazvati povišen nivo holesterola, glukoze i triacilglicerida u serumu [290]. Isto tako, Somm i sar. (2009) potvrdili su povećanje telesne mase i muškog i ženskog potomstva nakon izlaganja gravidnih ženki 1 mg/L BPA u vodi od šestog dana gestacije, do kraja laktacije (postnatalni dan 21) [291]. Studija subakutne toksičnosti na pacovima sprovedena u okviru ove doktorske disertacije, pak, ukazala je na sposobnost ispitivane smeše da poveća nivo glukoze u serumu čak i nakon kraće izloženosti. Takođe, povezanost između tri ispitivane supstance (DEHP, DBP i BPA) i gojaznosti potvrđena je i humanim biomonitoringom. U studijama humanog biomonitoringa pronađena je pozitivna povezanost između indeksa telesne mase i metabolita DEHP i DBP, kao i BPA [292–294], zajedno sa insulinskom rezistencijom [257]. Bez obzira na to, mogućnost da smeša dva ftalata i BPA može igrati ulogu u razvoju gojaznosti još uvek nije dovoljno proučena, niti su razjašnjeni mehanizmi na molekularnom nivou.

##### 5.1.10.1. Zajednički geni i molekularni putevi

Nakon poređenja skupova podataka za DEHP, DBP i BPA identifikovanih u *in silico* studiji u sklopu ove doktorske disertacije zaključeno je da se interakcije za 31 gen povezan sa gojaznošću

podudaraju za sve tri ispitivane supstance. Više od polovine ovih 31 gena (56,49%) bilo je u koekspresiji, što ukazuje na sličnost u njihovim nivoima ekspresije. Bilo koji od pomenutih gena potencijalno bi mogao biti uključen u mehanizam razvoja gojaznosti povezan sa ispitivanom smešom i stoga bi se mogao koristiti u daljim *in vitro* i *in vivo* studijama kao genomski biomarker. U svojim bioinformatičkim istraživanjima, Singh i sar. (2012) pokazali su da ftalati i BPA ispoljavaju slične toksikogenomičke, epigenetske i štetne efekte na ljudsko zdravlje, uključujući i razvoj gojaznosti. Zaključili su da je pet od deset mehanizama toksičnosti ftalata i BPA uključeno u inflamaciju, dok su četiri najznačajnija molekularna puta uključena u regulaciju metabolizma lipida [24,43,295]. Takođe su označili 89 zajedničkih gena za DEHP, DBP i BPA [24]. Međutim, imajući u vidu da su ovi podaci prikupljeni 2012. godine, u međuvremenu se broj gena u interakciji za ove tri supstance značajno povećao. Slično zapažanje može se dati za rezultate Dong i sar. (2018), koji su izvršili CTD analize BPA i DBP kao dodatno istraživanje *in vivo* eksperimentu na modelu zebrice. U svom istraživanju, Dong i sar. otkrili su 4826 i 14737 interakcija sa različitim genima za DBP i BPA, redom [296], što je, u poređenju sa brojem interakcija zabeleženim u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije (7076 za DBP i 54074 za BPA), znatno manje.

Dalja bioinformatička analiza u sklopu ove doktorske disertacije pokazala je da je metabolizam, posebno lipida i lipoproteina, bio najznačajniji molekularni put za izdvojeni skup gena. Biološki procesi povezani sa lipidima takođe su bili među 10 najvažnijih bioloških procesa, zajedno sa inflamatornim odgovorom, za koji se smatra da je veza između insulinske rezistencije, gojaznosti i dijabetesa. Pokazalo se da povećane koncentracije TNF- $\alpha$  i IL-6, povezane sa gojaznošću i T2DM, mogu dovesti do sniženja transdukcije insulinskog signala i ometati antiinflamatorni efekat insulina, što zauzvrat može da podstakne dalju inflamaciju [297]. IL-6 signalizacija dalje indukuje ekspresiju IL-10 i diferencijaciju T ćelija u T ćelije koje ekspimiraju IL-17, remeteći dalju diferencijaciju zapaljenskih medijatora ne samo u slučaju gojaznosti, već i njenih komorbiditeta [298]. Pored toga, TNF- $\alpha$  je uključen ne samo u inflamatorni odgovor, već i apoptozu masnog tkiva i metabolizam lipida, intenzivirajući lipogenezu, signalizaciju insulina i sintezu ROS. Novonastale ROS dalje indukuju proizvodnju drugih inflamatornih citokina i proinflamatornih transkripcionih faktora (npr. aktivator protein-1 (AP-1) i nuklearni faktor kapa B (NF- $\kappa$ B)) koji intenziviraju dalju proizvodnju ROS i mogu se smatrati *circulus vitiosus*-om [299,300]. Oksidativni stres je takođe naglašen kao jedan od važnih molekularnih mehanizama povezanih sa gojaznošću koji su ekstrahovani u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, dok je aktivnost SOD (delovanje na superoksidne radikale kao akceptor, kao i delovanje na uparene donore, sa ugradnjom ili redukcijom molekularnog kiseonika) bila prisutna među najvažnijim molekularnim funkcijama. Poznato je da oksidativni stres stimuliše deponovanje masnog tkiva, uključujući proliferaciju preadipocita, njihovu diferencijaciju i rast [300]. Furukava i sar. (2004) naveli su da se oksidativni stres u akumuliranim lipidima može smatrati značajnim mehanizmom metaboličkog sindroma povezanog sa gojaznošću, pa čak i zaključili da se redoks status u masnom tkivu može koristiti kao terapijska meta [301]. Štaviše, rezultatima *in silico* analize sprovedene u okviru ove doktorske disertacije aktivnost receptora nuklearnih i steroidnih hormona može se izdvojiti kao jedna od najvažnijih molekularnih funkcija. Ovo je i očekivano, pošto se rezultatima pokazalo da se sve tri supstance vezuju za ESR1 receptor i povećavaju ekspresiju mRNK ESR1 gena. Međutim, važno je imati u vidu da je uloga polnih steroidnih hormona u funkciji belog masnog tkiva složena, dok koncentracije androgena i estrogena mogu uticati na modulaciju funkcije belog masnog tkiva [302]. S druge strane, analiza molekularnih puteva pokazala je da visceralne masne naslage i metabolički sindrom, put transkripcije nuklearnih receptora i signalni put PPAR mogu biti istaknuti kao najznačajnija 3 molekularna puta povezana sa razvojem gojaznosti i izloženošću ispitivanoj smeši toksičnih supstanci.

Dakle, imajući u vidu da je većina metaboličkih bolesti isprepletana, cilj daljeg istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije bio je izdvojiti 10 komorbiditeta gojaznosti u koje je uključen 31 zajednički gen, ukazujući na to da je 7 gena (CCL2, IL6, LPL, PPARA, PPARG, SERPINE1, TNF) prisutno u etiologiji svih ovih komorbiditeta.



*In silico* analiza podataka pokazala je da sve tri ispitivane supstance na isti način deluju na PPARA i PPARG (geni koji kodiraju PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ ). U bazi podataka *DisGeNET*, PPARG je bio među genima za koje je istaknut najviši stepen povezanosti sa gojaznošću i iznosio je čak 0,900. Dok PPAR $\alpha$  reguliše oksidaciju masnih kiselina u nekoliko tkiva poznatih po visokim stopama oksidacije masnih kiselina, kao što su jetra, srce, bubrezi i smeđe masno tkivo, PPAR $\gamma$  je odgovoran za unos i skladištenje masnih kiselina, stimulišući akumulaciju triglicerida u adipocitima, sintezu NADPH za lipogenezu, gliceroneogenezu, kao i esterifikaciju masnih kiselina [43,303,304]. Međutim, aktivatori PPAR $\alpha$  vrše različita metabolička dejstva, u zavisnosti od vrste organizma, pola, doze i vremena izloženosti. Na primer, visoke doze DEHP (100 ili 1000 mg/kg t.m./dan) primenjene u trajanju od 13 nedelja štatile su odrasle miševе od gojaznosti izazvane ishranom promovišući oksidaciju masnih kiselina i katabolički metabolizam aktiviranjem PPAR $\alpha$  [305]. Naprotiv, kod miševa koji eksprimiraju humani PPAR $\alpha$ , perinatalna izloženost MEHP u malim dozama (0,5, 0,25 ili 0,05 mg/kg t.m./dan) podstakla je akumulaciju masti i pospešila razvoj gojaznosti [290]. Štaviše, treba uzeti u obzir i druge važne faktore, kao što je razlika između životinja i ljudi. PPAR $\gamma$ , ključan za razvoj belog masnog tkiva i adipogenezu, mnogo je izraženiji u humanim tkivima nego PPAR $\alpha$ . Takođe, zbog sekvence aminokiselina unutar domena vezivanja liganda, osetljivost aktivacije humanog PPAR $\alpha$  je niža u poređenju sa PPAR $\alpha$  kod glodara [306]. Hertz i sar. (1998) su pokazali da, za razliku od glodara, hipolipidemijski efekat koji vrše proliferatori peroksizoma kod ljudi nije praćen proliferacijom peroksizoma, niti indukcijom peroksizomalne  $\beta$ -oksidacije. Zaključili su da će biološki efekti proliferatora peroksizoma u jetri ljudi verovatno biti posredovani putem transdukcije nezavisnog od PPAR $\alpha$  [307]. Stoga, s obzirom na njegovu manju relevantnost kod ljudi u poređenju sa glodarima, PPARA isključen je iz dalje potrage za potencijalnim biomarkerima u okviru ove doktorske disertacije.

Drugi gen sa odgovarajućim interakcijama za DEHP, DBP i BPA u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije bio je SERPINE1. Ovaj gen kodira inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1), člana superfamilije inhibitora serin proteaza. SERPINE1 može biti povezan sa povećanim rizikom od T2DM i njegovih komplikacija, kao što su dijabetička retinopatija i dijabetička koronarna arterijska bolest [308]. Pored toga, Kaur i sar. (2010) sugerišu da ovaj gen predstavlja vezu između gojaznosti i dijabetesa [309]. Aktivacija SERPINE1 pomoću DEHP prikazana je u studiji na pacovima nakon intragastrične primene 600 mg/kg t.m./dan DEHP tokom graviditeta i dojenja [310].

Još jedan gen među identifikovanim potencijalnim biomarkerima u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije bio je CCL2. Ovaj gen za hemokine igra ulogu u hroničnoj inflamaciji i, slično kao SERPINE1, potencijalno dovodi do insulinske rezistencije i gojaznosti. Utvrđeno je da je CCL2 iRNK izraženija u adipocitima gojaznih osoba [311]. Pokazano je da ispitani ftalati i BPA stupaju u interakciju sa dodatna dva proinflamatorna markera, IL6 i TNF na isti način. Kao što je ranije napomenuto, ovi geni su blisko povezani sa hroničnom inflamacijom niskog stepena, takozvanom meta-inflamacijom, koja se javlja kod gojaznosti [312]. Ben-Jonathan i sar. (2009) su pokazali povećanje IL-6 i TNF- $\alpha$  nakon 6 h inkubacije eksplantata humanog potkožnog masnog tkiva sa BPA u dozama 0,1, 1, 10, 100 nM [313]. Mono-estri ftalata, MEHP i MBP, metaboliti DEHP i DBP, takođe su pokazali sposobnost da povećaju proizvodnju IL-6 u humanoј epitelnoj ćelijskoј liniji A549, dok je otkrivena proizvodnja citokina zavisila od koncentracije [314]. Ovo bi moglo ukazati na to da, ako deluju na aditivni način, pomenuti ftalati i BPA mogu dovesti do još većeg povećanja IL-6 nego kada su prisutni pojedinačno.

\*\*\*

CTD baza podataka korišćena je kao osnova toksikogenomičke analize sprovedene u ovoj studiji. U većini slučajeva, CTD se može smatrati pouzdanim resursom, posebno korisnim za generisanje proverljivih hipoteza o mehanizmima koji leže u osnovi etiologije različitih bolesti [134,137,138]. Ova baza podataka ažurira se na mesečnom nivou, čime se omogućava njena tačnost, kohezivnost i dostupnost podataka [134,135]. Činjenica da CTD stalno proširuje opseg podataka može se ogledati u velikoj razlici u broju informacija koje je ova baza sadržala 2010. i 2021. godini. U 2010. CTD baza je sadržala preko 240300 molekularnih interakcija između 5900

jedinstvenih hemikalija i 17300 gena/proteina [137], dok je 2021. godine ova baza sadržala 45 miliona toksikogenomičkih interakcija za preko 16300 hemikalija, 51300 gena, 5500 fenotipova i 7200 bolesti od 600 uporednih vrsta [315]. Interakcije između hemikalija, gena i bolesti unose se u CTD u skladu sa kontrolisanim uputstvima, dok se prikupljaju sledeće informacije: datum unosa podataka, identifikacioni broj osobe koja je unela podatke, *PubMed* identifikacioni broj, interakcija, vrsta organizma, hemikalija, gen/protein, srodne bolesti i kontakt informacije autora rada odakle je interakcija preuzeta [136]. Svi odabrani podaci se stavljaju u bazu podataka radi procene kontrole kvaliteta pre nego što budu objavljeni na internet stranici CTD. Važno je napomenuti da je kontrola kvaliteta moguća u CTD jer je svaka interakcija uneta korišćenjem regulisanih rečnika/ontologija sa ciljem da se obezbedi doslednost informacija [136,316].

Istraživanje u sklopu ove doktorske disertacije je dokazalo korisnost široko dostupnih alata za analizu toksikogenomičkih podataka. Međutim, CTD, *ToppGene Suite*, *DisGeNET* ili bilo koja druga *in silico* metoda poseduju pojedina ograničenja koja potvrđuju da toksikogenomička bioinformatička analiza podataka može poslužiti samo kao podrška drugim metodama u sveukupnom procesu ispitivanja toksičnosti. Analiza u velikoj meri zavisi od osnovnih onlajn izvora iz kojih se preuzimaju podaci. Takođe, oslanja se na kvalitet podataka o interakciji, imajući u vidu sve interakcije koje nedostaju, kao i moguće lažno pozitivne rezultate [153]. Dobijeni podaci pokazuju statističku povezanost između gena na koje utiču hemikalije i onih koji su uključeni u različita oboljenja, bez mogućnosti da se ispita odnos doza-odgovor [138]. Takođe, treba napomenuti da je izloženost hemikalijama složena, prilikom čega u obzir treba uzeti ne samo dozu, već i mnoge druge faktore, kao što su put izloženosti, trajanje, metabolizam i razvojna faza, kao i svi faktori životne sredine [134]. Nakon istraživanja tačnih interakcija između gena izdvojenih za različite bolesti i DEHP, DBP i BPA u CTD bazi podataka, rezultati studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije su ukazali na to da su mnoge od interakcija bile dvostruke prirode, što znači da neke od ovih supstanci mogu ili povećati ili smanjiti ekspresiju određenih gena. Na primer, u slučaju interakcija sa BAX genom, dok je DBP smanjio ekspresiju njegove iRNK, DEHP i BPA su pokazali sposobnost i da povećaju i da smanje njegovu ekspresiju. Ova pojava se takođe mogla primetiti u slučaju BCL2, pri čemu je utvrđeno da sve tri supstance utiču na ekspresiju iRNK ovog gena na oba načina. Sličan slučaj je bio i sa interakcijom DEHP, DBP i BPA sa genom CEBPA. Dok DEHP i DBP povećavaju ekspresiju CEBPA gena, podaci u CTD sugeriraju da bi BPA mogao i povećati i smanjiti njegovu ekspresiju. Ova pojava u velikoj meri zavisi od literature iz koje su izdvojene interakcije, posebno dizajna studije (vrsta, doza, put, trajanje izloženosti, itd). Takođe, ovo zapažanje se može pripisati NMDR pojavi, odnosno, obliku krive doza-odgovor koja menja svoj tok u zavisnosti od testirane doze, i koja se smatra jednom od važnih karakteristika EDC [317]. Dok se BPA veoma često dovodi u vezu sa NMDR [317], za ftalate je takođe poznato da mogu da izazovu ovu pojavu, uglavnom za efekte koji nisu povezani sa reproduktivnom funkcijom [225].

#### 5.1.11. Ostali toksični efekti na zebricama

Zebrica se obično koristi kao životinjski model u toksikološkim i ekotoksikološkim studijama, kao alternativa tradicionalnom modelu glodara [202,318]. Njome se lako rukuje, ima vizuelnu transparentnost, visoku reprodukciju i brz razvoj embriona [202,318]. Važno je da genomi zebrice i ljudi imaju oko 70% sličnosti, što zebricu čini poželjnim modelom za istraživanje ljudskih bolesti [318]. Toksičnost na embrione zebrice i/ili zebrice ispitivana je u različitim studijama pojedinačne i/ili kombinovane toksičnosti nakon izloženosti ftalatima/BPA, pri čemu su toksičnost po rast i razvoj, kardiotoksičnost i hepatotoksičnost bile glavni ispitivani toksični efekti. Međutim, prema našim saznanjima, studije koje istražuju kombinovane efekte DEHP, DBP i BPA na embrionima zebrice su ograničene, ili čak i ne postoje. U nekoliko studija pokazano je da embrioni zebrice izloženi DEHP imaju povećan rizik od malformacija. Kod embriona zebrice izloženih 10 mg/L DEHP, na primer, odnos deformiteta se povećao za 20% u odnosu na kontrolu, pri čemu je promena u strukturi bešike najčešći deformitet [319]. U svom eksperimentu, Hamid i sar. (2020) sugerisali su da, od 6 istraživana ftalata (uključujući DEHP i DBP), DEHP, DMP i DEP proizvode

najviše stope mortaliteta i deformiteta, uključujući krivinu repa i perikardijalni edem. Ovi istraživači su takođe procenili binarne kombinacije ftalata *in vitro* i na modelu embriona zebrice, utvrdivši da su DMP + DEP, DMP + DBP i DEP + BBP pokazali značajne sinergističke efekte *in vitro*. Nasuprot tome, njihov eksperiment na zebricama otkrio je kombinovane efekte binarnih smeša na regulaciju puta osovine hipotalamus-hipofiza-gonada u rastućem redosledu aditivnih > sinergističkih > antagonističkih efekata [320]. Sun i Li (2019) su otkrili da je izlaganje 1,8 mM DBP imalo značajan uticaj na razvoj embriona zebrice i stopu malformacija, izazvalo kardiotoksičnost, dok je izlaganje 3,6 mM DBP imalo značajan uticaj na sve ispitivane toksične efekte [321]. Kod embriona zebrice, 250 mg/L DBP ili DEHP snizio je broj otkucaja srca, sa 8,6 do 10,7% i 5,6 do 7,2% procenta inhibicije otkucaja srca, redom, dok je DBP takođe uzrokovao abnormalnosti kao što je perikardijalni edem [322]. Broj otkucaja srca je značajno povećan kod embriona u kasnijoj fazi razvoja (168 hpf) nakon tretmana nižim dozama DEHP (25 i 50 µg/L) [25]. Slično kao u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, nakon testiranja šest različitih ftalata, Pu i sar. (2020) su objavili da su, među njima, DBP i BBP doveli do smrtonosnih efekata čak i pri niskim dozama u embrionima zebrice, što ukazuje na veći nivo toksičnosti [323].

U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, prema utvrđenom EC<sub>50</sub>, DBP je bio najtoksičnija supstanca, zatim BPA, dok se DEHP pokazao najmanje toksičnim. Sve ispitivane supstance izazvale su efekti na rast i razvoj (deformisana glava, oči i otoliti) i pojavu znakova kardiotoksičnosti i hepatotoksičnosti. Smeša DEHP, DBP i BPA je bila toksičnija u poređenju sa pojedinačnim supstancama. U koncentracijama do 20 µg/mL, nijedna od ispitivanih supstanci nije izazvala po život opasne malformacije ili uticala na preživljavanje embriona; međutim, smeša je izazvala ozbiljnu hepatotoksičnost, kardiotoksičnost i teške telesne deformitete. Štaviše, nakon tri dana izlaganja kombinaciji koncentracija BPA, DEHP i DBP od 10, 20 i 20 µg/mL, redom, svi embrioni su uginuli, dok su embrioni tretirani pojedinačnim hemikalijama pri određenim nivoima preživeli čak i nakon pet dana tretmana.

## 5.2. PROTEKTIVNO DEJSTVO PROBIOTIKA

Zbog prisustva struktura koje uključuju teihoinisku kiselinu, egzopolisaharide, peptidoglikane, mananske oligosaharide u njihovom ćelijskom zidu, kao i funkcionalnih grupa kao što su –SH, –OH, –C=O, –N–H, i –C–N, probiotske bakterije i gljivice su sposobne da vezuju različite toksične supstance [93,103,109,113,324]. Još jedan bitan faktor odgovoran za adsorptivna svojstva probiotskih kultura je hidrofobnost površine bakterijske ćelije [112], u velikoj meri uključena u adsorpciju ftalata [93]. S druge strane, Kirila i sar. (2021) su čak zabeležili sposobnost probiotskih kultura (*Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis* i *Saccharomices cerevisiae*) da razgrađuju BPA [325], dok su Ju i sar. (2019) potvrdili da je stopa degradacije BPA u slučaju bakterije *Lactobacillus reuteri* čak 69,83% [326]. Pretpostavlja se da su multikomponentni probiotici, sastavljeni od smeše korisnih mikroorganizama, sposobniji da vezuju toksične supstance u poređenju sa jednokomponentnim [327]. Na primer, smeša probiotskih bakterija i gljivica (*Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum* zajedno sa *Saccharomices cerevisiae* i *Kluiveromices lactis*) bila je u stanju da veže veću količinu mikotoksina u poređenju sa pojedinačnim sojem bakterija/gljivice [328]. Štaviše, sugerisano je da je upotreba kombinacija sojeva korisna u slučaju izlaganja smeši toksičnih supstanci [106].

Mnoge studije su istraživale mehanizme pomoću kojih probiotici mogu smanjiti toksične efekte različitih supstanci iz životne sredine. Kada je o ftalatima reč, većina autora se bavila kapacitetom različitih probiotskih kultura da vežu DBP i njegov glavni metabolit, MBP. U studiji koju su sprovedeli Lili i sar. (2017), na kapacitet odabranih LAB sojeva (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus helveticus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Bifidobacterium bifidum*) za adsorbovanje DBP uticala je njihova hidrofobnost na površini ćelije, prilikom čega je smanjena hidrofobnost bila povezana sa većim procentom vezivanja DBP. Štaviše, sojevi sa jačom sposobnošću adhezije za creva bili su efikasniji u adsorbovanju DBP [93]. S druge strane, od

testiranih sojeva, Zhao i sar. (2020) otkrili su da *Leuconostoc mesenteroides* DM12 pokazuje najveći procenat vezivanja DBP (87%) i zaključili da je peptidoglikan na ćelijskom zidu bakterije ključan za vezivanje, pri čemu su -O-H, -C=O i -N-H glavne funkcionalne grupe uključene u ovaj proces [329]. Prema Zhu i sar. (2018), nekoliko različitih sojeva *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus fermentum* eliminisalo je više od 25% MBP, dok je kompleks koji sadrži MBP i *Lactobacillus plantarum* DL7Ks ili R66 bio najstabilniji među 30 odabranih LAB sojeva. U ovoj studiji, takođe je otkriveno da probiotske kulture eliminišu različite procenat monometil ftalata (MMP), monoetil ftalata (MEP) i monoetil ftalata (MEP) iz životne sredine [46]. Na osnovu rezultata Zhu i sar. (2019), sposobnost vezivanja MBP takođe je otkrivena kod probiotičkog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), sa stopom vezivanja od 60 procenata pri 50 mg/L MBP. Ovi autori su zaključili da je proces vezivanja prilično brz, prilikom čega za 15 minuta dolazi do značajnog uklanjanja MBP [330]. Takođe je utvrđeno da različiti probiotički sojevi ne samo da adsorbuju BPA, već ga mogu i razgraditi. Zhu i sar. (2017) su otkrili da se značajna količina BPA (24,48 - 50,80%) može eliminisati iz vodenog rastvora. *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus plantarum* su vezali do 48,11 i 53,24 % BPA, redom [94]. Endo i sar. (2007) otkrili su da je *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 712 je imao najveći odnos eliminacije BPA od deset proučavanih probiotskih sojeva. Ipak, u ovom istraživanju, pokazalo se da ispitivane bakterije samo apsorbuju BPA, a ne i razgrađuju [331]. Ju i sar. (2019), s druge strane, otkrili su sposobnost *Lactobacillus reuteri* da razgradi BPA, sa stopom razgradnje do 69,83 odsto [326]. Takođe, Kirila i sar. (2021) su pokazali sposobnost pet različitih probiotskih kultura (*Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, and *Saccharomyces cerevisiae*) ne samo da uklone, već i da razgrade BPA do hidrohina, 4-hidroksiacetofenona, 4-hidroksibenzojeve kiseline i 4-izopropenilfenola [325], a Taghizadeh Moghaddam i sar. (2020) pokazali su sposobnost *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus acidophilus* da smanje nivoe BPA u jogurtu za 82,8 i 43,44 %, redom [332].

Halttunen i sar. (2007b) zaključili su da, iako pojedinačne sojeve treba koristiti za uklanjanje određenih hemikalija, kombinovanje sojeva za uklanjanje više supstanci odjednom može biti korisno [333]. Štaviše, Apas i sar. (2014) otkrili su da se u nekim slučajevima zaštitni probiotički efekti mogu povećati ako se koristi više od jednog soja. Shodno tome, u njihovoj studiji, najveće smanjenje mutagenosti BPA dogodilo se u prisustvu kombinacije probiotskih sojeva [334]. Ovo je bilo u skladu sa rezultatima studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije, gde je utvrđeno da probiotik koji sadrži više sojeva vezuje 29,25, 29,04 i 41,75% DEHP, DBP i BPA prisutnih u smeši, redom, dok je *Saccharomyces boulardii* vezao manji procenat ispitivanih supstanci (16,79, 15,66 i 15,63% za DEHP, DBP i BPA prisutne u smeši, redom). Procenat vezivanja prikazan u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije bio je niži u poređenju sa većinom drugih studija, verovatno zbog različitih eksperimentalnih uslova i činjenice da su u eksperimentu sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije sve tri supstance bile prisutne u smeši. Takođe treba uzeti u obzir da *in vitro* studije ne mogu u potpunosti da prikažu okolnosti i složene procese koji se dešavaju u ljudskom telu. Na primer, treba razmotriti i druge pozitivne probiotske efekte koji bi mogli doprineti ublaženju toksičnosti različitih supstanci poreklom iz životne sredine. Pokazalo se da neki probiotski LAB sojevi pojačavaju aktivnost antioksidativnih enzima ili regulišu i ublažavaju cirkulatorni oksidativni stres, čime štite ćelije od oštećenja [335], što bi delimično moglo da stoji iza zaštitnih efekata uočenih u istraživanju sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije. Utvrđeno je da oba soja *Saccharomices boulardii* i *Lactobacillus* povećavaju aktivnosti antioksidativnih enzima i inhibiraju lipidnu peroksidaciju [107,336]. Na primer, Oumeddour i sar. (2019) su pokazali da je antioksidativna aktivnost probiotskih bakterija *Lactobacillus acidophilus* u potpunosti odgovorna za prevenciju peroksidacije lipida u ćelijskoj membrani jetre izazvane ugljen-tetrahloridom [337]. Takođe se pokazalo da probiotske ćelije snižavaju nivoe masti i holesterola putem različitih mehanizama. Jedan od njih je asimilacija holesterola, što rezultira smanjenjem nivoa holesterola dostupnog za apsorpciju. Druga dva su enzimska dekonjugacija žučnih kiselina putem hidrolaze žučne soli i sposobnost LAB da generiše ferulnu kiselinu, koja inhibira hepatičnu HMG-CoA-reduktazu i olakšava izlučivanje kiselog sterola [96,100,101]. Yadav i sar. (2007) su

takođe potvrdili da je suplementacija probiotskim bakterijama (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) značajno odložila pojavu intolerancije na glukozu, hiperglikemije, hiperinsulinemije, dislipidemije i oksidativnog stresa kod pacova izazvanih dijabetesom, što implicira smanjenje rizika od dijabetesa i njegovih komplikacija [338,339]. Nadalje, sposobnost određenih *Lactobacillus* sojeva (*L. rhamnosus*, 4B15 (4B15) and *L. gasseri* 4M13 (4M13)) da inhibira aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze, proizvodnju NO, kao i oslobađanje inflamatornih medijatora kao što su TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1b i IL-10, takođe je dokumentovana [340]. Štaviše, *Saccharomyces boulardii* proizvodi rastvorljivi faktor male molekulske mase koji inhibira NF- $\kappa$ B aktivaciju i NF- $\kappa$ B-posredovanu ekspresiju IL-8 gena u epitelnim ćelijama creva i monocitima, što rezultira antiinflamatornim efektima [341]. Važno je imati u vidu i da stanje unutar creva može dodatno uticati i poboljšati sposobnost vezivanja. Tri istraživanja su razmatrala uticaj probiotskih kultura *in vivo* kada su date uz BPA ili kombinaciju BPA i ftalata. Dodavanje 5% *Bifidobacterium breve* ili 5% *Lactobacillus casei* ishrani pacova pet dana pre oralne primene BPA (10 mg/kg) rezultiralo je vremenski zavisnim smanjenjem koncentracije nekonjugovanog BPA u krvi i povećanjem fekalne ekskrecije BPA. Ovi nalazi su pokazali da korišćeni probiotski sojevi imaju potencijal da apsorbuju BPA i olakšaju njegovo izlučivanje [95].

Imajući sve ovo u vidu, deo eksperimentalne studije na pacovima i zebricama sproveden u sklopu ove doktorske disertacije imao je za cilj da istraži da li bi unos višekomponentnog probiotika mogao da smanji toksične efekte smeše ftalata i BPA nakon subakutne izloženosti. Praćenjem različitih hematoloških, biohemijskih i parametara endokrine funkcije, patohistologije organa, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i bioelemenata, pokazano je da primena probiotika može imati protektivne efekte na nivou različitih tkiva i organa, kao i na lipidni status i nivo glukoze u serumu, prirast mase, konzumaciju hrane, hormonalni nivo kao i uticaj na smanjenje sistemskog zapaljenja.

### 5.2.1. Promene kod pacova izazvane smešom ftalata i bisfenola A

#### 5.2.1.1. Dejstvo na jetru

Rezultati do sada sprovedenih studija ukazali su na povezanost između izloženosti ftalatima i povećanja relativne mase jetre [185,342,343], čak i do 35% u slučaju DEHP [185]. U eksperimentu sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije, primećen je statistički značajan porast relativne mase jetre u MIX grupi u poređenju sa kontrolom ( $p < 0,001$ ), kao i u MIX + P grupi ( $p < 0,05$ ). Međutim, bio je mnogo izraženiji u MIX nego u MIX + P grupi u poređenju sa kontrolom, što ukazuje na potencijalni zaštitni efekat probiotika. Ovaj trend se takođe mogao uočiti i u slučaju biohemijskih parametara jetre, posebno serumskih aminotransferaza, koje su osetljivi markeri hepatocelularnih oštećenja. Povećanje aktivnosti AST i ALT u serumu omogućava utvrđivanje oštećenja jetre i pre pojave prvih simptoma [196]. Iako su aktivnost ALT i AST i ukupna koncentracija bilirubina bile značajno više u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom, nije bilo značajne razlike u MIX + P grupi u poređenju sa kontrolnom, što sugeriše da je primena probiotika umanjila hepatotoksične efekte. U eksperimentima na pacovima, histološke promene u jetri su uglavnom primećene u grupama koje su primale DEHP i BPA [189,190,344]. Eksperiment u kome su pacovi primali 0,05, 5 i 500 mg/kg t.m/dan DEHP tokom 8 nedelja pokazao je da se oštećenje jetre povećavalo sa dozom DEHP, uključujući i povećanje upale i edema jetre [189]. Pri primeni ove supstance u još višim dozama (250, 500 i 750 mg/kg t.m/dan) tokom 30 uzastopnih dana, histološke promene u jetri obuhvatale su smanjeni broj i povećanu veličinu hepatocita [190]. U slučaju BPA, Elswefy i sar. (2016) pokazali su da 50 mg/kg t.m/dan BPA dato odraslim pacovima tokom 8 nedelja izaziva fibrozu jetre. Slično rezultatima studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije, to se odrazilo na povećanje aktivnosti ALT i AST u serumu, ali i povećanje nivoa hepatičnog hidrosiprolina, pri čemu je pokazano da inflamacija, oksidativni stres i apoptoza najverovatnije predstavljaju mehanizme uključene u nastanak oštećenja jetre, kao i fibroze izazvane BPA [81]. Slično tome, poznato je da DEHP i njegovi metaboliti indukuju ekspresiju gena

uključenih u nastanak oksidativnog stresa. Povišeni oksidativni stres, posebno ROS, mogu dovesti do gubitka ćelijske funkcije i konačno apoptoze, što može biti uzrok uočenih histoloških promena [196]. U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, uočeno je da povišenje TOS i koncentracije MDA u homogenatima tkiva jetre prisutno u grupi životinja koje su primale smešu toksičnih supstanci nije bilo prisutno u grupi koja je osim smeše primala i probiotik. Takođe, u slučaju parametara kod kojih nije primećena značajna promena u odnosu na kontrolnu grupu, moglo se uočiti da su vrednosti  $O_2^-$  blago povišene, a vrednosti SH blago snižene u MIX grupi u odnosu na MIX + P. Takođe, dodatak probiotika u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije otklonio je promene u nivu bioelemenata u tkivu jetre (pad nivoa Zn i porast Fe u MIX grupi). Činjenica da sojevi *Saccharomices boulardii* i *Lactobacillus* funkcionišu kao antioksidansi, povećavajući aktivnosti antioksidativnih enzima i inhibirajući peroksidaciju lipida [107,336], ukazuju na to da antioksidativni efekti mogu biti dodatni mehanizam kojim ove probiotske kulture mogu ublažiti toksičnost ftalata i BPA. Takođe, sposobnost *Saccharomices boulardii* da štiti crevna tkiva od inflamatornih efekata hepatotoksičnih sredstava kao što su klaritromicin i metotreksat pokazana je u jednonedeljnom eksperimentu na pacovima [336]. Nalazi ove studije sugerisu da *Saccharomices boulardii* ublažava oštećenje creva, kao i prateće zapaljenje jetre, podržavajući antioksidativno stanje tkiva i inhibirajući nakupljanje neutrofila [336]. Štaviše, Oumeddour i sar. (2019) pokazali su da je antioksidativna aktivnost probiotskih bakterija soja *Lactobacillus acidophilus* odgovorna za potpunu prevenciju lipidne peroksidacije ćelijske membrane izazvane ugljen-tetrahloridom [337]. U eksperimentu sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije, patohistološke promene na jetri MIX grupe obuhvatale su umerenu dilataciju sinusoida u lobulusima, pretežno oko centralne vene. U nekim slučajevima, portni prostori su bili umereno prošireni, zbog povećanog broja limfocita i eozinofila. Očekivano, u MIX + P grupi, primena probiotika umanjila je primećene efekte smeše, dok je jedina otkrivena promena u poređenju sa kontrolom bila umerena dilatacija sinusoida oko centralnih vena. Ovi rezultati bi se mogli pripisati antioksidativnim efektima probiotika i njegovoj sposobnosti da smanji apsorpciju i poveća izlučivanje ispitivane smeše toksičnih supstanci.

#### 5.2.1.2. Dejstvo na glukozu i lipidni profil

Literaturni podaci ukazuju na to da probiotske kulture mogu uticati na telesnu masu i imati povoljan efekat na poremećaje povezane sa gojaznošću na modelima eksperimentalnih životinja, ali takođe mogu uticati i na metabolizam glukoze i lipida, poboljšati osetljivost na insulin i smanjiti hroničnu sistemsku inflamaciju [345,346]. Na primer, u svojoj studiji na subjektima sa normalnom ili poremećenom osetljivošću na insulin, Andreasen i sar. (2010) pokazali su sposobnost *Lactobacillus acidophilus* da poboljša osetljivost na humani insulin ublažavanjem sistemske inflamacije [347]. Štaviše, davanjem probiotskog jogurta koji sadrži *Lactobacillus acidophilus* La5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 pokazano je da *lactis* Bb12 smanjuje nivo glukoze u krvi natašte i povećava antioksidativne aktivnosti u kliničkim studijama [348]. Takođe, *Lactobacillus casei* CCFM419 ublažio je insulinsku rezistenciju i hiperglikemiju kod miševa sa T2DM izazvanim ishranom sa visokim sadržajem masti i primenom streptozotocina [349,350]. Niibo i sar. (2019) su naglasili da je glavni efekat probiotika na T2DM supresija inflamacije, što je pokazano smanjenjem nivoa CRP u serumu. Takođe su pokazali da dijetetski LG2055 poboljšava lučenje insulina supresijom sistemske inflamacije i upale pankreasa kod pacova kod kojih je prethodno izazvan DM [351].

Rezultati studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije pokazali su hepatotoksične efekte ispitivane smeše, kao i sposobnost probiotika da smanji navedene efekte. Ovo je značajno uzimajući u obzir da je jetra jedan od ključnih organa za regulisanje metabolizma glukoze, deponujući povišenu glukozu u krvi u obliku glikogena i kontrolišući sintezu glukoze pomoću glukoneogeneze [352]. Eksperimentalni podaci ukazuju na povezanost BPA i nekih ftalata, uključujući DEHP i DBP, na razvoj gojaznosti i T2DM [353]. Kao što je ranije naglašeno, poznato je da ovi EDC ometaju različite signalne puteve ćelija uključene u homeostazu glukoze, dok visoki

nivo glukoze često može biti praćen abnormalnostima lipida kao što su povećani nivoi triglicerida i LDL i smanjenje nivoa HDL [353]. Rezultati studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije su ukazali na značajan porast nivoa glukoze i LDL holesterola u MIX grupi, kao i na smanjenje HDL holesterola u poređenju sa kontrolom. Suprotno ovome, u MIX + P grupi nije bilo značajne razlike između svih ovih parametara i kontrolne grupe, što potvrđuje zaštitni efekat probiotika protiv ispitivane smeše toksičnih supstanci. Ovo se takođe može objasniti sposobnošću probiotskih ćelija da smanje nivo lipida i holesterola pomoću nekoliko predloženih mehanizama. Jedan od njih je ranije pomenuta asimilacija holesterola i smanjenje nivoa holesterola u lumenu dostupnog za apsorpciju. Druga dva mehanizma obuhvataju enzimsku dekonjugaciju žučnih kiselina hidrolazom žučnih soli i sposobnost LAB da proizvodi ferulnu kiselinu, koja inhibira hepatičnu HMG-CoA-reduktazu i pospešuje izlučivanje kiselog sterola [96,100,101] i relevantniji su imajući u vidu da su životinje hranjene standardnom, a ne hranom za pacove sa visokim sadržajem masti. Shodno tome, Yadav i sar. (2007) potvrdili su da je suplementacija probiotskim bakterijama (*Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus casei*) značajno odložila pojavu intolerancije na glukozu, hiperglikemije, hiperinsulinemije, dislipidemije i oksidativnog stresa kod pacova sa indukovanim dijabetesom, što ukazuje na manji rizik od dijabetesa i njegovih komplikacija prilikom primene probiotika [338,339]. Takođe je pokazano da *Lactobacillus rhamnosus* GG snižava nivo hemoglobina A1C u krvi i poboljšava toleranciju glukoze kod pacova sa dijabetesom indukovanim neonatalno primenjenim streptozotocinom [354]. Pored toga, u eksperimentu u kojem je miševima oralno aplikovana probiotska bakterija *Lactobacillus rhamnosus* GG tokom 13 nedelja, implicirao je da ovaj soj probiotika može zaštititi životinje od rezistencije na insulin, kao i umanjiti adipozitet u jetri i mezenteričnom masnom tkivu. Ovi autori su pretpostavili da su navedeni efekti posredovani povećanom oksidacijom masnih kiselina u jetri i mišićima, smanjenom glukoneogenezom u jetri, povećanom ekspresijom GLUT4 u mišićima i povećanom sekrecijom adiponektina u belom masnom tkivu [355]. Efekti *Saccharomices boulardi* na smanjenje ukupnog sadržaja lipida u jetri i smanjenje relativne mase jetre takođe su demonstrirani u studiji na miševima u kojoj je ovaj probiotski kvasac davan svakodnevno u toku 4 nedelje oralnom gavažom miševima otpornim na leptin kod kojih je indukovana T2DM [356]. Iz ovih razloga, moglo bi se pretpostaviti da je probiotik u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije dodatno vršio protektivnu ulogu utičući na toksične efekte ispitivane smeše na nivou regulacije metabolizma lipida i glukoze. Takođe, rezultati studije sprovedene u okviru ove doktorske disertacije su pokazali da je primena probiotika imala povoljne efekte kako na prooksidativne (TOS i MDA) tako i na antioksidativne parametre (SOD i SH grupe) izmerene u homogenatu tkiva pankreasa, umanjujući promene izazvane smešom DEHP, DBP i BPA. Treba napomenuti da je smanjenje SOD uočeno u MIX grupi bilo još izraženije u poređenju sa P grupom nego u kontrolnoj grupi. Ovo ukazuje na blago (iako ne statistički značajno) povećanje aktivnosti SOD u P grupi u poređenju sa kontrolnom, što ukazuje na moguća korisna antioksidativna svojstva probiotika. Isto tako, povećanje MDA moglo se primetiti samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom ( $p < 0,05$ ), ali i u poređenju sa P grupom ( $p < 0,01$ ). Pored toga, koncentracija MDA bila je neznatno, iako ne značajno niža u P grupi u poređenju sa kontrolnom, što ukazuje na pozitivan uticaj probiotika na lipidnu peroksidaciju.

#### 5.2.1.3. Dejstvo na slezinu i inflamaciju

Primena smeše toksičnih supstanci u MIX grupi dovela je do značajnog povećanja nivoa WBC, LYM, MON, NEU i CRP u odnosu na kontrolu, što ukazuje na sistemsku inflamaciju niskog stepena. Nasuprot tome, nijedan od ovih parametara nije se značajno razlikovao u MIX + P grupi u poređenju sa kontrolnom. Studija u kojoj je *Saccharomices boulardii* svakodnevno aplikovan oralnom gavažom gojaznim miševima otpornim na leptin i miševima sa indukovanim T2DM tokom 4 nedelje pokazala je da su čak i drugi sistemski biomarkeri upale bili sniženi nakon tretmana probioticima [356]. Koncentracije citokina IL-6 i IL-4 u plazmi bile su skoro dvostruko snižene kod miševa koji su primali probiotik, dok je TNF- $\alpha$  bio približno snižen za 20% [356]. Proinflamatorni citokini, koji igraju centralnu ulogu u imunskom odgovoru, uglavnom proizvode limfociti,

monociti, granulociti, epitelne ćelije i fibroblasti [357]. Eksperiment u kojem je miševima sa indukovanim kolitisom davan *Lactobacillus plantarum* CBT tokom 7 dana, dokazao je antiinflamatorne efekte ovog LAB soja, sa povećanom indukcijom regulatornih T ćelija i Th2 ćelija u splenocitima i restauracijom peharastih ćelija praćenom supresijom ekspresije proinflamatornih citokina. Ovi autori sugerišu da se sistemski antiinflamatorni efekti probiotika i važne imunomodulatorne uloge javljaju uglavnom u limfocitima [358].

Slezina je centralni organ u regulisanju imunskog odgovora povezanog sa zapaljenjem, uglavnom putem eliminacije cirkulišućih apoptotskih ćelija, što omogućava fino podešavanje imunskog sistema [359,360]. Slezina u beloj pulpi sadrži visok nivo specijalizovanih T-ćelija i B-ćelija koje proizvode nove imune ćelije i antitela, redom [360]. Patohistološke promene u slezini su uglavnom ispitivane nakon izlaganja BPA i DEHP. Studija u kojoj su miševi bili oralno izloženi 40 mg/kg t.m./dan BPA od začeca do 12-14 nedelja starosti rezultirala je minimalnim smanjenjem veličine, broja i celularnosti periarterioloznog limfoida i PALS [361]. Efekti DEHP na slezinu su uglavnom ispitivani na mišjem modelu, *in vitro* i *in vivo*. Eksperimenti na timocitima miševa su pokazali da makrofagi slezine indukuju različite citokine kao što su TNF $\alpha$  i IL-1 [362], kao i IL-3, IL-4 i IFN $\gamma$  nakon izlaganja DEHP [363]. U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, histološke promene, uključujući smanjenje veličine PALS, smanjenu celularnost marginalne zone bele pulpe slezine i povećanje ekstramedularne hematopoeze u crvenoj pulpi slezine zabeležene su u MIX grupi. Shodno tome, relativna težina slezine bila je značajno niža u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom. Međutim, iako su primećene male promene u nekim uzorcima slezine u MIX + P grupi, one su bile primetno ublažene u poređenju sa MIX grupom. Od parametara oksidativnog stresa merenih u homogenatima tkiva slezine, od značajnih promena zabeleženih u MIX grupi u odnosu na kontrolnu, tretman probiotikom povoljno je uticao u slučaju MDA i SH grupa, u potpunosti uklonivši promene na nivu SH grupa i ublaživši porast MDA. Pored toga, značajno povećanje u MIX grupi zabeleženo je u RBC, HGB, HCT, kao i MCHC u poređenju sa kontrolom. Nijedna od ovih promena nije zabeležena u MIX + P grupi, dok su uočene histološke promene u poređenju sa kontrolom bile manje izražene i nisu bile prisutne u svim uzorcima. Ovi rezultati bi potencijalno mogli biti povezani sa sistemskim antiinflamatornim efektima probiotika u limfocitima.

#### 5.2.1.4. Dejstvo na bubrege

U eksperimentu u kojem su mužjaci pacova u prepubertetskom periodu primali doze sa 0, 100, 200 i 400 mg/kg t.m./dan DEHP tokom 4 nedelje, nivo ureje se značajno smanjio pri 100 mg/kg t.m./dan DEHP, ali se značajno povećao pri dozi 200 i 400 mg/kg t.m./dan. Takođe, mikroskopske analize tkiva bubrega u grupama koje su primale DEHP otkrile su glomerularnu degeneraciju i infiltraciju mononuklearnih ćelija [196]. Mjajeed i sar. (2017) demonstrirali su povećanje težine bubrega nakon tretmana DBP (10 mg/kg t.m./dan i 50 mg/kg t.m./dan) u periodu od 13 nedelja [173], dok su kod pacova kojima je aplikovano 100 mg/kg t.m./dan BPA intraperitonealnom injekcijom tokom 15 dana, histološke promene bubrega uključivale dilataciju glomerula i degeneraciju epitela proksimalnih tubula, praćene značajnim povećanjem nivoa kreatinina i uree u serumu [364]. U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije zabeleženo je značajno povećanje relativne mase bubrega i nivoa ureje u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom. Pored toga, blago, ali ne značajno povećanje nivoa mokraćne kiseline zabeleženo je u MIX grupi. Nijedna od ovih promena nije primećena u MIX + P grupi. Mikroskopskim ispitivanjem bubrežnog tkiva uočeno je fokalni gubitak četkastog pokrova tubulocita u korteksu, sa blagom dilatacijom tubula u grupi MIX, dok su ove promene bile blaže u grupi MIX + P. Takođe, u homogenatu tkiva bubrega, dodatak probiotika ublažio je povišenje koncentracije MDA, iako je ovaj parametar bio blago, iako ne statistički značajno povišen u MIX + P grupi u odnosu na kontrolnu. Zaštitni efekat probiotika protiv oštećenja bubrega izazvanih hemikalijama istražen je u studiji koja je imala za cilj da proceni efikasnost *Lactobacillus plantarum* i *Bacillus coagulans* protiv toksičnosti izazvane živom na modelu pacova [365]. Rezultati ove studije pokazali su da je



primena probiotika ublažila toksičnost žive smanjenjem nivoa bilirubina, uree i kreatinina, uglavnom vezivanjem i uklanjanjem žive iz digestivnog trakta [365], što je verovatno mehanizam kojim je probiotik u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije ublažio toksične efekte povezane sa bubrežima.

#### 5.2.1.5. Dejstvo na ostale parametre

U istraživanju sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije značajno smanjenje prirasta telesne mase u MIX grupi u poređenju sa kontrolom bilo je prisutno u svim odabranim vremenima praćenja (1, 7, 14, 21. i 28. dan istraživanja), dok je nakon treće nedelje, iako prisutno u svim tretiranim grupama, najviše bilo izraženo u MIX grupi. Međutim, posle četvrte nedelje tretmana, sniženje BWG moglo se primetiti samo u MIX grupi u poređenju sa kontrolnom. Povećanje telesne mase je takođe bilo značajno niže u grupama P i MIX + P nakon 3. nedelje primene. Treba napomenuti da je i u svim ostalim vremenskim periodima u P grupi bio neznatno, ali ne i značajno niže. Poznato je da probiotici utiču na telesnu masu, unos hrane i apetit, kao i na metaboličke funkcije kroz gastrointestinalne puteve i modulaciju crevne bakterijske zajednice, što je razlog zašto mnogi naučnici pretpostavljaju da bi se manipulisanje mikrobiotom creva za poboljšanje metabolizma domaćina moglo koristiti za regulisanje gojaznosti i srodnih poremećaja [345]. Međutim, u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, ovi efekti su bili primetni tek kasnije u eksperimentu, verovatno zbog vremena koje je bilo potrebno probiotiku da ponovo uspostavi uslove ravnoteže u digestivnom traktu. U grupi P nije zabeležena značajna razlika u unosu hrane tokom vremena, dok je primena probiotika uspeła da poboljša efekte smeše u grupi MIX + P. Dodatno, pozitivan efekat probiotika primećen je na nivou hormona. Dok je smeša toksičnih supstanci dovela do značajnog povećanja nivoa T4 u serumu i smanjenja odnosa T3/T4 i nivoa testosterona u serumu u poređenju sa kontrolom, tretman probiotikom je umanjio sve navedene efekte u grupi MIX + P. Naša studija je pokušala da istraži da li probiotik može da smanji moguću neurotoksičnost izazvanu ispitivanom smešom. Prema literaturi, moguće su promene neurona kore velikog mozga i neurofibrilarnog matriksa u slučaju izlaganja DEHP i BPA, kao i spongiformna degeneracija matriksa, pojava inflamatornih infiltrata u intersticijumu, degenerativne promene i smanjenje broja Purkinjeovih neurona u korteksu velikog mozga [366,367]. Međutim, nijedna od navedenih promena nije otkrivena u studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, najverovatnije zbog nižih doza toksičnih supstanci korišćenih u eksperimentu. To znači da, da bi se ispitao mogući zaštitni efekat probiotika na neurotoksičnost, treba primenjivati više doze toksičnih supstanci, u dužem vremenskom periodu. U studiji sprovedenoj u okviru ove doktorske disertacije, zaštitni efekti probiotika dodatno su ispitani merenjem oksidativnog stresa i nivoa bioelemenata u plazmi i tkivu različitih organa. Dodatak probiotika otklonio je sve statistički značajne promene u parametrima oksidativnog stresa prisutne u plazmi, uključujući povišenje nivoa TOS i sniženje aktivnosti SOD i koncentracije SH grupa. Takođe, probiotik je u potpunosti ublažio promene TOS, TAS, OSI indeksa i SH grupa u homogenatima tkiva timusa. S druge strane, u homogenatu tkiva pluća, probiotik je ublažio smanjenje aktivnosti SOD uočeno u MIX grupi i potpuno otklonio promenu u nivou AOPP. Štaviše, dodatak probiotika je otklonio promenu nivoa Zn u plućima i ublažio promene u koncentraciji i Fe i Zn u tkivu timusa. Takođe, u homogenatu tkiva testisa, dodatak probiotika je u potpunosti otklonio uočene promene u slučaju pojedinih parametara (TOS, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, MDA), a ublažio promene u slučaju drugih (TAS, SOD).

#### 5.2.2. Promene na zebričama izazvane smešom ftalata i bisfenola A

U eksperimentu na embrionima zebričica sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije takođe je zabeleženo protektivno dejstvo probiotika. Na osnovu dobijenih rezultata, *Saccharomyces boulardii* nije ispoljio vidljivo protektivno dejstvo protiv teratogenih efekata smeše DEHP/DBP/BPA, niti je umanjio perikardijalni edem indukovani dejstvom BPA, dok je višekomponentni probiotik ispoljio vrlo jasno protektivno dejstvo, prilikom čega su svi embrioni zebričica izloženi najvišim koncentracijama ove tri supstance u smeši preživeli, ali nije uspeo u

potpunosti da otkloni kardio- i hepatotoksične efekte. Takođe, višekomponentni probiotik sprečio je nastanak perikardijalnog edema, dok se u slučaju jednokomponentnog probiotika edem prouzrokovan BPA javio, iako manje naglašen nego u slučaju odsustva probiotika. Pri tretmanu smešom toksičnih supstanci, i višekomponentni i jednokomponentni probiotik ispoljili su protektivno dejstvo kada je reč o tretmanu nižom dozom ispitivanih supstanci. Ipak, pri najvišoj dozi ispitivanih supstanci prisutnih u smeši jedino su embrioni zebrića tretirani najvišom koncentracijom i višekomponentnim probiotikom preživeli, iako sa vidljivim toksičnim efektima: razvojem perikardijalnog edema i neresorbovanog žumanceta i gotovo neprimetnom fluorescencijom. Na osnovu dosada publikovane literature, protektivni efekat probiotika pri izloženošću smeši ftalata i BPA na embrionima zebriće do sada nije ispitan. Većina studija ovog tipa fokusirala se na izloženost odraslih jedinki, pri čemu su najčešće testirane supstance bile perfluorobutansulfonata (PFBS) [368–370], dok je jedna studija ispitala protektivni efekat protiv BPA [371], a jedna protiv triklosana [372]. Studija Giommi i sar. (2021) pruža informacije o ulozi višekomponentnog probiotika u suzbijanju štetnih efekata BPA prisutnog u istoj koncentraciji kao u eksperimentu sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije (10 µg/L) na reproduktivnu funkciju zebrića nakon izloženosti u trajanju od 28 dana. Studija je sprovedena na izolovanim folikulima ženki klase III (vitelogeni) i IV (u sazrevanju), sa naglaskom na modulaciji različitih izoformi vitelogenina. Kod mužjaka zebrića su ispitivani ključni molekularni procesi uključeni u regulaciju spermatogeneze. Rezultati ove studije su pokazali da je kod zebrića izloženih kombinaciji BPA i probiotika većina transkripata bila u nivou kontrolne grupe, podržavajući hipotezu da probiotik ublažuje toksičnost BPA [371]. Chen i sar. (2020) ispitivali su sposobnost *Lactobacillus rhamnosus* da ublaži toksične efekte PFBS nakon izlaganja odraslih zebrića ovoj supstanci u koncentracijama 0, 10, and 100 µg/L u toku 28 dana. Kod ženki, kombinacija PFBS i probiotika povećala je sintezu masnih kiselina i β-oksidaciju, ali je ublažila akumulaciju holesterola u krvi izazvanu PFBS. Kod mužjaka zebriće, primena probiotika je antagonizirala indukovane poremećaje metabolizma žučnih kiselina nastale pod dejstvom ove toksične supstance. Međutim, istovremeno izlaganje PFBS i probiotiku izazvalo je značajnu akumulaciju triglicerida u jetri mužjaka (2,6 puta višu u odnosu na kontrolu), što implicira indukciju steatoze jetre [368]. Chu i sar. (2020) takođe su ispitivali potencijalno protektivno dejstvo *Lactobacillus rhamnosus* kod zebrića izloženim PFBS pri istim koncentracijama kao Chen i sar. (2020). U ovoj studiji, ispitivana je interakcija između PFBS i probiotika u pogledu dinamike retinoida i prenosa vizuelnih stimulusa, pri čemu je demonstrirana sposobnost probiotika da ublaži toksične efekte ove supstance [369]. Zhang i sar. (2019) ispitivali su protektivno dejstvo *Lactobacillus plantarum* ST-III protiv toksičnih efekata triklosana nakon izloženosti ovoj supstanci. Regulacijom crevne flore, probiotik je ublažio upalu crevne sluzokože i poremećaje metabolizma masti koji su nastali pri izloženosti triklosanu. Takođe, umanjio je nastanak ponašanja nalik anksioznosti usled izloženosti ovoj supstanci, poboljšao aktivnost kretanja i sposobnost učenja zebrića [372].

## 6. Zaključci

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije, utvrđena je povezanost između DEHP, DBP, BPA i njihove smeše sa različitim toksičnim efektima/oboljenjima i pokazano je protektivno dejstvo probiotika, pri čemu su izvedeni sledeći zaključci:

- Smeša DEHP, DBP i BPA dovela je značajnih promena u pogledu sniženja unosa hrane, vode i relativne mase slezine i povišenja relativne mase bubrega u odnosu na kontrolu i grupe koje su primale pojedinačne supstance.
- Većina hematoloških parametara (eritrociti, hemoglobin, hematokrit, MCHC, leukociti, limfociti, neutrofil i monociti) bila je značajno povišena u grupi tretiranoj smešom u odnosu na kontrolu. Efekti smeše na leukocite i limfocite bili su slični efektima ispitivanih ftalata, a na eritrocite, hemoglobin, hematokrit i MCHC efektima BPA.
- Smeša, ali ne i pojedinačne supstance, prouzrokovala je značajno povišenje AST, ALT, ukupnog bilirubina i ureje u odnosu na kontrolu. Efekti smeše na CRP, glukozu i holesterol bili su slični efektima ispitivanih ftalata. Pojedinačne supstance, ali ne i smeša, dovele su do sniženja nivoa serumskog gvožđa, povišenje nivoa LDL, ALP i triglicerida u odnosu na kontrolu.
- Smeša je dovela do značajnog povišenja T4 u odnosu na kontrolu, a pojedinačne supstance delovale su suprotno, snizivši nivo ovog hormona. Sniženje T3/T4 odnosa bilo je prisutno samo pri izloženosti smeši DEHP, DBP i BPA u odnosu na kontrolu i na pojedinačne supstance.
- Značajno sniženje testosterona u odnosu na kontrolu bilo je prisutno samo pri izloženosti smeši DEHP, DBP i BPA, a ne i pojedinačnim supstancama.
- Smeša je ispoljila izraženije patohistološke efekte na tkivu jetre, testisa, slezine i bubrega u odnosu na pojedinačne supstance i kontrolu, dok na tkivu mozga nisu uočene promene.
- Značajne promene u parametrima oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite bile su prisutne samo u grupi tretiranoj smešom u odnosu na kontrolu (TOS i SOD u plazmi, MDA, O<sub>2</sub><sup>·-</sup> i SH grupe u testisu, TOS u jetri, TOS, SOD, SH grupe u pankreasu, MDA i SH grupe u slezini, TOS i O<sub>2</sub><sup>·-</sup> u timusu) ili izraženije u odnosu na značajne promene u grupama tretiranim pojedinačnim supstancama (MDA u jetri i bubrezima, TAS, TOS i SOD u testisima, SOD u plućima).
- Značajne promene u nivou bioelemenata bile su prisutne samo u grupi tretiranoj smešom u odnosu na kontrolu (Fe u jetri i timusu i Zn u plućima) ili izraženije u odnosu na značajne promene u grupama tretiranim pojedinačnim supstancama (Zn u jetri i timusu).
- *In silico* analizom utvrđeno je da smeša može da izazove oštećenja jetre, poremećaje muškog reproduktivnog sistema, dijabetes melitus tipa 2, astmu i gojaznost, a najznačajniji mehanizmi toksičnosti bili su oksidativni stres i apoptoza.
- Na modelu zebrice, smeša je bila značajno toksičnija od pojedinačnih supstanci u pogledu efekata na rast i razvoj, hepatotoksičnosti, kardiotoksičnosti i letaliteta. Svi embrioni su uginuli pri izloženosti najvišim koncentracijama supstanci u smeši. Sve ispitivane pojedinačne supstance prouzrokovale su efekte na rast i razvoj, hepatotoksičnost i kardiotoksičnost, sa sledećim redosledom opadanja toksičnosti: DBP > BPA > DEHP.
- Efekat BPA usmeravao je efekat smeše, a pojedinačni ftalati i BPA ispoljili su ili slične ili suprotne hepatotoksične efekte na modelu zebrice u zavisnosti od primenjene koncentracije.

- Primena višekomponentnog probiotika umanjila je ili gotovo u potpunosti otklonila štetne efekte izazvane smešom DEHP, DBP i BPA pri subakutnoj izloženosti pacova (promene očuvanosti strukture tkiva jetre, testisa, bubrega i slezine, sniženje telesne mase, unosa hrane i vode, promene nivoa biohemijskih parametara povezanih sa funkcijom jetre i bubrega, lipidnog statusa i glukoze u serumu, hormona, parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite i bioelemenata).
- Na modelu zebrica, višekomponentni probiotik bio je efikasniji od jednokomponentnog, smanjivši hepatotoksičnost, toksičnosti po rast i razvoj i letalitet, a jednokomponentni je doveo do smanjenja samo hepatotoksičnog efekta smeše.
- Na osnovu *in vitro* ispitivanja, višekomponentni probiotik bio je efikasniji u umanjenju koncentracije supstanci DEHP, DBP i BPA u smeši u poređenju sa jednokomponentnim.

Sumarno, dobijeni rezultati u okviru ove doktorske disertacije potvrdili su da je toksičnost smeše DEHP, DBP i BPA veća u odnosu na toksičnost pojedinačnih supstanci, dok pokazano dejstvo višekomponentnog probiotika ukazuje na mogućnost budućih razmatranja njegove primene, a time i protektivnog efekta kod poremećaja do kojih može dovesti smeša DEHP, DBP i BPA.

## 7. Literatura

1. Johansson HKL, Jacobsen PR, Hass U, Svingen T, Vinggaard AM, Isling LK, et al. Perinatal exposure to mixtures of endocrine disrupting chemicals reduces female rat follicle reserves and accelerates reproductive aging. *Reprod Toxicol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;61:186–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.03.045>
2. Tsatsakis AM, Docea AO, Tsitsimpikou C. New challenges in risk assessment of chemicals when simulating real exposure scenarios; simultaneous multi-chemicals' low dose exposure. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;96:174–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.011>
3. Hernández AF, Tsatsakis AM. Human exposure to chemical mixtures: Challenges for the integration of toxicology with epidemiology data in risk assessment. *Food Chem Toxicol*. 2017;103:188–93.
4. Kortenkamp A. Low dose mixture effects of endocrine disrupters: Implications for risk assessment and epidemiology. *Int J Androl*. 2008;31:233–7.
5. Hayes AW, Li R, Hoeng J, Iskandar A, Peistch MC, Dourson ML. New approaches to risk assessment of chemical mixtures. *Toxicol Res Appl*. 2019;3:1–10.
6. Kortenkamp A. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect*. 2007;115:98–105.
7. More SJ, Hardy A, Bampidis V, Benford D, Hougaard Bennekou S, Bragard C, et al. Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA J*. 2019;17.
8. Aguilera J, Aguilera-Gomez M, Barrucci F, Cocconcelli PS, Davies H, Denslow N, et al. EFSA Scientific Colloquium 24 – 'omics in risk assessment: state of the art and next steps. *EFSA Support Publ*. 2018;15.
9. Basile AO, Yahi A, Tatonetti NP. Artificial Intelligence for Drug Toxicity and Safety. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40:624–35.
10. Drwal MN, Banerjee P, Dunkel M, Wettig MR, Preissner R. ProTox: A web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:53–8.
11. Kar S, Leszczynski J. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. *Expert Opin Drug Discov* [Internet]. Taylor & Francis; 2020;15:1473–87. Available from: <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1798926>
12. Oki NO, Edwards SW. An integrative data mining approach to identifying adverse outcome pathway signatures. *Toxicology*. 2016;350–352:49–61.
13. Yang H, Sun L, Li W, Liu G, Tang Y. In Silico Prediction of Chemical Toxicity for Drug Design Using Machine Learning Methods and Structural Alerts. *Front Chem*. 2018;6:1–12.
14. Driessen M, Kienhuis AS, Pennings JLA, Pronk TE, Van De Brandhof EJ, Roodbergen M, et al. Exploring the zebrafish embryo as an alternative model for the evaluation of liver toxicity by histopathology and expression profiling. *Arch Toxicol*. 2013;87:807–23.
15. MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;14:721–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4627>
16. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission related to the aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes. *EFSA J*. 2005;3:1–46.
17. Huang Y, Wang XL, Zhang JW, Wu KS. Impact of endocrine-disrupting chemicals on reproductive function in Zebrafish (*Danio rerio*). *Reprod Domest Anim*. 2015;50:1–6.
18. Zhang Y, Han L, He Q, Chen W, Sun C, Wang X, et al. A rapid assessment for predicting drug-induced hepatotoxicity using zebrafish. *J Pharmacol Toxicol Methods* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017;84:102–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2016.12.002>
19. He JH, Guo SY, Zhu F, Zhu JJ, Chen YX, Huang CJ, et al. A zebrafish phenotypic assay for

- assessing drug-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Toxicol Methods* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;67:25–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2012.10.003>
20. van Wijk RC, Krekels EHJ, Hankemeier T, Spaink HP, van der Graaf PH. Systems pharmacology of hepatic metabolism in zebrafish larvae. *Drug Discov Today Dis Model* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;22:27–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2017.04.003>
21. Rubinstein AL. Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006;2:231–40.
22. Shegokar R. Preclinical testing—Understanding the basics first [Internet]. *Drug Deliv Asp*. Elsevier Inc.; 2020. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-821222-6.00002-6>
23. Đukić-Čosić D, Baralić K, Jorgovanović D, Živančević K, Javorac D, Stojilković N, et al. “In silico” toxicology methods in drug safety assessment. *Arh Farm (Belgr)*. 2021;71:257–78.
24. Singh S, Li SSL. Bisphenol A and phthalates exhibit similar toxicogenomics and health effects. *Gene* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;494:85–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.035>
25. Hamid N, Junaid M, Manzoor R, Jia P, Pei D. Prioritizing phthalate esters (PAEs) using experimental in vitro / vivo toxicity assays and computational in silico approaches. *J Hazard Mater* [Internet]. Elsevier; 2020;398:122851. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122851>
26. Helma C, Gottmann E, Kramer S. Knowledge discovery and data mining in toxicology. *Stat Methods Med Res*. 2000;9:329–58.
27. Baralić K, Živančević K, Božić D, Jennen D, Buha Djordjevic A, Antonijević Miljaković E, et al. Potential genomic biomarkers of obesity and its comorbidities for phthalates and bisphenol A mixture: In silico toxicogenomic approach. *Biocell*. 2022;46:519–33.
28. Harris S, Jin Y, Loch-Carusio R, Bakulski K. Chemicals associated with spontaneous abortion in the Comparative Toxicogenomics Database (CTD). *Environ Epidemiol*. 2019;3:20.
29. Tsatsakis A, Docea AO, Calina D, Buga AM, Zlatian O, Gutnikov S, et al. Hormetic Neurobehavioral effects of low dose toxic chemical mixtures in real-life risk simulation (RLRS) in rats. *Food Chem Toxicol*. 2019;125:141–9.
30. Docea AO, Goumenou M, Calina D, Arsene AL, Dragoi CM, Gofita E, et al. Adverse and hormetic effects in rats exposed for 12 months to low dose mixture of 13 chemicals: RLRS part III. *Toxicol Lett* [Internet]. Elsevier B.V.; 2019;310:70–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.04.005>
31. Tsatsakis AM, Kouretas D, Tzatzarakis MN, Stivaktakis P, Tsarouhas K, Golokhvast KS, et al. Simulating real-life exposures to uncover possible risks to human health: A proposed consensus for a novel methodological approach. *Hum Exp Toxicol*. 2017;36:554–64.
32. Bergman Å, Heindel J, Jobling S, Kidd K, Zoeller RT. State of the science of endocrine disrupting chemicals. *World Heal Organ*. 2012.
33. WHO/UNEP. WHO | Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. WHO. World Health Organization; 2013;296.
34. Hernandez AF, Buha A, Constantin C, Wallace DR, Sarigiannis D, Neagu M, et al. Critical assessment and integration of separate lines of evidence for risk assessment of chemical mixtures. *Arch Toxicol* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2019;93:2741–57. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02547-x>
35. Djordjevic AB, Antonijevic E, Curcic M, Milovanovic V, Antonijevic B. Endocrine disrupting mechanisms of polychlorinated biphenyls. *Curr Opin Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2019;19:42–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.10.006>
36. Buha A, Antonijević B, Bulat Z, Jačević V, Milovanović V, Matović V. The impact of prolonged cadmium exposure and co-exposure with polychlorinated biphenyls on thyroid function in rats. *Toxicol Lett*. 2013;221:83–90.
37. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: The Endocrine Society’s Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev*. 2015;36:1–150.

38. Wittassek M, Koch HM, Angerer J, Brüning T. Assessing exposure to phthalates - The human biomonitoring approach. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55:7–31.
39. Cartwright CD, Owen SA, Thompson IP, Burns RG. Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;186:27–34.
40. Kim SH, Park MJ. Phthalate exposure and childhood obesity. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2014;19:69.
41. Gardner ST, Wood AT, Lester R, Onkst PE, Burnham N, Perygin DH, et al. Assessing differences in toxicity and teratogenicity of three phthalates, Diethyl phthalate, Di-n-propyl phthalate, and Di-n-butyl phthalate, using *Xenopus laevis* embryos. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues*. 2016;79:71–82.
42. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-bosagna C, Skinner MK. Plastics Derived Endocrine Disruptors ( BPA , DEHP and DBP ) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity , Reproductive Disease and Sperm Epimutations. 2013;8.
43. Singh S, Li SSL. Phthalates: Toxicogenomics and inferred human diseases. *Genomics* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;97:148–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.11.008>
44. Swan SH. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res*. 2008;108:177–84.
45. Braun JM, Sathyanarayana S, Hauser R. Phthalate exposure and children’s health. *Curr Opin Pediatr*. 2013;25:247–54.
46. Zhu Y ting, Lai J hui, Liao X duo, Liu S liang. Screening of lactic acid bacteria strains for their ability to bind phthalate monoesters in vitro and the binding characteristics. *Food Control* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;90:364–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.013>
47. Benjamin S, Masai E, Kamimura N, Takahashi K, Anderson RC, Faisal PA. Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *J Hazard Mater* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;340:360–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.036>
48. DiGangi J, Schettler T, Cobbing M, Rossi M. Aggregate Exposures To Phthalates in Humans. 2002;1–53.
49. Janesick A, Blumberg B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev*. 2011;93:34–50.
50. Cai S, Fan J, Ye J, Rao X, Li Y. Phthalates exposure is associated with non-alcoholic fatty liver disease among US adults. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. Elsevier Inc.; 2021;224:112665. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112665>
51. Rajagopal G, Bhaskaran RS, Karundevi B. Developmental exposure to DEHP alters hepatic glucose uptake and transcriptional regulation of GLUT2 in rat male offspring. *Toxicology* [Internet]. Elsevier; 2019;413:56–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.12.004>
52. Srinivasan C, Khan AI, Balaji V, Selvaraj J, Balasubramanian K. Diethyl hexyl phthalate-induced changes in insulin signaling molecules and the protective role of antioxidant vitamins in gastrocnemius muscle of adult male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;257:155–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.08.022>
53. Ding Y, Xu T, Mao G, Chen Y, Qiu X, Yang L, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced hepatotoxicity exacerbated type 2 diabetes mellitus (T2DM) in female pubertal T2DM mice. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2021;149:112003. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112003>
54. Li L, Wang F, Zhang J, Wang K, De X, Li L, et al. Typical phthalic acid esters induce apoptosis by regulating the PI3K/Akt/Bcl-2 signaling pathway in rat insulinoma cells. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. Elsevier Inc.; 2021;208:111461. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111461>
55. Kimber I, Dearman RJ. An assessment of the ability of phthalates to influence immune and allergic responses. *Toxicology* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2010;271:73–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2010.03.020>

56. Podlecka D, Gromadzińska J, Mikołajewska K, Fijałkowska B, Stelmach I, Jerzynska J. Longitudinal effect of phthalates exposure on allergic diseases in children. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2020;125:84–9.
57. Rochester JR. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reprod Toxicol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;42:132–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>
58. Björnsdotter MK, de Boer J, Ballesteros-Gómez A. Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review. *Chemosphere.* 2017;182:691–706.
59. Erler C, Novak J. Bisphenol a exposure: Human risk and health policy. *J Pediatr Nurs* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;25:400–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedn.2009.05.006>
60. Viñas P, Campillo N, Martínez-Castillo N, Hernández-Córdoba M. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397:115–25.
61. Geens T, Goeyens L, Kannan K, Neels H, Covaci A. Levels of bisphenol-A in thermal paper receipts from Belgium and estimation of human exposure. *Sci Total Environ* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;435–436:30–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.001>
62. Loganathan SN, Kannan K. Occurrence of bisphenol a in indoor dust from two locations in the Eastern United States and implications for human exposures. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2011;61:68–73.
63. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-Nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect.* 2005;113:391–5.
64. Drozd K, Wysokinski D, Krupa R, Wozniak K. Bisphenol A-glycidyl methacrylate induces a broad spectrum of DNA damage in human lymphocytes. *Arch Toxicol.* 2011;85:1453–61.
65. Hanioka N, Naito T, Narimatsu S. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2008;74:33–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.053>
66. Völkel W, Kiranoglu M, Fromme H. Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett.* 2008;179:155–62.
67. Dekant W, Völkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;228:114–34.
68. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol.* 2002;15:1281–7.
69. Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol a accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect.* 2002;110:703–7.
70. Jiang W, Zhao H, Zhang L, Wu B, Zha Z. Maintenance of mitochondrial function by astaxanthin protects against bisphenol A-induced kidney toxicity in rats. *Biomed Pharmacother* [Internet]. Elsevier; 2020;121:109629. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109629>
71. Ginsberg G, Rice DC. Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ Health Perspect.* 2009;117:1639–43.
72. Mielke H, Gundert-Remy U. Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol Lett.* 2009;190:32–40.
73. Ma Y, Liu H, Wu J, Yuan L, Wang Y, Du X, et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environ Res.* 2019;176.
74. Akash MSH, Sabir S, Rehman K. Bisphenol A-induced metabolic disorders: From exposure to mechanism of action. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. Elsevier; 2020;77:103373. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103373>
75. Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol.* 2007;24:199–224.
76. Bonefeld-Jørgensen EC, Long M, Hofmeister M V., Vinggaard AM. Endocrine-disrupting



- potential of Bisphenol A, Bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: New data and a brief review. *Environ Health Perspect.* 2007;115:69–76.
77. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol.* 2007;24:178–98.
78. Cariati F, D’Uonno N, Borrillo F, Iervolino S, Galdiero G, Tomaiuolo R. Bisphenol A: An emerging threat to male fertility. *Reprod Biol Endocrinol. Reproductive Biology and Endocrinology*; 2019;17:4–11.
79. La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB, et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. Springer US; 2019;1–13. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41574-019-0273-8>
80. Wei Y, Han C, Li S, Cui Y, Bao Y, Shi W. Maternal exposure to bisphenol A during pregnancy interferes ovaries development of F1 female mice. *Theriogenology. Environmental Science and Pollution Research*; 2020;142:138–48.
81. Elswefy SE, Abdallah FR, Atteia HH, Wahba AS. Inflammation , oxidative stress and apoptosis cascade implications in bisphenol A-induced liver fibrosis in male rats. 2016;369–79.
82. Vahdati Hassani F, Abnous K, Mehri S, Jafarian A, Birner-Gruenberger R, Yazdian Robati R, et al. Proteomics and phosphoproteomics analysis of liver in male rats exposed to bisphenol A: Mechanism of hepatotoxicity and biomarker discovery. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier; 2018;112:26–38. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.021>
83. Midoro-Horiuti T, Tiwari R, Watson CS, Goldblum RM. Maternal bisphenol a exposure promotes the development of experimental asthma in mouse pups. *Environ Health Perspect.* 2010;118:273–7.
84. Abraham A, Chakraborty P. A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev Environ Health.* 2019;1–10.
85. Gao H-T, Xu R, Cao W-X, Qian L-L, Wang M, Lu L, et al. Effects of six priority controlled phthalate esters with long-term low- dose integrated exposure on male reproductive toxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* Elsevier Ltd; 2017;101:94–104.
86. Howdeshell KL, Rider C V, Wilson VS, Gray LE. Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res.* 2008;108:168–76.
87. Rider C V., Wilson VS, Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Furr JR, Lambright CR, et al. Cumulative effects of in utero administration of mixtures of “antiandrogens” on male rat reproductive development. *Toxicol Pathol.* 2009;37:100–13.
88. Zhang WZ, Yong L, Jia XD, Li N, Fan YX. Combined subchronic toxicity of bisphenol a and dibutyl phthalate on male rats. *Biomed Environ Sci* [Internet]. The Editorial Board of Biomedical and Environmental Sciences; 2013;26:63–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3967/0895-3988.2013.01.008>
89. Christen V, Crettaz P, Oberli-Schrämml A, Fent K. Antiandrogenic activity of phthalate mixtures: Validity of concentration addition. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;259:169–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.021>
90. Borman ED, Vecchi N, Pollock T, deCatanzaro D. Diethylhexyl phthalate magnifies deposition of 14C–bisphenol A in reproductive tissues of mice. *J Appl Toxicol.* 2017;37:1225–31.
91. Domínguez-romero E, Scherlinger M. A review of phthalate pharmacokinetics in human and rat : what factors drive phthalate distribution and partitioning ? *Drug Metab Rev.* Taylor & Francis; 2019;0:1–16.
92. Iwano H, Inoue H, Nishikawa M. Biotransformation of Bisphenol A and its Adverse Effects Effects on on the the Next Next Generation Generation. *Endocr Disruptors.* 2018;63.
93. Lili Z, Hongfei Z, Shoukat S, Xiaochen Z, Bolin Z. Screening lactic acid bacteria strains with ability to bind di-n-butyl phthalate via Turbiscan technique. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* Springer International Publishing; 2017;110:759–69.
94. Zhu Y ting, Yang C xiang, Luo B Bin, Zhou K, Liu S liang. Efficiency of dairy strains of lactic

- acid bacteria to bind bisphenol A in phosphate buffer saline. *Food Control* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;73:1203–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.039>
95. Oishi K, Sato T, Yokoi W, Yoshida Y, Ito M, Sawada H. Effect of probiotics, *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei*, on bisphenol A exposure in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008;72:1409–15.
96. Wang J, Zhang H, Chen X, Chen Y, Bao Q. Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *J Dairy Sci*. Elsevier; 2012;95:1645–54.
97. Quinto EJ, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J, Girbés T. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Nutr Sci*. 2014;05:1765–75.
98. Sanders ME, Guarner F, Guerrant R, Holt PR, Quigley EMM, Sartor RB, et al. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*. 2013;62:787–96.
99. Barreto FM, Simão ANC, Morimoto HK, Lozovoy MAB, Dichi I, Miglioranza LH da S. Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Nutr* 30. 2014;30:1–4.
100. Jones ML, Tomaro-duchesneau C, Martoni CJ. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications. 2013;13:631–42.
101. Tomaro-duchesneau C, Jones ML, Shah D, Jain P, Saha S, Prakash S. Cholesterol Assimilation by *Lactobacillus* Probiotic Bacteria : An In Vitro Investigation. 2014;2014.
102. Yu L, Zhao X, Cheng M, Yang G, Wang B, Liu H. *Saccharomyces boulardii* Administration Changes Gut Microbiota and Attenuates D-Galactosamine-Induced Liver Injury. *Sci Rep*. Springer US; 2017;7:1–7.
103. Jama AM, Mitić-Ćulafić D, Kolarević S, Durašević SF, Knežević-Vukčević J. Protective effect of probiotic bacteria against cadmium-induced genotoxicity in rat hepatocytes in vivo and in vitro. *Arch Biol Sci*. 2012;64:1197–206.
104. Zhai Q, Wang G, Zhao J, Liu X, Tian F, Zhang H, et al. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* ccfm8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79:1508–15.
105. Zhai Q, Yin R, Yu L, Wang G, Tian F, Yu R, et al. Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity. *Food Control* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;54:23–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.037>
106. Halttunen T, Salminen S, Tahvonon R. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2007;114:30–5.
107. Tong Y, Hua X, Zhao W, Liu D, Zhang J, Zhang W, et al. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM436 against acute manganese toxicity in mice. *Food Biosci*. Elsevier Ltd; 2020;35:100583.
108. Zhao H, Zhou F, Qi Y, Dziugan P, Bai F, Walczak P, et al. Screening of *Lactobacillus* strains for their ability to bind Benzo(a)pyrene and the mechanism of the process. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;59:67–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.040>
109. Karazhiyan H, Mehraban Sangatash M, Karazhyan R, Mehrzad A, Haghghi E. Ability of different treatments of *Saccharomyces cerevisiae* to surface bind aflatoxin M1 in Yoghurt. *J Agric Sci Technol*. 2016;18:1489–98.
110. Kumar V, Agarwal AK. a Review on Catalytic Terpene Transformation Over Heterogeneous Catalyst. *Chem IntJCurrResChemPharmaSci* [Internet]. 2014;1:78–88. Available from: [www.ijrcrps.com](http://www.ijrcrps.com)
111. Silva FJM da, Peluzio JM, Prado G, Eugênia J, Cruz G, Silva MO, et al. Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains. *Sci World J*. 2015;
112. Haskard C, Binnion C, Ahokas J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem Biol Interact*. 2000;128:39–49.
113. Tsuda H, Hara K, Miyamoto T. Binding of Mutagens to Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* Mutant Strain 301102S. *J Dairy Sci*. Elsevier; 2008;91:2960–6.

114. Zoghi A, Khosravi-Darani K, Sohrabvandi S. Surface Binding of Toxins and Heavy Metals by Probiotics. *Mini-Reviews Med Chem.* 2014;14:84–98.
115. Mylchreest E, Wallace D, Cattley R, Foster P. Dose-Dependent Alterations in Androgen-Regulated Male Reproductive Development in Rats Exposed to Di(n-butyl) Phthalate during Late Gestation. *Toxicol Sci.* 2000;55:143–51.
116. EFSA. Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A. *EFSA J.* 2010;8.
117. Zhou L, Chen H, Xu Q, Han X, Zhao Y, Song X, et al. The effect of di-2-ethylhexyl phthalate on inflammation and lipid metabolic disorder in rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;170:391–8.
118. Ha M, Guan X, Wei L, Li P, Yang M, Liu C. Di-(2-ethylhexyl) phthalate inhibits testosterone level through disturbed hypothalamic-pituitary-testis axis and ERK-mediated 5 $\alpha$ -Reductase 2. *Sci Total Environ* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;563–564:566–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.145>
119. Chen LH, Chen YH, Cheng KC, Chien TY, Chan CH, Tsao SP, et al. Antiobesity effect of *Lactobacillus reuteri* 263 associated with energy metabolism remodeling of white adipose tissue in high-energy-diet-fed rats. *J Nutr Biochem* [Internet]. Elsevier Inc.; 2018;54:87–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.11.004>
120. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247:3170–5.
121. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. *Handb methods Oxyg Radic Res.* 1985.
122. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38:1103–11.
123. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37:277–85.
124. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82:70–7.
125. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma - Inj Infect Crit Care.* 1991. p. 32–5.
126. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen A, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1991;49:1304–13.
127. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
128. Delasoie J, Pavic A, Voutier N, Vojnovic S, Crochet A, Nikodinovic-Runic J, et al. Identification of novel potent and non-toxic anticancer, anti-angiogenic and antimetastatic rhenium complexes against colorectal carcinoma. *Eur J Med Chem.* 2020;204.
129. Zhang Y, Han L, He Q, Chen W, Sun C, Wang X, et al. A rapid assessment for predicting drug-induced hepatotoxicity using zebrafish. *J Pharmacol Toxicol Methods* [Internet]. Elsevier Inc; 2017;84:102–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2016.12.002>
130. Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger MJ, Knutsen KH, More S, et al. Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA J.* 2017;15:1–41.
131. Pink M, Verma N, Schmitz-Spanke S. Benchmark dose analyses of toxic endpoints in lung cells provide sensitivity and toxicity ranking across metal oxide nanoparticles and give insights into the mode of action. *Toxicol Lett* [Internet]. Elsevier; 2020;331:218–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.06.012>
132. Edler L, Hart A, Greaves P, Carthew P, Coulet M, Boobis A, et al. Selection of appropriate tumour data sets for Benchmark Dose Modelling (BMD) and derivation of a Margin of Exposure (MoE) for substances that are genotoxic and carcinogenic: Considerations of biological relevance of tumour type, data quality and uncertain. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;70:264–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.030>
133. EFSA. Use of BMDS and PROAST software packages by EFSA Scientific Panels and Units for applying the Benchmark Dose (BMD) approach in risk assessment. *EFSA Support Publ.* 2017;8.

134. Davis AP, Murphy CG, Rosenstein MC, Wieggers TC, Mattingly CJ. The Comparative Toxicogenomics Database facilitates identification and understanding of chemical-gene-disease associations: arsenic as a case study. *BMC Med Genomics*. 2008;1:1–12.
135. Davis AP, Grondin CJ, Johnson RJ, Sciaky D, McMorran R, Wieggers J, et al. The Comparative Toxicogenomics Database: Update 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D948–54.
136. Wieggers TC, Davis AP, Cohen KB, Hirschman L, Mattingly CJ. Text mining and manual curation of chemical-gene-disease networks for the Comparative Toxicogenomics Database (CTD). *BMC Bioinformatics*. 2009;10:326.
137. Davis AP, King BL, Mockus S, Murphy CG, Saraceni-Richards C, Rosenstein M, et al. The comparative toxicogenomics database: Update 2011. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:1067–72.
138. Harris SM, Jin Y, Loch-Carusio R, Padilla IY, Meeker JD, Bakulski KM. Identification of environmental chemicals targeting miscarriage genes and pathways using the comparative toxicogenomics database. *Environ Res [Internet]*. Elsevier Inc.; 2020;184:109259. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109259>
139. Zhu W, Chen X, Ning L, Jin K. Network Analysis Reveals TNF as a Major Hub of Reactive Inflammation Following Spinal Cord Injury. *Sci Rep*. 2019;9:1–10.
140. Luo G, Shen Y, Yang L, Lu A, Xiang Z. A review of drug - induced liver injury databases. *Arch Toxicol*. Springer Berlin Heidelberg; 2017;91.
141. Breda SGJ Van, Claessen SMH, Lo K, Herwijnen M Van, Gaj S, Kok TMCM De, et al. Epigenetic mechanisms underlying arsenic - associated lung carcinogenesis. *Arch Toxicol*. 2014;89:1959–69.
142. Shi H, Liu S, Chen J, Li X, Ma Q, Yu B. Predicting drug-target interactions using Lasso with random forest based on evolutionary information and chemical structure. *Genomics [Internet]*. Elsevier; 2019;111:1839–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.12.007>
143. Peng Y, Wu Z, Yang H, Cai Y, Liu G, Li W, et al. Insights into mechanisms and severity of drug-induced liver injury via computational systems toxicology approach. *Toxicol Lett [Internet]*. Elsevier; 2019;312:22–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.05.005>
144. Saini N, Bakshi S, Sharma S. In-silico approach for drug induced liver injury prediction: Recent advances. *Toxicol Lett [Internet]*. Elsevier; 2018;295:288–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.1216>
145. Martyniuk CJ, Mehinto AC, Denslow ND. Organochlorine pesticides: Agrochemicals with potent endocrine-disrupting properties in fish. *Mol Cell Endocrinol [Internet]*. Elsevier; 2020;507:110764. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110764>
146. Boverhof DR, Zacharewski TR. Toxicogenomics in risk assessment: Applications and needs. *Toxicol Sci*. 2006;89:352–60.
147. Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, et al. Integration of biological networks and gene expression data using cytoscape. *Nat Protoc*. 2007;2:2366–82.
148. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res [Internet]*. 2003;13:2498–504. Available from: <http://ci.nii.ac.jp/naid/110001910481/>
149. Warde-farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. 2010;38:214–20.
150. Chin CH, Chen SH, Wu HH, Ho CW, Ko MT, Lin CY. cytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol*. 2014;8:1–7.
151. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009;25:1091–3.
152. Bindea G, Galon J, Mlecnik B. CluePedia Cytoscape plugin: Pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics*. 2013;29:661–3.
153. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:305–11.

154. Piñero J, Núria Q-R, Alex BJ, Deu-Pons A, Bauer-Mehren, Martin, Baron FS, Laura F. DisGeNET : a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes. Database. 2015;1–17.
155. Ge SX, Jung D, Jung D, Yao R. ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*. 2020;36:2628–9.
156. WHO. Pesticide residues in food. WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues. 2015;1–106. Available from: [www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html)
157. Vieira Silva A, Chu I, Feeley M, Bergman Å, Håkansson H, Öberg M. Dose-dependent toxicological effects in rats following a 90-day dietary exposure to PCB-156 include retinoid disruption. *Reprod Toxicol*. 2021;
158. Meng Q, Richmond-Bryant J, Lu SE, Buckley B, Welsh WJ, Whitsel EA, et al. Cardiovascular outcomes and the physical and chemical properties of metal ions found in particulate matter air pollution: A QICAR study. *Environ Health Perspect*. 2013;121:558–64.
159. Chatr-Aryamontri A, Oughtred R, Boucher L, Rust J, Chang C, Kolas NK, et al. The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D369–79.
160. Davis AP, Grondin CJ, Lennon-Hopkins K, Saraceni-Richards C, Sciaky D, King BL, et al. The Comparative Toxicogenomics Database's 10th year anniversary: Update 2015. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D914–20.
161. Piñero J, Deu-pons J, Centeno E, Garc J, Sanz F, Furlong LI. DisGeNET : a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and. *Nucleic Acids Res*. 2016;45:gkw943.
162. Tassinari R, Tait S, Busani L, Martinellin A, Valeri M, Gastaldelli A, et al. Toxicological assessment of oral co-exposure to bisphenol a (Bpa) and bis(2-ethylhexyl) phthalate (dehp) in juvenile rats at environmentally relevant dose levels: Evaluation of the synergic, additive or antagonistic effects. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18.
163. Howdeshell K, Wilson VS, Furr J, Lambright CR, Rider C V., Blystone CR, et al. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the Sprague-Dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol Sci*. 2008;105:153–65.
164. Howdeshell K, Hotchkiss AK, Gray LE. Cumulative effects of antiandrogenic chemical mixtures and their relevance to human health risk assessment. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2017;220:179–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.11.007>
165. Suteau V, Briet C, Lebeault M, Gourdin L, Henrion D, Rodien P, et al. Human amniotic fluid-based exposure levels of phthalates and bisphenol A mixture reduce INSL3/RXFP2 signaling. *Environ Int* [Internet]. Elsevier; 2020;138:105585. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105585>
166. Kortenkamp A, Koch HM. Refined reference doses and new procedures for phthalate mixture risk assessment focused on male developmental toxicity. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. Elsevier; 2020;224:113428. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.113428>
167. Erkekoglu P, Giray BK, Kizilgün M, Hinerger-Favier I, Rachidi W, Roussel AM, et al. Thyroidal effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats of different selenium status. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2012;31:143–53.
168. Hai-Tao G, Qian-Nan D, Liang-Liang Q, Lu L, Rui-Xian L, Wei-Xin C, et al. Zinc supplement ameliorates phthalates-induced reproductive toxicity in male rats. *Chemosphere*. Elsevier Ltd; 2020;125828.
169. Wu Y, Li J, Yan B, Zhu Y, Liu X, Chen M, et al. Oral exposure to dibutyl phthalate exacerbates chronic lymphocytic thyroiditis through oxidative stress in female Wistar rats. *Sci Rep* [Internet]. Springer US; 2017;7:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15533-z>
170. Cogni G, Chiovato L. An overview of the pathogenesis of thyroid autoimmunity. *Hormones*. 2013;12:19–29.
171. Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: Neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev*. 2012;248:188–204.

172. Lin CJ, Lai CK, Kao MC, Wu LT, Lo UG, Lin LC, et al. Impact of cholesterol on disease progression. *Biomed*. 2015;5:1–7.
173. Majeed KA, ur Rehman H, Yousaf MS, Zaneb H, Rabbani I, Tahir SK, et al. Sub-chronic exposure to low concentration of dibutyl phthalate affects anthropometric parameters and markers of obesity in rats. *Environ Sci Pollut Res. Environmental Science and Pollution Research*; 2017;24:25462–7.
174. Abdel-Wahab WM, Abdel-Wahab WM. Thymoquinone attenuates toxicity and oxidative stress induced by bisphenol a in liver of male rats. *Pakistan J Biol Sci*. 2014. p. 1152–60.
175. Venturelli AC, Fischer SV, Nogueira de Morais R, Grassioli S, Martino Andrade AJ. Effects of exposure to Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) during lactation and puberty on sexual maturation and glycemic homeostasis in males rats. *Clin Nutr ESPEN [Internet]*. Elsevier; 2015;10:e5–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnme.2014.10.002>
176. Praveena SM, Teh SW, Rajendran RK, Kannan N, Lin CC, Abdullah R, et al. Recent updates on phthalate exposure and human health: a special focus on liver toxicity and stem cell regeneration. *Environ Sci Pollut Res. Environmental Science and Pollution Research*; 2018;25:11333–42.
177. Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51:899–911.
178. Uzunhisarcikli M, Aslanturk A. Hepatoprotective effects of curcumin and taurine against bisphenol A-induced liver injury in rats. *Environ Sci Pollut Res. Environmental Science and Pollution Research*; 2019;26:37242–53.
179. Genuis SJ, Beeson S, Birkholz D, Lobo RA. Human excretion of bisphenol A: Blood, urine, and sweat (BUS) study. *J Environ Public Health*. 2012;2012.
180. Bratovcic A. Antioxidant Enzymes and their Role in Preventing Cell Damage. *Acta Sci Nutr Heal*. 2020;4:01–7.
181. Bonomini F, Rodella LF, Moghadasian M, Lonati C, Rezzani R. Apolipoprotein e deficiency and a mouse model of accelerated liver aging. *Biogerontology*. 2013;14:209–20.
182. Trougakos IP, Gonos ES. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free Radic Res*. 2006;40:1324–34.
183. Naim A, Pan Q, Baig MS. Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Liver Diseases. *J Clin Exp Hepatol [Internet]*. INASL; 2017;7:367–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jceh.2017.09.004>
184. Jin X, Zimmers TA, Perez EA, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology*. 2006;43:474–84.
185. Erkekoglu P, Zeybek ND, Giray BK, Rachidi W, Kizilgün M, Hininger-Favier I, et al. The effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on rat liver in relation to selenium status. *Int J Exp Pathol*. 2014;95:64–77.
186. Hasmall SC, James NH, Macdonald N, Soames AR, Roberts RA. Species differences in response to diethylhexylphthalate: Suppression of apoptosis, induction of DNA synthesis and peroxisome proliferator activated receptor alpha-mediated gene expression. *Arch Toxicol*. 2000;74:85–91.
187. James NH, Soames AR, Roberts RA. Suppression of hepatocyte apoptosis and induction of DNA synthesis by the rat and mouse hepatocarcinogen diethylhexylphthalate (DEHP) and the mouse hepatocarcinogen 1,4-dichlorobenzene (DCB). *Arch Toxicol*. 1998;72:784–90.
188. Roberts RA, James NH, Hasmall SC, Holden PR, Lambe K, Macdonald N, et al. Apoptosis and proliferation in nongenotoxic carcinogenesis: species differences and role of PPAR $\alpha$ . *Toxicol Lett*. 2000;112–113:49–57.
189. Chen H, Zhang W, Rui B bei, Yang S min, Xu W ping, Wei W. Di(2-ethylhexyl) phthalate exacerbates non-alcoholic fatty liver in rats and its potential mechanisms. *Environ Toxicol Pharmacol [Internet]*. Elsevier B.V.; 2016;42:38–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.12.016>

190. Ye H, Ha M, Yang M, Yue P, Xie Z, Liu C. Di-2-ethylhexyl phthalate disrupts thyroid hormone homeostasis through activating the Ras / Akt / TRHr pathway and inducing hepatic enzymes. *Nat Publ Gr. Nature Publishing Group*; 2017;1–12.
191. Cheng L, Li J, Cheng J, Wu Z. Dibutyl phthalate-induced activation of ROS and ERK1/2 causes hepatic and renal damage in Kunming mice. *Hum Exp Toxicol*. 2019;38:938–50.
192. Zhang W, Li J ya, Wei X chen, Wang Q, Yang J yang, Hou H, et al. Effects of dibutyl phthalate on lipid metabolism in liver and hepatocytes based on PPAR $\alpha$ /SREBP-1c/FAS/GPAT/AMPK signal pathway. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2021;149:112029. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112029>
193. Zhao Y, Bao RK, Zhu SY, Talukder M, Cui JG, Zhang H, et al. Lycopene prevents DEHP-induced hepatic oxidative stress damage by crosstalk between AHR–Nrf2 pathway. *Environ Pollut* [Internet]. Elsevier Ltd; 2021;285:117080. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117080>
194. Ha M, Wei L, Guan X, Li L, Liu C. P53-dependent apoptosis contributes to di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced hepatotoxicity. *Environ Pollut* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;208:416–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.009>
195. Hassan ZK, Elobeid MA, Virk P, Omer SA, Elamin M, Daghestani MH, et al. Bisphenol a induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012.
196. Aydemir D, Karabulut G, Gülsu Ş, Gok M, Barlas N, Ulusu NN. 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*. 2018;186:474–88.
197. Erkekoglu P, Arnaud J, Rachidi W, Kocer-Gumusel B, Favier A, Hincal F. The effects of di(2-ethylhexyl) phthalate and/or selenium on trace element levels in different organs of rats. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2015;29:296–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.08.002>
198. Tanoren B, Parlattan U, Parlak M, Selcuk B, Ates Alkan F, Pastaci Ozsobaci N, et al. Determination of modifications in rat liver due to phthalate uptake by SAM, RS, and ICP-OES. *Anal Methods*. 2021;13:2926–35.
199. Nair N. Dose-dependent short-term study of di-n-butyl phthalate on the testicular antioxidant system of Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2015;22:2196–204.
200. Ahangar N, Naderi M, Noroozi A, Ghasemi M, Zamani E, Shaki F. Zinc Deficiency and Oxidative Stress Involved in Valproic Acid Induced Hepatotoxicity: Protection by Zinc and Selenium Supplementation. *Biol Trace Elem Res. Biological Trace Element Research*; 2017;179:102–9.
201. Rousseau I, Galleano M, Puntarulo S. Fe allocation in liver during early stages of endotoxemia in Fe-overload rats. *Toxicol Pathol*. 2011;39:1075–83.
202. Jiao Y, Tao Y, Yang Y, Diogene T, Yu H, He Z, et al. Monobutyl phthalate (MBP) can dysregulate the antioxidant system and induce apoptosis of zebrafish liver. *Environ Pollut* [Internet]. Elsevier Ltd; 2020;257:113517. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113517>
203. Sant KE, Moreau HM, Williams LM, Jacobs HM, Bowsher AM, Boisvert JD, et al. Embryonic exposures to mono-2-ethylhexyl phthalate induce larval steatosis in zebrafish independent of Nrf2a signaling. *J Dev Orig Health Dis*. 2021;12:132–40.
204. Huff M, Da Silveira WA, Carnevali O, Renaud L, Hardiman G. Systems Analysis of the Liver Transcriptome in Adult Male Zebrafish Exposed to the Plasticizer (2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP). *Sci Rep* [Internet]. Springer US; 2018;8:1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20266-8>
205. Martella A, Silvestri C, Maradonna F, Gioacchini G, Allara M, Radaelli G, et al. Bisphenol a induces fatty liver by an endocannabinoid-mediated positive feedback loop. *Endocrinology*. 2016;157:1751–63.
206. Erkekoglu P, Giray BK, Kizilgün M, Rachidi W, Hininger-Favier I, Roussel AM, et al. Di(2-ethylhexyl)phthalate-induced renal oxidative stress in rats and protective effect of selenium. *Toxicol*

Mech Methods. 2012;22:415–23.

207. Gu Y, Gao M, Zhang W, Yan L, Shao F, Zhou J. Exposure to phthalates DEHP and DINP May lead to oxidative damage and lipidomic disruptions in mouse kidney. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2021;271:129740. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129740>
208. Mourad IM, Khadrawy YA. 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.* 2012;2:19.
209. Da Silva MM, Gonçalves CFL, Miranda-Alves L, Fortunato RS, Carvalho DP, Ferreira ACF. Inhibition of Type 1 Iodothyronine Deiodinase by Bisphenol A. *Horm Metab Res.* 2019;51:671–7.
210. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med.* 2013;4:624–30.
211. Sun D, Zhou L, Wang S, Liu T, Zhu J, Jia Y, et al. Effect of Di-(2-ethylhexyl) phthalate on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in adolescent rat. *Endocr J.* 2018;65:261–8.
212. Liu C, Zhao L, Wei L, Li L. DEHP reduces thyroid hormones via interacting with hormone synthesis-related proteins, deiodinases, transthyretin, receptors, and hepatic enzymes in rats. *Environ Sci Pollut Res.* 2015;22:12711–9.
213. Gassman NR. Induction of oxidative stress by bisphenol A and its pleiotropic effects. *Environ Mol Mutagen.* 2017;58:60–71.
214. Munn S, Goumenou M. Key scientific issues relevant to the identification and characterisation of endocrine disrupting substances—Report of the Endocrine Disrupters Expert Advisory Group. *Toxicol Lett.* 2013.
215. Margina D, Nițulescu G, Ungurianu A, Mesnage R, Goumenou M, Sarigiannis D, et al. Overview of the effects of chemical mixtures with endocrine disrupting activity in the context of real-life risk simulation (RLRS): An integrative approach (Review). *World Acad Sci J.* 2019;157–64.
216. Renieri EA, Sfakianakis DG, Alegakis AA, Safenkova I V., Buha A, Matović V, et al. Nonlinear responses to waterborne cadmium exposure in zebrafish. An in vivo study. *Environ Res.* 2017;157:173–81.
217. Vandenberg LN. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: Bisphenol a as a case study. *Dose-Response.* 2014;12:259–76.
218. Warner GR, Flaws JA. Bisphenol A and phthalates: How environmental chemicals are reshaping toxicology. *Toxicol Sci.* 2018;166:246–9.
219. Furr JR, Lambright CS, Wilson VS, Foster PM, Gray LE. 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.* 2014;140:403–24.
220. Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, et al. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol Lett* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2010;194:16–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.02.002>
221. Jin P, Wang X, Chang F, Bai Y, Li Y, Zhou R, et al. Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *J Biomed Res.* 2013;27:135–44.
222. Howdeshell KL, Rider C V., Wilson VS, Furr JR, Lambright CR, Gray LE. 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.* 2015;148:488–502.
223. Ogli SA, Odeh SO EG. Gonadotoxic Potentials of Di- (2-Ethyl Hexyl) Phthalate in the Adult Male Wistar Rats. *J Res BASIC Clin Sci.* 2019;2:163–71.
224. Scarano WR, Bedrat A, Alonso-Costa LG, Aquino AM, Fantinatti BEA, Justulin LA, et al. Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture During Prostate Development Induces MicroRNA Upregulation and Transcriptome Modulation in Rats. *Toxicol Sci.* 2019;171:84–97.
225. Martino-Andrade AJ, Chahoud I. Reproductive toxicity of phthalate esters. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54:148–57.
226. Christiansen S, Boberg J, Axelstad M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Metzdorff SB, et al. Low-



- dose perinatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. *Reprod Toxicol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;30:313–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.04.005>
227. Silano V, Barat Baviera JM, Bolognesi C, Chesson A, Cocconcelli PS, Crebelli R, et al. Update of the risk assessment of di-butylphthalate (DBP), butyl-benzyl-phthalate (BBP), bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di-isononylphthalate (DINP) and di-isodecylphthalate (DIDP) for use in food contact materials. *EFSA J.* 2019;17.
228. Abdel-Maksoud FM, Ali FAZ, Akingbemi BT. Prenatal exposures to bisphenol A and di (2-ethylhexyl) phthalate disrupted seminiferous tubular development in growing male rats. *Reprod Toxicol* [Internet]. Elsevier; 2019;88:85–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.017>
229. Oudir M, Chader H, Bouzid B, Bendisari K, Latreche B, Boudalia S, et al. 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* [Internet]. Elsevier Inc.; 2018;75:33–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.11.004>
230. Alam M, Hoque M. Prophylactic effects of vitamin E and selenium on di(n-butyl) phthalate-induced testicular damage in prepubertal rats. *J Adv Biotechnol Exp Ther.* 2018;1:65.
231. Kuhl AJ, Ross SM, Gaido KW. CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$ , but not steroidogenic factor-1, modulates the phthalate-induced dysregulation of rat fetal testicular steroidogenesis. *Endocrinology.* 2007;148:5851–64.
232. Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 2000;14:2587–95.
233. Ferraz-de-Souza B, Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2011;336:198–205. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.11.006>
234. Barć J, Gregoraszczyk EŁ. Effects of individual polychlorinated naphthalene (PCN) components of Halowax 1051 and two defined, artificial PCN mixtures on AHR and CYP1A1 protein expression, steroid secretion and expression of enzymes involved in steroidogenesis (CYP17, 17 $\beta$ -HSD and C. *Toxicology.* 2014;322:14–22.
235. Hirsch A, Hahn D, Kempná P, Hofer G, Nuoffer JM, Mullis PE, et al. Metformin inhibits human androgen production by regulating steroidogenic enzymes HSD3B2 and CYP17A1 and complex I activity of the respiratory chain. *Endocrinology.* 2012;153:4354–66.
236. Gonçalves GD, Semperebon SC, Biazzi BI, Mantovani MS, Fernandes GSA. Bisphenol A reduces testosterone production in TM3 Leydig cells independently of its effects on cell death and mitochondrial membrane potential. *Reprod Toxicol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2018;76:26–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.12.002>
237. Huang PC, Li WF, Liao PC, Sun CW, Tsai EM, Wang SL. Risk for estrogen-dependent diseases in relation to phthalate exposure and polymorphisms of CYP17A1 and estrogen receptor genes. *Environ Sci Pollut Res.* 2014;21:13964–73.
238. Lindholm C, Pedersen KL, Pedersen SN. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol.* 2000;48:87–94.
239. Uchtmann KS, Taylor JA, Timms BG, Stahlhut RW, Ricke EA, Ellersieck MR, et al. 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* [Internet]. Elsevier; 2020;91:131–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.11.007>
240. Takeuchi S, Iida M, Kobayashi S, Jin K, Matsuda T, Kojima H. Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and androgen receptor. *Toxicology.* 2005;210:223–33.
241. Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci.* 2003;75:40–6.
242. Wajda A, Łapczuk J, Grabowska M, Pius-Sadowska E, Słojewski M, Laszczynska M, et al.

Cell and region specificity of Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) system in the testis and the epididymis. *Reprod Toxicol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017;69:286–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.03.009>

243. Zhao Y, Lin J, Talukder M, Zhu SY, Li MZ, Wang HR, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor as a Target for Lycopene Preventing DEHP-Induced Spermatogenic Disorders. *J Agric Food Chem*. 2020;68:4355–66.

244. Akishina AA, Vorontsova JE, Cherezov RO, Slezinger MS, Simonova OB, Kuzin BA. NAP family CG5017 chaperone pleiotropically regulates human AHR target genes expression in *Drosophila* testis. *Int J Mol Sci*. 2019;20:118.

245. Đukić-Čosić D, Baralić K, Javorac D, Djordjevic AB, Bulat Z. An overview of molecular mechanisms in cadmium toxicity. *Curr Opin Toxicol*. 2020;19:56–62.

246. Sun Y, Shen J, Zeng L, Yang D, Shao S, Wang J, et al. Role of autophagy in di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)-induced apoptosis in mouse Leydig cells. *Environ Pollut* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;243:563–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.089>

247. Wang SW, Wang SSW, Wu DC, Lin YC, Ku CC, Wu CC, et al. Androgen receptor-mediated apoptosis in bovine testicular induced pluripotent stem cells in response to phthalate esters. *Cell Death Dis*. 2013;4:1–11.

248. Zhou C, Flaws JA. Effects of an environmentally relevant phthalate mixture on cultured mouse antral follicles. *Toxicol Sci*. 2017;156:217–29.

249. Feldman DR, Iyer G, Van Alstine L, Patil S, Al-Ahmadie H, Reuter VE, et al. Presence of somatic mutations within PIK3CA, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in cisplatin-resistant germ cell tumors. *Clin Cancer Res*. 2014;20:3712–20.

250. Yao P-L, Lin Y-C, Richburg JH. Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate-Induced Disruption of Junctional Complexes in the Seminiferous Epithelium of the Rodent Testis Is Mediated by MMP21. *Biol Reprod*. 2010;82:516–27.

251. Alahmar AT. Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *J Hum Reprod Sci*. 2019;12:4.

252. Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M, Konaka R, Hiramoto K, Sasaki J, et al. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem J*. 2002;365:849–56.

253. García Rodríguez A, de la Casa M, Johnston S, Gosálvez J, Roy R. Association of polymorphisms in genes coding for antioxidant enzymes and human male infertility. *Ann Hum Genet*. 2019;83:63–72.

254. Kaur S, Saluja M, Bansal MP. Bisphenol A induced oxidative stress and apoptosis in mice testes: Modulation by selenium. *Andrologia*. 2018;50:1–8.

255. Zhou D, Wang H, Zhang J. Di-n-butyl phthalate (DBP) exposure induces oxidative stress in epididymis of adult rats. *Toxicol Ind Health*. 2011;27:65–71.

256. Aly HAA, Hassan MH, El-Beshbishy HA, Alahdal AM, Osman AMM. Dibutyl phthalate induces oxidative stress and impairs spermatogenesis in adult rats. *Toxicol Ind Health*. 2016;32:1467–77.

257. Stahlhut RW, van Wijngaarden E, Dye TD, Cook S, Swan SH. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect*. 2007;115:876–82.

258. Kim JH, Park HY, Bae S, Lim YH, Hong YC. Diethylhexyl phthalates is associated with insulin resistance via oxidative stress in the elderly: a panel study. *PLoS One*. 2013;8:1–8.

259. Sun Q, Cornelis MC, Townsend MK, Tobias DK, Heather Eliassen A, Franke AA, et al. Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes: A prospective investigation in the nurses' health study (NHS) and NHSII cohorts. *Environ Health Perspect*. 2014;122:616–23.

260. Beydoun HA, Khanal S, Zonderman AB, Beydoun MA. Sex differences in the association of urinary bisphenol-A concentration with selected indices of glucose homeostasis among U.S. adults. *Ann Epidemiol* [Internet]. Elsevier Inc; 2014;24:90–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2013.07.014>

261. Rajesh P, Sathish S, Srinivasan C, Selvaraj J, Balasubramanian K. Diethyl Hexyl Phthalate (DEHP) is associated with insulin resistance in adipose tissue of male rat: Protective role of antioxidant vitamins (C & E). *J Cell Biochem.* 2013;114:558–69.
262. Deng T, Zhang Y, Wu Y, Ma P, Duan J, Qin W, et al. Dibutyl phthalate exposure aggravates type 2 diabetes by disrupting the insulin-mediated PI3K/AKT signaling pathway. *Toxicol Lett* [Internet]. Elsevier; 2018;290:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.03.004>
263. Moghaddam HS, Samarghandian S, Farkhondeh T. Effect of bisphenol A on blood glucose, lipid profile and oxidative stress indices in adult male mice. *Toxicol Mech Methods.* 2015;25:507–13.
264. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414:799–806.
265. Chin Lee S, Pervaiz S. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus. Elsevier Ltd; 2007;39:497–504. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.09.007>
266. Tatsuo T. Immunocytochemical localisation of caspase-3 in pancreatic islets from type 2 diabetic subjects. *Pathology.* 2010;42:432–7.
267. Liadis N, Salmena L, Kwan E, Tajmir P, Schroer SA, Radziszewska A, et al. Distinct In Vivo Roles of Caspase-8 in  $\beta$ -Cells in Physiological and Diabetes Models. *Diabetes.* 2007;56.
268. Sun X, Lin Y, Huang Q, Shi J, Qiu L, Kang M, et al. 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.* 2015;19:581–94.
269. Lin Y, Sun X, Qiu L, Wei J, Huang Q, Fang C, et al. 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.* 2013;4:1–10.
270. Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2019;11:45–63.
271. Rehman K, Akash MSH. Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? *J Cell Biochem.* 2017;118:3577–85.
272. Saeedi Borujeni MJ, Esfandiary E, Baradaran A, Valiani A, Ghanadian M, Codoñer-Franch P, et al. Molecular aspects of pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction: Oxidative stress, microRNA, and long noncoding RNA. *J Cell Physiol.* 2019;234:8411–25.
273. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharm J* [Internet]. King Saud University; 2016;24:547–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>
274. Vignola AM, Chiappara G, Gagliardo R, Gjomarkaj M, Merendino A, Siena L, et al. Apoptosis and airway inflammation in asthma. *Apoptosis.* 2000;5:473–85.
275. Trautmann A, Krüger K, Akdis M, Müller-Wening D, Akkaya A, Bröcker EB, et al. Apoptosis and loss of adhesion of bronchial epithelial cells in asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;138:142–50.
276. Munitz A, Brandt EB, Mingler M, Finkelman FD, Rothenberg ME. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor  $\alpha$ 1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:7240–5.
277. Ramakrishnan RK, Al Heialy S, Hamid Q. Role of IL-17 in asthma pathogenesis and its implications for the clinic. *Expert Rev Respir Med* [Internet]. Taylor & Francis; 2019;13:1057–68. Available from: <https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1666002>
278. Lyon H, Lange C, Lake S, Silverman EK, Randolph AG, Kwiatkowski D, et al. IL10 Gene Polymorphisms Are Associated with Asthma Phenotypes in Children. *Genet Epidemiol.* 2004;26:155–65.
279. You H, Chen S, Mao L, Li B, Yuan Y, Li R, et al. The adjuvant effect induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is mediated through oxidative stress in a mouse model of asthma. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;71:272–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.012>
280. Zhou S, Han M, Ren Y, Yang X, Duan L, Zeng Y, et al. Dibutyl phthalate aggravated asthma-

like symptoms through oxidative stress and increasing calcitonin gene-related peptide release. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. Elsevier Inc.; 2020;199:110740. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110740>

281. Wang X, Han B, Wu P, Li S, Lv Y, Lu J, et al. Dibutyl phthalate induces allergic airway inflammation in rats via inhibition of the Nrf2/TSLP/JAK1 pathway. *Environ Pollut* [Internet]. Elsevier Ltd; 2020;267:115564. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115564>

282. Acaroz U, Ince S, Arslan-Acaroz D, Gurler Z, Demirel HH, Kucukkurt I, et al. 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)*. Royal Society of Chemistry; 2019;8:262–9.

283. Franken C, Lambrechts N, Govarts E, Koppen G, Den Hond E, Ooms D, et al. Phthalate-induced oxidative stress and association with asthma-related airway inflammation in adolescents. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2017;220:468–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.01.006>

284. Wang JJ, Karmaus WJJ. Oxidative stress-related genetic variants may modify associations of phthalate exposures with asthma. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14:1–14.

285. Kimber I. Bisphenol A and immunotoxic potential: A commentary. *Regul Toxicol Pharmacol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;90:358–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.08.022>

286. Bornehag CG, Nanberg E. Phthalate exposure and asthma in children. *Int J Androl*. 2010;33:333–45.

287. Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005. p. 161–6.

288. Honscheid A, Rink L, Haase H. T-Lymphocytes: A Target for Stimulatory and Inhibitory Effects of Zinc Ions. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets*. 2009;9:132–44.

289. Truong-Tran AQ, Ruffin RE, Foster PS, Koskinen AM, Coyle P, Philcox JC, et al. Altered zinc homeostasis and caspase-3 activity in murine allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27:286–96.

290. Hao C, Cheng X, Xia H, Ma X. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Biosci Rep*. 2012;32:619–29.

291. Somm E, Toulotte A, Cederroth CR, Nef S. Perinatal Exposure to Bisphenol A Alters Early Adipogenesis in the Rat. 2009;117:1549–55.

292. Harley KG, Berger K, Rauch S, Kogut K, Claus Henn B, Calafat AM, et al. Association of prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and childhood BMI and obesity. *Pediatr Res* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017;82:405–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2017.112>

293. Meeker JD, Ferguson KK. Relationship between urinary phthalate and bisphenol a concentrations and serum thyroid measures in u.s. adults and adolescents from the national health and nutrition examination survey (NHANES) 2007-2008. *Environ Health Perspect*. 2011;119:1396–402.

294. Carwile JL, Michels KB. Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003-2006. *Environ Res* [Internet]. Elsevier; 2011;111:825–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2011.05.014>

295. Singh S, Li SSL. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates. *Epigenetics Pathol Explor Connect between Genet Mech Dis Expr*. 2013;267–78.

296. Dong X, Qiu X, Meng S, Xu H, Wu X, Yang M. Proteomic profile and toxicity pathway analysis in zebra fish embryos exposed to bisphenol A and di-n-butyl phthalate at environmentally relevant levels. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;193:313–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.042>

297. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* [Internet]. 2004;25:4–7. Available from: <http://treimm.trends.com>

298. Kern L, Mittenbühler MJ, Vesting AJ, Ostermann AL, Wunderlich CM, Wunderlich FT. Obesity-induced TNF $\alpha$  and IL-6 signaling: The missing link between obesity and inflammation-driven liver and colorectal cancers. *Cancers (Basel)*. 2019;11:1–21.
299. Wang B, Trayhurn P. Acute and prolonged effects of TNF- $\alpha$  on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2006;452:418–27.
300. Čolak E, Pap D. The role of oxidative stress in the development of obesity and obesity-related metabolic disorders. *J Med Biochem*. 2021;40:1–9.
301. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114:1752–61.
302. Newell-Fugate AE. The role of sex steroids in white adipose tissue adipocyte function. *Reproduction*. 2017;153:R133–49.
303. Kunej T, Skok DJ, Zorc M, Ogrinc A, Michal JJ, Kovac M, et al. Obesity Gene Atlas in Mammals. *J Genomics*. 2013;1:45–55.
304. Plutzky J. The PPAR-RXR transcriptional complex in the vasculature: Energy in the balance. *Circ Res*. 2011;108:1002–16.
305. Feige JN, Gerber A, Casals-Casas C, Yang Q, Winkler C, Bedu E, et al. The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPAR $\alpha$ -dependent mechanisms. *Environ Health Perspect*. 2010;118:234–41.
306. Hurst CH, Waxman DJ. Activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci*. 2003;74:297–308.
307. Hertz R, Bar-Tana J. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activation and its consequences in humans. *Toxicol Lett*. 1998;102:85–90.
308. Fan Q, Li H, Qin Y, Li L, Chen L, Zhang L, et al. Association of SERPINE1 rs6092 with type 2 diabetes and related metabolic traits in a Chinese population. *Gene*. 2018;661:176–81.
309. Kaur P, Reis MD, Couchman GR, Forjuoh SN, Greene Jr JF, Ase A. SERPINE 1 Links Obesity and Diabetes: A Pilot Study. *J Proteomics Bioinform*. 2010;3:191–199.
310. Zhang Y, Zhang W, Fu X, Zhou F, Yu H, Na X. Transcriptomics and metabolomics analyses of maternal DEHP exposure on male offspring. *Environ Sci Pollut Res. Environmental Science and Pollution Research*; 2018;25:26322–9.
311. Rakotoarivelo V, Variya B, Langlois M, Ramanathan S. Cytokine Chemokines in human obesity. *Cytokine* [Internet]. Elsevier; 2020;127:154953. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154953>
312. Sindhu S, Thomas R, Shihab P, Sriraman D, Behbehani K, Ahmad R. Obesity is a positive modulator of IL-6R and IL-6 expression in the subcutaneous adipose tissue: Significance for metabolic inflammation. *PLoS One*. 2015;10:1–17.
313. Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD. Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;304:49–54.
314. Jepsen KF, Abildtrup A, Larsen ST. Monophthalates promote IL-6 and IL-8 production in the human epithelial cell line A549. *Toxicol Vitr*. 2004;18:265–9.
315. Davis AP, Grondin CJ, Johnson RJ, Sciaky D, Wiegiers J, Wiegiers TC, et al. Comparative Toxicogenomics Database (CTD): Update 2021. *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*; 2021;49:D1138–43.
316. Davis AP, Murphy CG, Saraceni-Richards CA, Rosenstein MC, Wiegiers TC, Mattingly CJ. Comparative Toxicogenomics Database: A knowledgebase and discovery tool for chemical-gene-disease networks. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:786–92.
317. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: A qualitative method of assessment -No section-. *Environ Heal A Glob Access Sci Source*. 2015;14:1–15.
318. Kwan WS, Roy VAL, Yu KN. Review on toxic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on zebrafish embryos. *Toxics*. 2021;9.

319. Boran H, Terzi S. Bis (2-ethylhexyl) phthalate induces DNA strand breaks and gene expression alterations in larval zebrafish *Danio rerio*. *Toxicol Ind Health*. 2019;35:520–9.
320. Hamid N, Junaid M, Manzoor R, Jia PP, Pei DS. Prioritizing phthalate esters (PAEs) using experimental in vitro/vivo toxicity assays and computational in silico approaches. *J Hazard Mater* [Internet]. Elsevier; 2020;398:122851. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122851>
321. Sun G, Li Y. Exposure to DBP induces the toxicity in early development and adverse effects on cardiac development in zebra fish (*Danio rerio*). *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2019;218:76–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.095>
322. Mu X, Chen X, Liu J, Yuan L, Wang D, Qian L, et al. A multi-omics approach reveals molecular mechanisms by which phthalates induce cardiac defects in zebra fish (*Danio rerio*)\*. *Environ Pollut* [Internet]. Elsevier Ltd; 2020;265:113876. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113876>
323. Pu S, Hamid N, Ren Y, Pei D. Chemosphere Effects of phthalate acid esters on zebra fish larvae: Development and skeletal morphogenesis. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2020;246:125808. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125808>
324. Yang Y, Pei J. Isolation and characterization of an *Enterococcus* strain from Chinese sauerkraut with potential for lead removal. *Eur Food Res Technol* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2020;246:2055–64. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03555-3>
325. Kyrila G, Katsoulas A, Schoretsaniti V, Rigopoulos A, Rizou E, Doulgeridou S, et al. Bisphenol A removal and degradation pathways in microorganisms with probiotic properties. *J Hazard Mater* [Internet]. Elsevier B.V.; 2021;413:125363. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125363>
326. Ju J, Shen L, Xie Y, Guo Y, Chenga Y, He Q, et al. Degradation potential of bisphenol A by *Lactobacillus reuteri*. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. Elsevier; 2019;106:7–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.022>
327. Kasmani FB, Mehri M. Effects of a multi-strain probiotics against aflatoxicosis in growing Japanese quails. *Livest Sci*. Elsevier; 2015;177:1–7.
328. Hamad GM, Taha TH, Hafez EE, Ali SH, El Sohaimy SA. Supplementation of Cerelac baby food with yeast–probiotic cocktail strains induces high potential for aflatoxin detoxification both in vitro and in vivo in mother and baby albino rats. *J Sci Food Agric*. 2018;98:707–18.
329. Zhao L, Li X, Yang Q, Zhuang D, Pan X, Li L. Adsorption kinetics and mechanism of di-n-butyl phthalate by *Leuconostoc mesenteroides*. *Food Sci Nutr*. 2020;8:6153–63.
330. Zhu Y ting, Lai J hui, Liao X duo, Ge-rong Z ren, Liu S liang. Binding ability of phthalate monoesters by *Saccharomyces cerevisiae* strains in vitro. *Food Control* [Internet]. Elsevier; 2019;102:11–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.040>
331. Endo Y, Kimura N, Ikeda I, Fujimoto K, Kimoto H. Adsorption of bisphenol A by lactic acid bacteria, *Lactococcus*, strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;74:202–7.
332. Taghizadeh Moghaddam S, Javadi A, Matin AA. Reduction of bisphenol A by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in yoghurt. *Int J Dairy Technol*. 2020;73:737–42.
333. Halttunen T, Collado MC, El-Nezami H, Meriluoto J, Salminen S. Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46:160–5.
334. Apás AL, González SN, Arena ME. Potential of goat probiotic to bind mutagens. *Anaerobe* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;28:8–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.04.004>
335. Feng T, Wang J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes* [Internet]. Taylor & Francis; 2020;12. Available from: <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1801944>
336. Ercan F, Deniz M, Gu D. *Saccharomyces boulardii* ameliorates clarithromycin- and methotrexate- induced intestinal and hepatic injury in rats *British Journal of Nutrition*. 2013;493–9.
337. Oumeddour A, Zaroure D, Haroun R, Zaimeche R, Riane K. Protective Effects of Propolis and

- Probiotic *Lactobacillus acidophilus* against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. 2019;25:190–7.
338. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Effect of dahi containing *Lactococcus lactis* on the progression of diabetes induced by a high-fructose diet in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70:1255–8.
339. Yadav H, Sc M, Jain S, Sc M, Sinha PR, Sc M, et al. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. 2007;23:62–8.
340. Oh NS, Joung JY, Lee JY, Kim Y. Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. *PLoS One*. 2018;13:1–15.
341. Sougioultzis S, Simeonidis S, Bhaskar KR, Chen X, Anton PM, Keates S, et al. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- $\kappa$ B-mediated IL-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343:69–76.
342. Rihani L, Loukil B, Khelili K. Effect of Dibutyl Phthalate on Sperm Quality and Liver Injury in Adult Male Rabbits. *Am J Toxicol Sci*. 2015;7:34–8.
343. Walseth F, Nilsen OG. Phthalate Esters : Effects of Orally Administered Dibutylphthalate on Cytochrome P-450 Mediated Metabolism in Rat Liver and Lung. *Acta Pharmacol Toxicol*. 1986;59:263–9.
344. Eid JI, Eissa SM, El-ghor AA. Bisphenol A induces oxidative stress and DNA damage in hepatic tissue of female rat offspring. *J BASIC Appl Zool*. The Egyptian German Society for Zoology; 2015;71:10–9.
345. Kobyliak N, Conte C, Cammarota G, Haley AP, Styriak I, Gaspar L, et al. Probiotics in prevention and treatment of obesity : a critical view. *Nutr Metab (Lond)*. *Nutrition & Metabolism*; 2016;13:14.
346. Kobyliak N, Falalyeyeva T, Mykhalchyshyn G, Kyriienko D, Komissarenko I. Effect of alive probiotic on insulin resistance in type 2 diabetes patients: Randomized clinical trial. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev [Internet]*. *Diabetes India*; 2018;12:617–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.04.015>
347. Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RMG, Mller K, Svendsen KD, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr*. 2010;104:1831–8.
348. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*. 2012;28:539–43.
349. Zeng Z, Yuan Q, Yu R, Zhang J, Ma H, Chen S. Ameliorative Effects of Probiotic *Lactobacillus paracasei* NL41 on Insulin Sensitivity, Oxidative Stress, and Beta-Cell Function in a Type 2 Diabetes Mellitus Rat Model. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63:1–9.
350. Li X, Wang E, Yin B, Fang D, Chen P, Wang G, et al. Effects of *Lactobacillus casei* CCFM419 on insulin resistance and gut microbiota in type 2 diabetic mice. *Benef Microbes*. 2017;8:421–32.
351. Niibo M, Shirouchi B, Umegatani M, Morita Y, Ogawa A, Sakai F, et al. Probiotic *Lactobacillus gasseri* SBT2055 improves insulin secretion in a diabetic rat model. *J Dairy Sci [Internet]*. American Dairy Science Association; 2019;102:997–1006. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-15203>
352. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 2001;413:131–8.
353. Stojanoska MM, Milosevic N, Milic N, Abenavoli L. The influence of phthalates and bisphenol A on the obesity development and glucose metabolism disorders. *Endocrine [Internet]*. Springer US; 2017;55:666–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-016-1158-4>
354. Tabuchi M, Ozaki M, Tamura A, Yamada N, Ishida T, Hosoda M, et al. Antidiabetic effect of *Lactobacillus gg* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003;67:1421–4.
355. Kim SW, Park KY, Kim B, Kim E, Hyun CK. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin

- production. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013;431:258–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.121>
356. Everard A, Matamoros S, Geurts L, Delzenne NM, Cani PD. *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*. 2014;5:1–9.
357. Fonseca-Camarillo G. Immunoregulatory Pathways Involved in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21:2188–93.
358. Kim DH, Soochan, Bum J, Hyeon J, Woo H, Hyuk D, et al. International Journal of Medical Microbiology *Lactobacillus plantarum* CBT LP3 ameliorates colitis via modulating T cells in mice. *Int J Med Microbiol*. 2020;310.
359. Bronte V, Pittet MJ. Review The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity*. Elsevier Inc.; 2013;39:806–18.
360. Barrea L, Somma C Di, Muscogiuri G, Tarantino G, Tenore GC, Orio F, et al. Nutrition , inflammation and liver-spleen axis. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;58.
361. Gear RB, Belcher SM. Impacts of Bisphenol A and Ethinyl Estradiol on Male and Female CD-1 Mouse Spleen. *Sci Rep*. Springer US; 2020;1–12.
362. Yamashita U, Sugiura T, Yoshida Y, Kuroda E. Effect of endocrine disrupters on thymocytes in vitro. *J UOEH*. 2003;25:161–70.
363. Yamashita U, Kuroda E, Yoshda Y, Sugiura T. Effect of Endocrine Disrupters on Immune Responses in vivo. *J UOEH*. 2003;25:365–74.
364. Rahimi O, Farokhi F, Mahdi S, Khojasteh B, Ozi SA. The effect of Bisphenol A on serum parameters and morphology of kidney ' s tissue. *Biol Forum – An Int J*. 2015;7:79–90.
365. Majlesi M, Shekarforoush SS, Ghaisari HR, Nazifi S, Sajedianfard J, Eskandari MH. Effect of Probiotic *Bacillus Coagulans* and *Lactobacillus Plantarum* on Alleviation of Mercury Toxicity in Rat. *Probiotics Antimicrob Proteins*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*; 2017;9:300–9.
366. Aydogan M, Korkmaz A, Barlas N, Durdane K. The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats. *Toxicology*. 2008;249:35–9.
367. Radha MJ, Mahaboob Basha P. Di (n)-Butyl Phthalate Induced Neuronal Perturbations in Rat Brain Tissues: A Multigenerational Assessment. *J Biosci Technol*. 2017;8:794–800.
368. Chen L, Lam JCW, Tang L, Tang L, Hu C, Liu M, et al. Probiotic modulation of lipid metabolism disorders caused by perfluorobutanesulfonate pollution in zebrafish. *Environ Sci Technol*. 2020;54:7494–503.
369. Hu C, Tang L, Liu M, Lam PKS, Lam JCW, Chen L. Probiotic modulation of perfluorobutanesulfonate toxicity in zebrafish: Disturbances in retinoid metabolism and visual physiology. *Chemosphere*. 2020;258:127409.
370. Sun B, Liu M, Tang L, Hu C, Huang Z, Zhou X, et al. Probiotic supplementation mitigates the developmental toxicity of perfluorobutanesulfonate in zebrafish larvae. *Sci Total Environ*. 2021;799:149458.
371. Giommi C, Habibi HR, Candelma M, Carnevali O, Maradonna F. Probiotic administration mitigates bisphenol a reproductive toxicity in zebrafish. *Int J Mol Sci*. 2021;22.
372. Zang L, Ma Y, Huang W, Ling Y, Sun L, Wang X, et al. Dietary *Lactobacillus plantarum* ST-III alleviates the toxic effects of triclosan on zebrafish (*Danio rerio*) via gut microbiota modulation. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. Elsevier; 2019;84:1157–69. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.007>



## 8. Prilozi

### Biografija autora

Katarina Baralić rođena je 12.08.1991. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i Treću beogradsku gimnaziju kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program farmacija-medicinska biohemija, upisala je akademske 2010/11. godine, a diplomirala 29.09.2015. (prosečna ocena: 9,15). Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete Vlade Republike Srbije, od 2011. do 2015. godine. U toku integrisanih akademskih studija učestvovala je u izradi studentskog naučno-istraživačkog rada pod nazivom „Imunohromatografska i LC/MS analiza opijata u urinu nakon konzumacije proizvoda sa makom“. Završni rad na temu „Toksičnost ftalata“ odbranila je na Katedri za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“ sa ocenom 10. Po obavljenom pripravnničkom stažu položila je stručni ispit 26.12.2016. godine. Doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, modul Toksikologija, upisala je akademske 2015/16. godine. Položila je sve ispite na doktorskim studijama (prosečna ocena: 9,87). Akademske 2019/20. godine na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu završila je specijalističke akademske studije, studijski program Toksikološka procena rizika, stekavši zvanje specijalista farmacije. Od 2016. godine kao student doktorskih studija na Katedri za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“ Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu učestvuje u izvođenju praktične nastave na integrisanim akademskim studijama na obaveznom predmetu Toksikologija s analitikom. Od aprila 2018. do 2020. godine bila je zaposlena na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao istraživač-pripravnik u okviru projekta III 46009 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a potom u okviru institucionog finansiranja. Aprila 2021. godine stekla je zvanje istraživač - saradnik. U zvanje asistenta za užu naučnu oblast Toksikologija izabrana je 14.04.2022. Od septembra 2020. godine istraživač je na nacionalnom dvogodišnjem projektu „Dekodiranje uloge ekspozoma u endokrinom zdravlju“, DecodExpo, programa za izvrsne projekte mladih istraživača (PROMIS), Fond za nauku Republike Srbije. Od sredine 2021. godine, istraživač je na trogodišnjem Istraživačko-razvojnog projektu sa Narodnom Republikom Kinom pod nazivom „Povećanje efikasnosti imunoterapije karcinoma kombinacijom CAR-T ćelija ili PD-1/PD-L1 inhibitora sa imunomodulatorima" finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od 2021. godine učestvuje na nacionalnom projektu Udruženja toksikologa Srbije, pod pokroviteljstvom Ministarstva zdravlja Republike Srbije, „Informisana mama - zdrava beba, kako bezbedno živeti sa hemikalijama". Od 2021. godine učesnik je i COST akcije CA20121 (*Bench to bedside transition for pharmacological regulation of NRF2 in noncommunicable diseases* - BenBedPhar) finansirane od strane Evropske Komisije. Bila je komentor šest studentskih naučno-istraživačkih radova urađenih u okviru Centra za naučno-istraživački rad studenata Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i član komisije za odbranu 20 završnih radova. Dobitnik je treće nagrade Farmaceutskog fakulteta u Beogradu za najbolje naučno-istraživačke radove studenata poslediplomskih studija u 2020. godini, kao i nagrade za najbolje rezultate naučnoistraživačkog rada nastavnika i saradnika Farmaceutskog fakulteta u Beogradu za 2020/2021. školsku godinu i više stipendija za učešće na međunarodnim kongresima iz oblasti toksikologije (Stipendija Evropskog udruženja toksikologa (EUROTOX) 2017, 2018. i 2021. godine, stipendija Internacionalnog udruženja toksikologa (IUTOX) 2019. godine i stipendija MDPI časopisa *International Journal of Environmental Research and Public Health*, IJERPH 2022. godine). Pohađala je više kurseva u oblasti toksikologije u organizaciji EUROTOX-a, kao i nacionalnih udruženja toksikologa Srbije, Turske i Hrvatske i kurseva za razvoj akademskih veština u organizaciji Univerziteta u Beogradu. Član je Udruženja toksikologa Srbije, Evropskog udruženja toksikologa - EUROTOX i Međunarodnog udruženja toksikologa - IUTOX. Služi se engleskim (C1) i ruskim jezikom (B1).

## **Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije**

### **Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a)**

1. Baralić K, Bozic D, Živančević K, Milenković M, Javorac D, Marić Đ, Miljaković Antonijević E, Buha Djordjevic A, Vukomanović P, Čurčić M, Bulat Z, Antonijević 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)
2. Baralić K, Živančević K, Jorgovanović D, Javorac D, Radovanović J, Gojković T, Djordjevic AB, Čurčić M, Mandinić Z, Bulat Z, Antonijević 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)
3. Baralić K, Živančević K, Javorac D, Djordjevic AB, Anđelković M, Jorgovanović D, Miljaković EA, Čurčić M, Bulat Z, Antonijević 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)

### **Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)**

1. Baralić K, Buha Djordjevic A, Živančević K, Antonijević E, Anđelković M, Javorac D, Čurčić M, Bulat Z, Antonijević 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)
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)

### **Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M23)**

1. Baralić K, Živančević K, Božić D, Jennen D, Djordjevic 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)

### **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (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 Kuala Lumpur, Malaysia from 13-16 June 2021. *Book of Abstracts*; 87 p.
2. Baralić K, Živančević K, Javorac D, Anđelković M, Antonijević E, Djordjevic AB, Čurčić 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. *Toxicology Letters*. 2021 Sep 1;350:184 p.
3. Baralić K, Živančević K, Čurčić 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, July 15–18, 2019. Book of Abstracts; 133 p.
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. *Toxicology Letters Official Journal of EUROTOX, Abstracts of the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) Brussels, Belgium, 2-5 September, 2018. Toxicol Lett, 295S (2018) 69–266 p.*
  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, 18-21th April 2018. Book of Abstracts; 105 p.

#### **Radovi objavljeni u u istaknutim nacionalnim časopisima (M52)**

1. Baralić K, Ćurčić M, Antonijević E, Antonijević B, Đukić-Ćosić D. Mehanizmi dejstva ftalata na razvoj gojaznosti. *MD-Medical Data 2019;11: 029-034.*

#### **Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u celini (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, 66 (Suppl 1): 9 – 10 p.*

## Изјава о ауторству

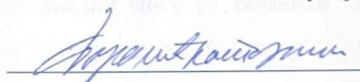
Име и презиме аутора Катарина Баралић  
Број индекса 2/15

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом  
Токсичност смеше фталата и бисфенола А и процена протективног дејства  
пробиотика на моделима пацова и зебрице

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора




У Београду, 14.7.2022.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора Катарина Баралић  
Број индекса 2/15  
Студијски програм Токсикологија  
Наслов рада Токсичност смеше фталата и бисфенола А и процена  
протективног дејства пробиотика на моделима пацова и зебрице  
Ментор проф. др Данијела Ђукић-Ћосић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**. Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора



У Београду, 14.7.2022.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

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

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA) (Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора



У Београду, 14.7.2022.

1. **Ауторство.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.